

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

Том 19, № 6. С. 651-810

2017

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

KEDRION

BIOPHARMA

Keep Life Flowing

И.Г.Вена

ИММУНОГЛОБУЛИН ЧЕЛОВЕКА НОРМАЛЬНЫЙ
РАСТВОР ДЛЯ ИНФУЗИЙ

ВЫСОКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ПЕРЕНОСИМОСТЬ

АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ ВСЕМ НУЖНЫ



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

ноябрь-декабрь

2017, том 19

№ 6

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197136, Санкт-Петербург, а/я 58.

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

© Медицинская иммунология

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

Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

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

Издательство «Человек»

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Подписано в печать 22.11.2017 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 20. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1271

Напечатано в ООО «ИПК Береста».

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

Тел.: (812) 388-90-00

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

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

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

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

Симбирцев Андрей Семенович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

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

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

November-December

2017, volume 19

No. 6

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

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

Sergei A. Ketlinskij – PhD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

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

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

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

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

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaja
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

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

Address for correspondence:

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

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

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

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

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

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

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 22.11.2017. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 20. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Produced at the IPK Beresta Printing House.

196084, Russian Federation, St. Petersburg, Kolya Tomchak str., 28.

Phone: (812) 388-90-00

Since 2001, the Medical Immunology Journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific Journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science

Since June 2016 the Medical Immunology Journal is included into international SCOPUS database

Boris V. Pinegin – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnosics and Immunotherapy, Chief, Moscow, Russian Federation

Andrei S. Simbirtsev – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Deputy-director on Science, St. Petersburg, Russian Federation

Viacheslav S. Smirnov – PhD, MD, Professor, "Cytomed" Ltd., Director on Science, St. Petersburg, Russian Federation

Rahim M. Khaitov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation

Elena R. Chernykh – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Deputy-director on Science, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Chief, Novosibirsk, Russian Federation

Editorial Council

Eugen Feist – PD, MD, Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Free University and Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany

Sophia Khaldoyanidi – PhD, MD, Associate Member, Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA, USA

Elena Lasunskaja – PhD, MD, Associated Professor, Laboratory of Biology of Recognition, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil

László Maródi – PhD, MD, Professor, Department of Infectious and Pediatric Immunology, University of Debrecen Medical and Health Science Centre, Debrecen, Hungary

Jaroslav Michálek – PhD., MD, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Dirk Roggenbuck – PhD, MD, Professor, Lausitz University of Applied Sciences, Senftenberg, Germany

Seung-Yong Seong – PhD, MD, Seoul National University, Associate Dean for Planning, Department of Microbiology and Immunology, Chief, Seoul, South Korea

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Никонова А.А., Хаитов М.Р., Хаитов Р.М.

ХАРАКТЕРИСТИКА И РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ МАКРОФАГОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХ 657

Матвеева Л.В.

МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА..... 673

Зафранская М.М., Нижегородова Д.Б.

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТЕВЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК СТРАТЕГИЯ ЛЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА: АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ..... 683

Оригинальные статьи

Дагиль Ю.А., Арбатский Н.П., Алхазова Б.И., Львов В.Л., Пашенков М.В.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СЕЛЕКТИВНЫХ И НЕСЕЛЕКТИВНЫХ АГОНИСТОВ NOD-РЕЦЕПТОРОВ 705

Юрчинский В.Я., Морева Л.А.

СРАВНИТЕЛЬНО МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ СООТНОШЕНИЙ ЛИМФОЦИТОВ РАЗНЫХ СТАДИЙ ЗРЕЛОСТИ В ТИМУСЕ НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ 715

Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Руднева И.А., Тимофеева Т.А.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВИРУСА ГРИППА A(H1N1)pdm09 С МОНОЦИТАРНЫМИ МАКРОФАГАМИ *IN VITRO*: ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ГЕНОВ TLR7 И RIG1 РЕЦЕПТОРОВ 721

Савлевич Е.Л., Хайдуков С.В., Курбачева О.М., Бондарева Г.П., Шачнев К.Н., Симбирцев А.С.

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНСУТИТОМ 731

Хворостухина Н.Ф., Островская А.Е., Новичков Д.А., Степанова Н.Н.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ ОСЛОЖНЕНИЯХ ГОРМОНОТЕРАПИИ МИОМЫ МАТКИ..... 739

Герцев А.В., Ищук В.Н., Закревский Ю.Н.

ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОКИНОВОЙ АКТИВНОСТИ И УРОВНЯ ПРОДУКЦИИ β -ЭНДОРФИНА ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ НА ФОНЕ АСТЕНО-НЕВРОТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, У МУЖЧИН МОЛОДОГО ВОЗРАСТА ИЗ ГРУППЫ НАПРЯЖЕННЫХ ПРОФЕССИЙ 749

Старшинова А.А., Беркос А.С., Ватутина В.А., Овчинникова Ю.Э., Соколова Ю.В., Довгалюк И.Ф., Бубнова Л.Н., Яблонский П.К.

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ HLA-DRB1 И DQB1 У ДЕТЕЙ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ..... 755

Шабалдин А.В., Цепкина А.В., Шмулевич С.А., Понасенко А.В., Крюков П.М., Шабалдина Е.В.

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ HLA-G 3'UTR 14-bp ins/del У ЖЕНЩИН, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА ИЛИ РЕПРОДУКТИВНЫЕ ПОТЕРИ В РАННИЕ СРОКИ ГЕСТАЦИИ..... 763

Волкова М.В., Кундер Е.В., Генералов И.И., Петрович Д.М.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ И РЕАКТИВНОМ АРТРИТАХ 771

Шевела Е.Я., Ница Н.А., Старостина Н.М., Баранов С.И., Кожевников Ю.А., Попова Н.Д., Баторов Е.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

ПЕРВЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОК СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЛИПОАСПИРАТА У ПАЦИЕНТОВ С ГОНАРТРОЗОМ 779

Краткие сообщения

Телесманич Н.Р., Коновальчик М.А., Микашинович З.И., Криволапова Э.Г.

ОСОБЕННОСТИ IgE-ПОЛИКЛОНАЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ НАРУШЕНИЯХ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АНТИГЕНОВ ГРУППЫ КРОВИ 789

Супрун Е.Н., Супрун С.В., Гусева О.Е., Лощенко М.А., Пивкина Т.В., Савицкая Е.А., Ануриев С.В., Осмолкина В.А., Брага С.С.

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ У ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ 797

Полушина Л.Г., Светлакова Е.Н., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В., Базарный В.В.

КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ПАРОДОНТИТЕ..... 803

Правила для авторов 807

Авторский указатель 810

Предметный указатель 810

CONTENTS

Reviews

Nikonova A.A., Khaitov M.R., Khaitov R.M.

CHARACTERISTICS AND ROLE OF MACROPHAGES IN PATHOGENESIS OF ACUTE AND CHRONIC LUNG DISEASES 657

Matveeva L.V.

MECHANISMS OF CELLULAR CYTOTOXICITY INDUCTION IN GASTRIC MUCOSAL INFLAMMATION 673

Zafranskaya M.M., Nizhegorodova D.B.

MESENCHYMAL STEM CELLS AS A THERAPEUTIC STRATEGY FOR MULTIPLE SCLEROSIS: ISSUES AND PERSPECTIVES 683

Original articles

Dagil Yu.A., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., Lvov V.L., Pashenkov M.V.

STRUCTURAL FEATURES OF SELECTIVE AND NONSELECTIVE NOD RECEPTOR AGONISTS 705

Yurchinsky V.Ya., Moreva L.A.

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL STUDY OF QUANTITATIVE RATIOS OF LYMPHOCYTES AT DIFFERENT MATURITY STAGES IN THYMUS OF IMMATURE VERTEBRATES 715

Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A., Timofeeva T.A.

IN VITRO INTERACTION OF INFLUENZA VIRUS A (H1N1)pdm09 WITH MONOCYTIC MACROPHAGES: INDIVIDUAL RESPONSES OF TLR7 AND RIG1 RECEPTOR GENES 721

Savlevich E.L., Khaidukov S.V., Kurbacheva O.M., Bondareva G.P., Shachnev K.N., Simbirtsev A.S.

CHARACTERISTICS OF CELLULAR IMMUNE STATUS IN THE PATIENTS WITH CHRONIC RHINOSINUSITIS WITH NASAL POLYPS 731

Khvorostukhina N.F., Ostrovskaya A.E., Novichkov D.A., Stepanova N.N.

CYTOKINE PROFILE IN COMPLICATIONS OF HORMONE THERAPY ADMINISTERED FOR UTERINE FIBROIDS 739

Gertsev A.V., Ischuk V.N., Zakrevsky Yu.N.

INDICATORS OF CYTOKINE ACTIVITY AND BETA-ENDORPHIN PRODUCTION LEVEL IN ARTERIAL HYPERTENSION ASSOCIATED WITH ASTHENIC/NEUROTIC DISORDERS IN YOUNG MEN EMPLOYED IN STRESSFUL PROFESSIONS 749

Starshinova A.A., Berkos A.S., Vatutina V.A., Ovchinnikova Yu.E., Sokolova Yu.V., Dovgalyuk I.F., Bubnova L.N., Yablonskiy P.K.

FEATURES OF HLA-DRB1 AND DQB1 ALLELES DISTRIBUTION IN CHILDREN WITH GENERALIZED TUBERCULOSIS 755

Shabaldin A.V., Tsepokina A.V., Shmulevich S.A., Ponasenko A.V., Kryukov P.M., Shabaldina E.V.

DISTRIBUTION PATTERNS OF ALLELES AND GENOTYPES FOR HLA-G 3'UTR 14-bp ins/DEL IN MOTHERS OF CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DEFECTS OR REPRODUCTIVE LOSSES AT EARLY GESTATION TERMS 763

Volkova M.V., Kunder A.V., Generalov I.I., Petrovich D.M.

HETEROGENEITY OF POLYCLONAL IMMUNOGLOBULINS NUCLEASE ACTIVITY IN RHEUMATOID AND REACTIVE ARTHRITIS 771

Shevela E.Ya., Nitsa N.A., Starostina N.M., Baranov S.I., Kozhevnikov Yu.A., Popova N.D., Batorov E.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

PRELIMINARY CLINICAL RESULTS WITH LIPOASPIRATE STROMAL VASCULAR CELL FRACTION IN TREATMENT OF PATIENTS WITH KNEE OSTEOARTHRITIS 779

Short communications

Telesmanich N.R., Konovalchik M.A., Mikashinovich Z.I., Krivolapova E.G.

BLOOD GROUP ANTIGEN-DEPENDENT FEATURES OF POLYCLONAL IgE-RESPONSE IN CARBOHYDRATE METABOLIC DISORDERS 789

Suprun E.N., Suprun S.V., Guseva O.E., Loschenko M.A., Pivkina T.V., Savitskaya E.A., Anuriev S.V., Osmolkina V.A., Braga S.S.

FEATURES OF TRANSFORMATIONS OF RED BLOOD CELLS IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA 797

Polushina L.G., Svetlakova E.N., Sementsova E.A., Mandra Yu.V., Bazarny V.V.

CLINICO-PATHOGENETIC VALUE OF SOME CYTOKINES IN PERIODONTITIS 803

Instructions to Authors 807

Author index 810

Subject index 810

ХАРАКТЕРИСТИКА И РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ МАКРОФАГОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХ

Никонова А.А.^{1,2}, Хаитов М.Р.¹, Хаитов Р.М.¹

¹ ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Резюме. Макрофаги являются одной из самых многочисленных популяций клеток респираторного тракта, отличающейся способностью приобретать разнообразные фенотипы, в зависимости от сигналов микроокружения (классически активированные M1, альтернативно активированные M2). Есть все основания полагать, что различные популяции макрофагов принимают участие как в защите организма от инфекционных патогенов, так и в предотвращении неконтролируемого воспаления в тканях. Изменение фенотипов макрофагов в легких характерно для многих заболеваний респираторного тракта, включая бронхиальную астму, хроническую обструктивную болезнь легких, легочный фиброз и инфекционные заболевания. В данном литературном обзоре мы сфокусировались на биологии, происхождении и характеристике известных фенотипов макрофагов, а также представили современные данные об их роли в развитии хронических заболеваний легких — бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких, а также острых заболеваний бактериальной и вирусной природы.

Ключевые слова: макрофаги, бронхиальная астма, ХОБЛ, бактерии, вирусы, моноциты, поляризация моноцитов, маркеры

CHARACTERISTICS AND ROLE OF MACROPHAGES IN PATHOGENESIS OF ACUTE AND CHRONIC LUNG DISEASES

Nikonova A.A.^{a,b}, Khaitov M.R.^a, Khaitov R.M.^a

^a NRC Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation

^b Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. Macrophages are among the most abundant cells of the respiratory tract, being characterized by their ability to have different phenotypes, depending on signals from the microenvironment (classically activated M1, alternatively activated M2). Despite contradictory literature data describing role of various macrophage phenotypes, they appear to be coupled to the systems protecting the organism from infectious pathogens and preventing development of excessive tissue responses. Phenotypical changes of lung macrophages are found

Адрес для переписки:

Никонова Александра Александровна
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России
115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24/2
Тел.: 8 (495) 674-45-84.
E-mail: aa.nikonova@nrcii.ru

Address for correspondence:

Nikonova Alexandra A.
NRC Institute of Immunology FMBA
115478, Russian Federation, Moscow, Kashirskoe rd, 24/2
Phone: 7 (495) 674-45-84.
E-mail: aa.nikonova@nrcii.ru

Образец цитирования:

А.А. Никонова, М.Р. Хаитов, Р.М. Хаитов
«Характеристика и роль различных популяций макрофагов
в патогенезе острых и хронических заболеваний легких»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 657-672.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-657-672
© Никонова А.А. и соавт., 2017

For citation:

A.A. Nikonova, M.R. Khaitov, R.M. Khaitov "Characteristics
and role of macrophages in pathogenesis of acute and chronic
lung diseases", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 657-672.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-657-672
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-657-672

in various respiratory diseases including bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary fibrosis and infectious conditions. In this review article, we focused on the biology, origin and characterization of different macrophage phenotypes, and presented current data highlighting their role in development of chronic lung diseases, i.e., bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease and acute infectious diseases.

Keywords: macrophages, asthma, COPD, bacteria, viruses, monocytes, monocytes polarization, markers

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 16-14-10188.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Введение

Основная функция респираторной системы заключается в обеспечении организма кислородом и утилизации углекислого газа. Кроме того, легкие выполняют важную недыхательную функцию по защите организма от вредных компонентов вдыхаемого воздуха и метаболизме биологически активных веществ. В легких непрерывно происходят иммунные реакции в ответ на вдыхаемые чужеродные частицы и антигены. Реакции как врожденного, так и приобретенного иммунного ответа вносят свой вклад в обеспечение иммунной защиты легких. Традиционные методы исследования клеточного состава нижних отделов дыхательных путей включают сбор мокроты и бронхоскопию со сбором бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ). Согласно клиническим рекомендациям Американского торакального общества, для здорового некурящего человека характерен следующий состав БАЛ: альвеолярные Мф (аМф) > 85%, нейтрофилы ≤ 3%, лимфоциты — 10-15%, эозинофилы ≤ 1%, сквамозный эпителий/реснитчатые клетки цилиндрического эпителия ≤ 5% [62]. Эффекторные иммунные клетки, Т-лимфоциты, тучные клетки, дендритные клетки и макрофаги (Мф) присутствуют в легочной интерстиции уже на железистой стадии эмбриогенеза легких [40]. У человека после рождения тканевые Мф дифференцируются из моноцитов крови.

Гетерогенность моноцитов периферической крови

Моноциты периферической крови человека не гомогенны. Согласно новой классификации, утвержденной комитетом по номенклатуре Международного союза иммунологических обществ, основная популяция моноцитов (90%) CD14⁺⁺CD16⁻ называется классическими моноцитами, оставшиеся 10% моноцитов подразделяются на промежуточные (CD14⁺⁺CD16⁺) и неклассические (CD14⁺CD16⁺⁺) [106]. Несмотря на то что роль различных популяций в ор-

ганизме до конца не изучена, высказываются предположения о том, что классическая и промежуточная популяции обладают воспалительными свойствами, напоминающими мышинные Ly6C⁺ моноциты, которые также называют «воспалительными» [41], тогда как неклассические моноциты играют роль «патрулей» по аналогии с мышинными Ly6C⁻ моноцитами («патрулирующие» или альтернативные) [34]. И человеческие, и мышинные «воспалительные» моноциты экспрессируют высокий уровень хемокинового рецептора CCR2 и низкий уровень CX3CR1, тогда как патрулирующие — наоборот. То есть воспалительные моноциты чувствительны к сигналам хемокина CCL2, который опосредует проникновение Ly6C⁺/CD14⁺ моноцитов к месту воспаления [95], в то время как «патрулирующие» моноциты чувствительны к CX3C-хемокиновому лиганду 1 [7] (CX3CL1 — человеческий фракталкин или мышинный нейротактин), растворимому или связанному с мембраной хемокину, который экспрессируется в тканях и на эндотелиальных клетках. Таким образом, Ly6C⁻ клетки патрулируют эндотелий сосудов, контролируя их целостность [7, 42]. Кроме того, эти клетки отличаются более длительным периодом полужизни, который составляет от 5-7 дней до 2 недель, тогда как у Ly6C⁺ — около 8 часов [9]. В связи с этим Ly6C⁻ моноциты считают «макрофагами сосудов».

Помимо функций, происхождение разных популяций моноцитов является предметом дискуссии. Предполагается, что Ly6C⁺ моноциты являются предшественниками Ly6C⁻ и передача сигнала через CSF-1R необходима для созревания моноцитов из Ly6C⁺ в Ly6C⁻ [103]. Так же как и участие транскрипционного фактора NR4A1 (Nurr77) [10].

Популяции легочных макрофагов и их функции

Различают несколько популяций легочных Мф. Самой многочисленной и хорошо изученной популяцией являются альвеолярные макрофаги (аМф), которые локализируются в просвете альвеол, тесно соединены с эпителием альвеол и непосредственно подвергаются воздействию воздуха и окружающей среды. Помимо фагоцитоза, аМф участвуют в катаболизме сурфактанта,

выстилающего альвеолы и предотвращающего экспираторный коллапс [4, 86].

Другая популяция Мф — интерстициальные Мф (иМф), которые составляют 30-40% легочных Мф [12, 14]. Тонкая стенка альвеол отделяет аМф от иМф, которые располагаются в узком межальвеолярном пространстве вместе с альвеолярными капиллярами, фибробластами и другими мезенхимальными клетками. ИМф участвуют в ремоделировании и поддержании гомеостаза тканей, в презентации антигенов [4, 84], а также оказывают влияние на функции дендритных клеток, предотвращая развитие аллергии в дыхательных путях [12, 14]. Следует отметить, что аМф характеризуются высоким уровнем экспрессии CD11c и низким CD11b, тогда как иМф — наоборот [16]. Третий вид — это макрофаги экссудата, которые мигрируют в ткань легких из кровотока при воспалительных процессах посредством СС хемокиновых рецепторов 2 (CCR2) [6, 36]

Таким образом, можно выделить основные функции различных популяций Мф. Это защита от инфекций, которая обеспечивается благодаря способности Мф фагоцитировать антигены и выделять различные про- и противовоспалительные медиаторы и эффекторные молекулы, включая цитокины, протеазы и ингибиторы протеаз, ROIs (reactive oxygen intermediates), RNIs (reactive nitrogen intermediates). В этом случае Мф вносят вклад не только в развитие воспаления и повреждение тканей, но также участвуют в реакциях, обеспечивающих заживление тканей, контроль и разрешение воспаления. Кроме того, Мф участвуют в реакциях адаптивного иммунитета благодаря способности презентировать антиген, но их способность активировать Т-клетки ограничена по сравнению с дендритными клетками.

М1- и М2-макрофаги. Характеристика, происхождение и роль в патологии

Однако популяция легочных Мф более разнообразна и не ограничивается только анатомическим расположением в тканях. Макрофаги — полиморфная популяция клеток, фенотип которых определяется сигналами микроокружения. Так, интерферон (IFN) λ , самостоятельно или в комплексе с лигандами Toll-подобных рецепторов (TLR), стимулирует классический путь М1-активации Мф, который характеризуется высоким уровнем продукции провоспалительных цитокинов, ROIs, RNIs, а также выраженной бактерицидной и противоопухолевой активностью. Стимуляция интерлейкинами IL-4 и IL-13 активирует М2, которые обладают противовоспалительными, регенерирующими свойствами, а также высокой фагоцитарной активностью

в отношении микроорганизмов и апоптотных клеток (эффероцитоз), однако слабыми способностями презентовать антигены [97].

Одно из различий между М2 и М1 заключается в том, что в М2 продуктами метаболизма аргинина являются орнитин и полиамины, тогда как в М1 — оксид азота (NO) и цитруллин [64]. Продуцирующие орнитин М2 активируют пролиферацию клеток и заживление посредством полиаминов, фиброза и других регенерирующих функций [77], тогда как продуцирующие NO М1 являются важными эффекторными клетками с микробицидной активностью и способностью ингибировать пролиферацию клеток [56]. Помимо этого, М1 и М2 различаются спектром синтезируемых цитокинов [68] и различием в метаболизме железа и глюкозы [15]. Популяция М2 Мф более гетерогенна. Также различают М2-подобные Мф (М2а, М2б и т.д.), которые имеют много общих свойств с М2-клетками. Стимулы, индуцирующие М2-поляризацию, ингибируют активность NF- κ B и STAT1. IL-4 и IL-13 избирательно активируют индукцию CCL24, CCL17, CCL18 и CCL22 в М2а, ингибируя при этом IFN γ . М2б экспрессируют высокий уровень IL-10 и низкий IL-12, а М2с характеризуются повышенным уровнем CXCL13, CCL16 и CCL18 [67]. Схожие перекрестные фенотипы моноцитов человека формируются под влиянием гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF; стимулируют М1) или М-CSF (стимулируют М2) [96]. Также выделяют несколько особых типов Мф (М4, Mhem, Mox), которые идентифицировали при атеросклерозе. Они обладают характеристиками, отличными от М1/М2 [26].

Впервые термины «классически и альтернативно-активированные Мф, М1-М2» были предложены в начале 90-х [19, 90]. Однако в настоящее время существует мнение, что эта номенклатура устарела и не в полной мере отражает фенотип и свойства разных типов Мф. Была предложена новая классификация, согласно которой в учет принимается стимулятор, активирующий тот или иной тип клеток. Например, M(IL-4), M(Ig), M(IL-10), M(GC), M(IFN γ), M(LPS) и так далее [69]. По мнению авторов, такая система позволит стандартизировать условия экспериментов, а также сравнивать свойства клеток, полученные при различных условиях активации в разных лабораториях. Другая предложенная классификация основана на трех основных функциональных особенностях разных фенотипов Мф при поддержании гомеостаза: защитная функция, восстановительная и иммуно-

регуляторная [66]. В соответствии с этими функциями авторы предлагают классифицировать Мф на классически активированные, восстановительные и регуляторные [31].

Множество факторов влияет на М1-поляризацию как из наивных М0-клеток, так и поляризованных М2. В исследованиях *in vitro* было продемонстрировано, что поляризованные клетки могут быть деполяризованы до М0 при культивации в среде без цитокинов в течение 12 дней или поляризованы в другой фенотип после культивации в среде с соответствующими факторами активации [92].

Существует несколько гипотез о том, как именно происходит поляризация и переключение разных типов Мф в условиях *in vivo*. Согласно первой гипотезе, Ly6C^+ моноциты и/или Мф, дифференцированные из моноцитов, в тканях становятся М1 Мф, а Ly6C^- становятся М2. Однако эта гипотеза не была подтверждена, т.к. в разных исследованиях наблюдались как дифференцировка Ly6C^+ в М1 и Ly6C^- в М2 [7, 73], так и переключение Ly6C^+ М1 в Ly6C^- М2 [5]. Вторая гипотеза предполагает, что существует несколько последовательных волн мобилизации моноцитов в ткани к месту воспаления. Вследствие этого моноциты, попавшие в ткань на разных этапах, подвергаются действию микроокружения с разными сигналами, которые могут поляризовать клетки в М1 на ранних стадиях и в М2 на поздних [33]. В этом случае цитокины и другие сигналы микроокружения играют ключевую роль в поляризации Мф. И хотя в экспериментах *in vitro* роль цитокинов была подтверждена, в условиях *in vivo* иногда сложно объяснить некоторые факты. Как, например, повышенное содержание М2 в стерильной ране [33] или поврежденных почках [53] в отсутствие Th2 -цитокинов IL-4 и IL-13. В этом случае М1 являются предшественниками М2, т.к. моноциты, мобилизованные к месту воспаления, сначала приобретают воспалительный М1-фенотип, а затем созревают в восстановительный М2. И, наконец, третья теория предполагает, что поляризованные популяции Мф могут переключаться из одного фенотипа в другой в разных условиях. Так, например, было показано, что М2 могут быть перепрограммированы в М1 после обработки лигандами TLR или IFN γ [70].

В настоящее время идентификация разных популяций Мф основана на анализе транскрипции генов и экспрессии белков, специфичных для М1 и М2. Эти маркеры включают трансмембранные гликопротеины, скэвенджер-рецепторы, ферменты, гормоны, хемокины, цитокины

и их рецепторы, с различными и зачастую неизвестными функциями.

В таблице 1 приведена подробная сводная [11, 36, 46, 59, 68, 81] характеристика известных на сегодняшний день популяций Мф. В работах, проведенных нами ранее при поддержке гранта РНФ 16-14-10188, мы также уточняли маркеры поляризации человеческих Мф. В частности, было показано, что CD54, CD14, CD80 и CD197 являются маркерами М1-поляризации Мф человека, но не было выявлено поверхностных маркеров М2. Мы не обнаружили повышенной экспрессии широко распространенных М2-маркеров CD206, CD163, MHCII, CD36 в наших экспериментах, но выявили повышенную продукцию CCL22, IL-10 и CCL17 М2 посредством ИФА. Кроме того, мы показали выраженный противовирусный эффект М1 в ответ на заражение риновирусами за счет повышенной продукции противовирусных интерферонов [1].

Следует отметить, что, несмотря на целый ряд известных маркеров активации, идентифицировать разные популяции Мф в условиях *in vivo* крайне сложно. В тканях могут содержаться смешанные популяции Мф на разных стадиях активации. Кроме того, выделяют популяцию атипичных Мф (табл. 1), которые демонстрируют характерный как для М1, так и М2 характер транскрипции генов [47]. Тканевые и опухолевые Мф также экспрессируют М2-маркеры [58]. По этой причине М2 иногда относят к опухолевым клеткам, хотя это неточное определение, учитывая разнообразие функций М2.

Деление Мф на М1/М2-фенотипы напоминает Th1/Th2 -типы поляризации Т-клеток, однако следует отметить, что экспериментальные данные о свойствах М1 и М2 в значительной степени основаны на исследованиях *in vitro*. Поэтому вполне вероятно, что *in vivo* могут существовать многочисленные промежуточные фенотипы. Более того, существуют различия между М1- и М2-поляризованными подтипами мыши и человека [68].

В некоторых случаях переключение между различными фенотипами Мф происходит бесконтрольно, и это часто ассоциируют с развитием тех или иных патологий человека [20].

Можно привести три специфических примера такого состояния:

1. Толерантность к эндотоксину — измененное состояние в ответ на повторную стимуляцию LPS, которое приводит к глобальному и устойчивому переключению программы экспрессии генов из воспалительного М1 в противовоспалительный фенотип [18].

2. Диабет 2 типа и атеросклеротические повреждения. Это метаболические синдромы, которые приводят к переключению фенотипа макрофагов жировой ткани из восстановительных (как у здоровых людей, не страдающих ожирением) в классически активированные Мф [9].

3. Рак. Состояние, при котором инфильтрированные в опухоль, классически активированные Мф вносят вклад в развитие неоплазии [24], а затем, когда опухолевый процесс прогрессирует, они могут переключиться в регуляторный фенотип и, наконец, дифференцироваться в клетки, которые обладают характеристиками как регуляторных, так и восстановительных Мф [66].

Несмотря на то что при перечисленных патологиях наблюдается динамическое переключение между разными функциональными состояниями, возможно, что изначально смесь М1/М2-клеток являлась причиной их развития [63, 64].

Помимо перечисленных патологий, разные фенотипы Мф играют роль в развитии некоторых заболеваний легких.

Хронические заболевания легких

Бронхиальная астма (БА) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) являются самыми распространенными респираторными хроническими заболеваниями, от которых страдают около 500 миллионов человек по всему миру [2, 29]. ХОБЛ и БА имеют четкие различия в характере воспаления, однако у некоторых пациентов могут присутствовать признаки обоих заболеваний. В данном случае речь идет о так называемом синдроме перекрытия БА-ХОБЛ (СПАХ). Этот термин был введен в клиническую практику в середине 2014 года [8].

Бронхиальная астма

БА традиционно считается заболеванием, ассоциированным с Th2-ответом, характеризующимся повышенной продукцией цитокинов IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13, которые в свою очередь активируют инфильтрацию эозинофилов, продукцию IgE и высвобождение гистамина [3]. В некоторых случаях наблюдается повышенное содержание нейтрофилов и Th17-клеток [52]. Характерными клиническими проявлениями БА являются воспаление и гиперреактивность дыхательных путей. Как правило, количество Мф у пациентов с БА и здоровых людей не различается [28, 30], однако есть свидетельства того, что Мф от пациентов с БА обладают пониженной способностью к фагоцитозу [30]. В целом ряде работ было продемонстрировано, что у пациентов с БА [61] и мышей с аллергическим типом воспаления дыхательных путей наблюдается повышенное

содержание М2 Мф и их продуктов в тканях легких [39, 60, 61, 72], сыворотке и БАЛ [21] по сравнению с контролем. Кроме того, численность М2 Мф ассоциируется с тяжестью течения БА как у людей, так и на мышинных моделях заболевания [27, 89], а также М2 Мф вносят вклад в развитие аллергического воспаления в дыхательных путях, продуцируя Th2-цитокины, которые амплифицируют Th2-ответ (аутокринный тип регуляции) [60, 62].

Известно, что М2 продуцируют целый ряд цитокинов и хемокинов (табл. 1). Среди них хемокин CCL24, который в тандеме с IL-13 мобилизует эозинофилы [78]. Другой известный М2-хемокин — это CCL18. Так как у мышей нет эквивалентного CCL18 гена, то в исследованиях на мышах для экспрессии этого хемокина в легких использовали аденовирусный вектор. Экспрессия CCL18 привела к массовой мобилизации Т-клеток в легкие, воспалению и фиброзу [55]. Эти данные свидетельствуют о том, что CCL18 вносит вклад в развитие заболеваний легких, индуцируя наплыв Т-клеток, которые оказывают патогенетический эффект. CCL18 в основном регулирует мобилизацию Th2-клеток и базофилов, а также индуцирует высвобождение гистамина из базофилов [22]. Еще одним доказательством участия CCL18 в патогенезе БА является его повышенное содержание в мокроте пациентов с БА, установленное при помощи белковых микрочипов [48]. Перечисленные исследования указывают на важную роль CCL18 в патогенезе БА посредством привлечения проастиhmатических иммунных клеток в легкие, хотя точный механизм действия CCL18 изучен не до конца.

Целый ряд исследований указывает на участие IL-33 в патогенезе БА [44]. Кроме того, IL-33 поляризует Мф в М2 [38]. После первой обработки аллергеном основным источником IL-33 являются эпителиальные клетки легких, но после третьей обработки около 20 и 10%, соответственно, IL-33-продуцирующих клеток это М2 Мф и миелоидные дендритные клетки [71]. Повышенное содержание М2, активированных IL-33, возможно, возникает вследствие повышенной экспрессии цитокинов и хемокинов IL-4, IL-5, IL-13, CCL17, CCL18 и CCL24 после их взаимодействия с рецептором IL-33 ST2 [41, 50]. Также повышенное содержание IL-35, IL-17A, базогранулина (маркера активации базофилов) и периостина (маркера эозинофильного воспаления дыхательных путей) было обнаружено в сыворотке крови пациентов с БА. Однако нет информации о том, что они оказывают эффект на М2-поляризацию [100].

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ МАКРОФАГОВ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF DIFFERENT MACROPHAGE TYPES

Тип макрофагов Macrophage type	Характеристика Characteristic	M1	Тканевые M2 Tissue M2	Опухолевые Мф Tumor Mφ
Активатор Activator		IFN γ ; LPS; TNF α ; GM-CSF; бактерии; LDL; HMGB1	Микроокружение в тканях; IL-4; IL-13; IL-10; C1q; C3b; NLRP3; нормальная флора Tissue microenvironment; IL-4; IL-13; IL-10; C1q; C3b; NLRP3; normal microflora	Опухолевое микро- окружение; M-CSF Tumor microenvironment; M-CSF
Функции Functions		Провоспалительные функции; повреждение тканей; Th1-ответ; гиперчувствительность замедленного типа; уничтожение внутриклеточных паразитов; устойчивость к опухолям; противовирусный ответ; индуцируют аутофагию при туберкулезе Proinflammatory functions, tissue injury, Th1 response; delayed-type hypersensitivity; destruction of intracellular parasites, tumor resistance; antiviral response; induce autophagy in tuberculosis.	Ангиогенез; регенерация Angiogenesis; regeneration	Способствуют росту опухоли и метастаз Promote tumor growth and metastasis
Маркеры Markers		CD68; CD86; CD80; MHC II IL-1R; TLR2; TLR4; iNOS; CD197; CD54; CD14; ITGAL; CD25; CD127; ROS	Arg-1; CD163; CD206; CD209; MGL-1; RELM- α ; нейропептиды; факторы роста; катехоламины neuropeptides; growth factors; catecholamines	CD163; CD68; CD206; VEGF-A; Dectin-1; NOS2; MGL-1
Секретируемые цитокины Secreted cytokines		TNF; IL-1 β ; IFN α , IFN β , IFN λ ; NO; IP-10; IL-6; IL-8; IL-12; IL-15; IL-17; IL-23	IL-10	IL-10
Секретируемые хемокины Secreted chemokines		CXCL9, CXCL10; RANTES, CCL2; CCL3; CCL4; CCL5; CCL8; CCL9; CCL10; CCL11; CCL15; CCL19; CCL20		
Транскрипционные факторы; SOCS белки; экспрессия генов Transcription factors; SOCS proteins, gene expression		У мышей: pSTAT1+; pSTAT6 –ve; Socs1; Nfkbiz; Irf5 У человека: pSTAT1+++; IRF5; IRF1; LAG-3, LAMP3; OPTN; PIN-1; ITGAL In mice: pSTAT1+; pSTAT6 –ve; Socs1; Nfkbiz; Irf5 In humans: pSTAT1+++; IRF5; IRF1; LAG-3, LAMP3; OPTN; PIN-1; ITGAL		

M2a альтернативные M(IL-4) M2a alternative M(IL-4)	M2b 2 типа M(Ic) M2b 2 nd type M(Ic)	M2c деактивированные M(IL-10); M(GC) M(GC+TGF-β) M2c deactivated M(IL-10); M(GC) M(GC+TGF-β)	M2d	Атипичные Мф Atypical Mφ
Грибковые инфекции и гельминты; IL-4; IL-13; NLRP3 Fungal and helminth invasions; IL-4; IL-13; NLRP3	Иммунные комплексы и LPS; IL-R1 Immune complexes and LPS; IL-R1	IL-10; TGF-β; глюкокортикоиды; PGE2; Tregs; BM-MSc; ADSCs; IDO IL-10; TGF-β; glucocorticoids; PGE2; Tregs; BM-MSc; ADSCs; IDO	IL-6; аденозин; фактор ингибирующий лейкозные клетки; опухолевое микроокружение IL-6; adenosine; Leukemia-inhibiting factor; tumor microenvironment	Микобактерии; IL-33 Mycobacteria; IL-33
Th2-ответ; аллергия; уничтожение и инкапсуляция паразитов; тормозят аутофагию при туберкулезе Th2 response; allergy; parasite destruction and incapsulation; inhibit autophagy in tuberculosis	Активация Th2; иммунорегуляция; регенерация тканей; фиброз Th2 activation; immune regulation; tissue regeneration; fibrosis	Иммунорегуляция; накопление внеклеточного матрикса; противовоспалительные функции; фагоцитоз Immune regulation' accumulation of extracellular matrix; anti-inflammatory functions; phagocytosis	Присутствуют в опухолях; иммуносупрессия; способствуют росту опухоли и метастаз Present in tumors; immune suppression; promote tumor growth and metastasis	Обладают функциями M1 и M2 Exhibit M1 and M2 functions
Th2-ответ; аллергия; иммунорегуляция; уничтожение и инкапсуляция паразитов; накопление внеклеточного матрикса и регенерация; стимулирование роста опухолей Th2 response; allergy; immune regulation; destruction and incapsulation of parasites; accumulation of extracellular matrix and regeneration; tumor growth promotion				
CD163; MHC II; SR; MMR/CD206; CD200R; TGM2; DecoyR; IL-1R II У мышей: Ym1/2; Fizz1; Arg-1 In mice: Ym1/2; Fizz1; Arg-1	CD86; MHC II	CD163; TLR-1/8; ECM (внеклеточный матрикс); PPAR-delta; SRA-1 CD163; TLR-1/8; ECM (extracellular matrix); PPAR-delta; SRA-1	VEGF-A	Ym1; CD163; NOS2; CD206; MGL-1
TGF-β; IL-1ra IL-4; IL-10; IL-13; IL-33; IL-35; MMP-9; MMP-14; IGF-1	IL-1; IL-6; IL-10; TNFα	IL-10; TGF-β; IGF-1; PGE-2	IL-10; IL-12; TNFα; TGF-β	TNFα; IL-12; IL-6; IL-10
CCL13; CCL17; CCL22; CCL23; CCL24; CCL26	CCL1; CCL20 CXCL1; CXCL2; CXCL3	CCL8; CCL17; CCL18; CCL22; CCL24	CCL5; CXCL10; CXCL16	CCL18
У мышей: pSTAT6+++ pSTAT1 –ve; Socs2; Ifr4 У человека: pSTAT1+++; IRF4; SOCS1; GATA3; FZD2, CLIC2, EMILIN2; CDR2L; CMTM8; ALOX15; F13A1; PTGS1; ALOX15; F13A1; PTGS1 In mice: pSTAT6+++ pSTAT1 –ve; Socs2; Ifr4 In humans: pSTAT1+++; IRF4; SOCS1; GATA3; FZD2, CLIC2, EMILIN2; CDR2L; CMTM8; ALOX15; F13A1; PTGS1; ALOX15; F13A1; PTGS1		У мышей: pSTAT3+; Socs3; Sbno2; Nfil3 У человека: SOCS3; ID3; RGS1; pSMAD2+; MERTK In mice: pSTAT3+; Socs3; Sbno2; Nfil3 In humans: SOCS3; ID3; RGS1; pSMAD2+; MERTK		

Некоторые транскрипционные факторы также вовлечены в процесс поляризации в М2. Так, Jmjd3 или Kdm6b гистоновая деметилаза Lys27 (H3K27) участвует в поляризации М2 при глистных инвазиях и при обработке хитином. Эффект зависит от деметилазной активности Jmjd3 и Irf4 — ключевого фактора транскрипции. Избыточная экспрессия или активация Jmjd3 непосредственно используется организмом для борьбы с гельминтозами, а также имеет анти-астматический эффект [83]. То есть опосредованное Jmjd3 деметилирование H3K27 является необходимым при регуляции поляризации М2 Мф и формировании ответа организма на глистные инвазии.

Среди разных субтипов М2-клеток М2с считают основной популяцией, принимающей участие в инициации разрешения воспаления за счет повышенной экспрессии CD206 и CD163 [38]. В отличие от М2с, М2а характеризуются повышенной экспрессией IL-13, цитокина, который вовлечен в развитие аллергического типа иммунного ответа и продукцию слизи [17]. Кроме того, продуцируемые М2-клетками CCL17, CCL18, CCL22 и eotaxin-2 (CCL24) способствуют инфильтрации эозинофилов и Th2-клеток в легкие [31, 61]. Однако результаты недавних исследований указывают на то, что эти медиаторы и М2-специфичные транскрипционные факторы участвуют в процессе ремоделирования тканей легкого и фиброзе. IL-13 может повышать экспрессию MUC5AC и TGF- β 2, снижая при этом экспрессию β -тубулина в эпителиальных бронхиальных клетках человека [57]. Экспрессия рекомбинантного Fizz1 в легочных фибробластах крысы повышает экспрессию коллагена 1 типа и α -актина гладких мышц [25]. Таким образом, фиброз легких может контролироваться модуляцией М2-клеток на ранних стадиях ремоделирования дыхательных путей.

Несмотря на вышесказанное, считается, что оба типа Мф (М1 и М2) вовлечены в патогенез БА [65]. Так, было показано, что количество М1 значительно увеличено в легких мышей при неаллергическом воспалении после воздействия экстрактом сельскохозяйственной пыли, что также было ассоциировано с увеличением популяций Th1- и Th17-клеток, тогда как при аллергической БА наблюдалось увеличение М2-популяции [80]. Поляризованные М1 способны эффективно активировать Th1-клетки, секретировав CXCL10, IFN γ , IL-8, IL-23p40/p19, TNF α , IL-1 β , RANTES, но не IL-12 (p40/p35) в ответ на заражение различными патогенами, включая микобактерии [31]. У IFN γ дефицитных мышей,

наблюдается незначительное количество М1, но повышенное содержание М2 со сниженным отношением iNOS/arginase [6]. Динамические изменения М1/М2 при БА все еще недостаточно охарактеризованы ни у людей, ни на животных моделях заболевания. Подытоживая роль разных популяций Мф в патогенезе БА, можно сделать вывод о том, что, по-видимому, М1 Мф вовлечены в обострение аллергического воспаления, тогда как М2 участвуют в восстановлении поврежденных тканей легких. Однако персистенция М2 и чрезмерная продукция профибротических факторов М2-клетками вносит вклад в развитие хронического ремоделирования дыхательных путей, которое характерно для БА.

ХОБЛ

Воздействие табачного дыма и частиц загрязненного воздуха приводит к хроническому воспалению легких у людей, подверженных развитию ХОБЛ. Избыточная продукция слизи и прогрессирующее сужение респираторных бронхиол характерны для хронического бронхита. Слизистая, подслизистая, а также железистая ткань инфильтрируются воспалительными клетками, и стенки респираторных бронхиол истончаются из-за отека и фиброза [38]. Хроническая гиперсекреция слизи, которая в дальнейшем способствует закупорке мелких бронхов, индуцируется гиперплазией бокаловидных клеток и гипертрофией подслизистых желез [43]. Это прогрессирующее сужение приводит к облитерации или даже полному исчезновению респираторных бронхиол. Мало известно о роли Мф на этой стадии заболевания, но кластеры пигментированных Мф были обнаружены вокруг мелких воздушных путей, и их присутствие ассоциируют с перибронхиальным фиброзом [32]. Разрушение альвеол, которое характерно для эмфиземы, является результатом инфильтрации воспалительных клеток. Табачный дым/частицы воздуха повреждают эпителиальные клетки, которые в свою очередь продуцируют цитокины и хемокины, привлекающие нейтрофилы и Мф в легкие. Полагают, что эти два вида эффекторных клеток вносят основной вклад в избыточное повреждение тканей, наблюдаемое при эмфиземе, из-за способности продуцировать протеолитические ММР-подобные нейтрофильную и макрофагальную эластазы [23]. Повышенное количество Мф и нейтрофилов было обнаружено в паренхиме легких у пациентов с ХОБЛ [74]. Морфометрический анализ паренхимы легких пациентов с эмфиземой продемонстрировал 25-кратное увеличение количества Мф в ткани и альвеолярном пространстве по сравнению с легкими курильщиков с нормальной функ-

цией легких [79]. Исследования на животных подтвердили доминантную роль Мф в развитии ХОБЛ. Так, в экспериментах на крысах, подвергаемых воздействию табачного дыма, удаление нейтрофилов не предотвращало развития эмфиземы, тогда как удаление Мф предотвращало [75].

Исследования на животных и клинические данные в основном предполагали ведущую роль М1 Мф в развитии ХОБЛ. Однако результаты некоторых других исследований ставят это утверждение под сомнение. Например, в работе Shaykhiev и соавт. был проведен анализ транскриптома аМф у курильщиков и некурильщиков, а также курильщиков с ХОБЛ [85]. Было показано, что у курильщиков наблюдается смешанный фенотип аМф со снижением активности М1-ассоциированных генов и частичным повышением активности М2-генов. В другом исследовании Hodge и соавт. также продемонстрировали смешанный фенотип аМф у курильщиков с ХОБЛ. При этом наблюдалось снижение экспрессии МНС II у М1 и эффероцитоза у М2, но повышение экспрессии провоспалительных цитокинов и DC-SIGN [37]. Аналогичные данные были получены в исследовании Bazzan и соавт., которые исследовали биоптат легких от курильщиков и некурильщиков, а также курильщиков, страдающих ХОБЛ, методом иммуногистохимии. Было установлено, что в здоровых легких Мф в основном не поляризованы, тогда как курение и тяжесть течения ХОБЛ значительно увеличивают количество М1 и М2 Мф в легких. При этом М1- и М2-маркеры экспрессировались одновременно на одной клетке [19].

Таким образом, согласно современным представлениям, ХОБЛ-ассоциированные Мф не вписываются в классическую М1/М2-дихотомию, и, скорее всего, воспалительное окружение дыхательных путей, характерное для ХОБЛ, стимулирует развитие М1 и М2 Мф одновременно [29, 37]. Баланс между этими состояниями поляризации может в свою очередь оказывать значительный эффект на прогрессирование болезни [47]. Существуют доказательства того, что перепрограммирование аМф — это следствие хронического воздействия табачного дыма, которое ассоциировано с индукцией уникального набора генов, включая MMP12 [101]. В уже упомянутой выше работе Shaykhiev и соавт. наблюдалось парадоксальное переключение транскриптома в профиль М2 у курильщиков с ХОБЛ и снижение профиля М1-генов на фоне значительно увеличенной экспрессии провоспалительных медиаторов, характерных для ХОБЛ [85]. Следовательно, су-

ществует необходимость в более четком определении вклада М1/М2 в развитие патологии, т.к. появляются новые доказательства того, что обе популяции одновременно существуют в легких пациентов с ХОБЛ [98].

Бактериальные инфекции

Повышенная микробицидная способность Мф, активированных микробиологическими продуктами, а также их важная роль в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета предполагают, что стратегия патогенов будет направлена на реполяризацию Мф в выгодный для их выживания фенотип. В результате нескольких исследований транскриптома было установлено, что клетки врожденного иммунитета, и особенно Мф, принимают участие в общем ответе на внедрение патогена, что включает в себя активацию общего профиля экспрессии генов [45]. Так, в исследовании, обобщающем транскриптом мононуклеарных фагоцитов в ответ на обработку бактериями и компонентами бактерий и фокусирующийся на генах, которые вовлечены в поляризацию Мф, была идентифицирована общая программа ответа, которая в основном включает повышенную экспрессию М1-ассоциированных генов, включая цитокины TNF, IL-6, IL-12, IL-1 β , рецепторы цитокинов IL-7R и IL-15 α , а также хемокины CCL2, CCL5, CXCL8 и хемокиновый рецептор CCR7 [13]. Эту М1-программу активации обычно ассоциируют с защитой от бактериальных инфекций. Было показано, что М1-поляризация способствует контролю над несколькими бактериальными инфекциями, включая *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, и хламидийными инфекциями [13, 49]. Вследствие этого несколько патогенных бактерий, особенно с внутриклеточной локализацией, выработали механизм, препятствующий поляризации Мф, для того чтобы повысить свою выживаемость. Например, было замечено, что при легочной инфекции мышей *Staphylococcus aureus* индуцирует сигнальный путь Akt1, сдвигая Мф из антимикробного М1 фенотипа в функционально инертный [102]. *M. tuberculosis* секретируют факторы вирулентности LAM и ESAT-6, которые ингибируют активацию М1 посредством ингибирования созревания фагосом и активации NF- κ B соответственно [54].

Вирусные инфекции

До недавнего времени вопросам поляризации и активации Мф при вирусных инфекциях не уделяли должного внимания, несмотря на то что экспрессия таких цитокинов, как IFN γ , IL-4 и IL-10, детектируется при моноцитотропных

вирусных инфекциях. Влияние вирусных инфекций на поляризацию Мф было продемонстрировано для ВИЧ и РСВ (респираторно-синцитиальный вирус) и ассоциировано с инфекциями, вызванными герпесвирусами человека, вирусами гриппа, ТОРС-ассоциированным коронавирусом и другими [82].

Так, например, предполагается, что поляризация Мф связана с развитием РСВ-инфекции [87, 96]. При РСВ-индуцированных бронхоолитах наблюдается Th1/Th2 «цитокиновый шторм» и, как следствие, неселективная деплеция легочных Мф, блокировка индукции провоспалительных цитокинов через 1 день после инфицирования и повышение вирусной нагрузки в легких на 4 день. Это предполагает важную роль Мф (предположительно М1) в контроле за репликацией вируса [97]. У мышей без рецептора к IL-4, т.е. с заблокированной М2а-поляризацией, РСВ инфекция усугубляет воспаление и повреждение легких, что указывает на то, что М2-дифференцировка необходима для контроля над РСВ-индуцированной иммунопатологией на поздних стадиях заболевания [87, 88].

Также известно, что среди трех распространенных клонированных вирусов гриппа птиц H5N1, циркулирующих в Китае (2.3.2, 2.3.4 и 7), клон 2.3.4 эффективно реплицируется и вызывает цитопатогенное действие на культуру Мф, дифференцированных из моноцитов крови человека (МДМ), а также стимулирует высокий уровень экспрессии М1-факторов IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ и MCP-1 [91] в условиях *in vitro*.

Однако некоторые вирусы стимулируют поляризацию в М2-фенотип. Во время инфекции, вызванной ТОРС-ассоциированным коронавирусом, повреждение легких прогрессирует и приводит к развитию синдрома острой дыхательной недостаточности и легочному фиброзу [97]. Недавние исследования свидетельствуют о том, что зараженные вирусом ТОРС мыши, нокаутированные по STAT1, характеризовались более значительным снижением веса и более выраженной патологией в легких, ассоциированной с повышенной продукцией М2-индикаторов, таких как YM1, FIZZ1, IL-4 и IL-13 [76]. Отсутствие выраженного поражения легких у мышей с двойным нокаутом STAT1/STAT6 -/- также поддерживает концепцию о том, что М2 вносят вклад в патогенез ТОРС [51].

Следовательно, вклад поляризации Мф в патогенез вирусной инфекции или изменение противовирусного ответа хозяина изменяется по мере прогрессирования заболевания. Исследователи Herbein и Varin предложили модель, основанную на ретровирусных инфекциях, в ко-

торой фенотипы Мф динамически изменяются во время болезни с М1-фенотипа, доминирующего на ранних стадиях до М2а-профиля, формирующегося во время хронической фазы заболевания, что в конечном итоге приводит к деактивации Мф, в зависимости от того или вирусная инфекция контролируется организмом, или развивается толерантность [35].

Прогрессивная модель поляризации Мф, описанная выше, должна предотвращать большинство вирусных атак. Однако, скорее всего, их большая часть элиминируется еще до того, как вызывает заметный сдвиг в поляризации Мф. В связи с этим наиболее патогенные вирусы включают механизмы, которые направлены на элиминацию Мф, нарушение их функций и правильной последовательности поляризации. Типичная стратегия для большинства высокопатогенных вирусов заключается в активации М1-ассоциированного воспаления, которое не только провоцирует распространение вируса посредством повышенного притока лимфоцитов, но также вызывает массовую гибель зараженных Мф. Эта стратегия была продемонстрирована для ТОРС [104] и пандемичных вирусов гриппа [93]. Было показано, что эти инфекции вызывают гибель около 50% Мф, посредством апоптоза и некроза. Это в основном М1-клетки с высокой противовирусной/воспалительной активностью, но короткой продолжительностью жизни [103]. Вирус-индуцированная массовая гибель клеток приводит к серьезным патологическим последствиям, ассоциированным с поляризацией Мф, даже если зараженный хозяин выжил после перенесенной инфекции: 1) снижение эффективности первой линии противовирусной активности М1 Мф, что в свою очередь способствует репликации вируса, 2) ослабление вторичного противовирусного процесса сигнализирования, вследствие чего нарушается мобилизация моноцитов в место деплеции Мф [104, 105], 3) повреждение тканей, индуцирующее М2-состояние Мф для восстановления до полной элиминации вируса [88] и 4) заражение вирусом чувствительных М2 Мф, которое приводит к формированию персистирующей инфекции [102]. Коротко: эти высокопатогенные вирусы нарушают каскад поляризации Мф, который запрограммирован на противостояние вирусным инфекциям и включает инициацию острого воспаления («цитокинового шторма») и смерть клеток. Продукция провоспалительных цитокинов, характерных для «цитокинового шторма», может привести к чрезмерной активации Мф вместо типичного М1-противовирусного состояния [94].

Заключение

Важное значение макрофагов в поддержании гомеостаза практически всех тканей в организме и их позиция в первой линии защиты в отношении многих патогенов предполагают их ключевую роль как в развитии, так и в разрешении заболевания. Поляризация Мф представляет собой чрезвычайно тонкий и отлаженный процесс, в результате которого могут дифференцироваться крайне разнообразные варианты фенотипов, каждый из которых обладает потенциалом влиять на развитие болезни разными способами. Несмотря на то что разные фенотипы Мф и сам процесс поляризации представляют собой новую и привлекательную терапевтическую мишень

для лечения воспалительных и инфекционных заболеваний, лучшее понимание того, как именно контролируется поляризация и каким образом поляризованные Мф воздействуют на развитие специфических заболеваний, крайне необходимо для того, чтобы в полную силу использовать потенциал этих стратегий.

Таким образом, в данном литературном обзоре мы сфокусировались на биологии, происхождении и характеристике разных фенотипов Мф, а также представили современные данные о роли разных фенотипов Мф в развитии хронических заболеваний легких — бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких и острых заболеваний бактериальной и вирусной природы.

Список литературы / References

1. Никонova А.А., Атауллаханов Р.И., Хаитов Р.М., Хаитов М.Р. Особенности противовирусной активности разных типов человеческих макрофагов // Иммунология, 2016. Т. 37, № 11. С. 300-305. [Nikonova A.A., Ataulakhonov R.I., Khaitov R.M., Khaitov M.R. Antiviral activity of different types of human macrophages. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 1, pp. 300-305. (In Russ.)]
2. Хаитов М.Р., Акимов В.С. Генетическая предрасположенность к развитию бронхиальной астмы и атопии, подходы к идентификации новых генов, ассоциированных с развитием бронхиальной астмы и атопии // Российский аллергологический журнал, 2004. № 3. С. 67-74. [Khaitov M.R., Akimov V.S. Genetic predisposition to the development of bronchial asthma and atopy, approaches to identifying new genes associated with the development of bronchial asthma and atopy. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2004, no. 3, pp. 67-74. (In Russ.)]
3. Царев С.В., Хаитов М.Р. Роль респираторных вирусов при бронхиальной астме // Российский медицинский журнал, 2009. № 2. С. 136-139. [Tsarev S.V., Khaitov M.R. The role of respiratory viruses in bronchial asthma. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*, 2009, no. 2, pp. 136-139. (In Russ.)]
4. Aguzzi A., Barres B.A., Bennett M.L. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science*, 2013, Vol. 339, no. 6116, pp. 156-161.
5. Arnold L., Henry A., Poron F., Baba-Amer Y., van Rooijen N., Plonquet A., Gherardi R.K., Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 5, pp. 1057-1069.
6. Arora S., Hernandez Y., Erb-Downward J.R., McDonald R.A., Toews G.B., Huffnagle G.B. Role of IFN-gamma in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 10, pp. 6346-6356.
7. Auffray C., Fogg D., Garfa M., Elain G., Join-Lambert O., Kayal S., Sarnacki S., Cumano A., Lauvau G., Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, 2007, Vol. 317, no. 5838, pp. 666-670.
8. Barrecheguren M., Esquinas C., Miravittles M. The asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome (ACOS): opportunities and challenges. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2015, Vol. 21, no. 1, pp. 74-79.
9. Bastard J.P., Maachi M., Lagathu C., Kim M.J., Caron M., Vidal H., Capeau J., Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.*, 2006, Vol. 17, no. 1, pp. 4-12.
10. Bazzan E., Turato G., Tinè M., Radu C.M., Balestro E., Rigobello C., Biondini D., Schiavon M., Lunardi F., Baraldo S., Rea F., Simioni P., Calabrese F., Saetta M., Cosio M.G. Dual polarization of human alveolar macrophages progressively increases with smoking and COPD severity. *Respir. Res.*, 2017, Vol. 18, no. 1, p. 40.
11. Becker M., de Bastiani M.A., Parisi M.M., Guma F.T., Markoski M.M., Castro M.A., Kaplan M.H., Barbé-Tuana F.M., Klamt F. Integrated Transcriptomics Establish Macrophage Polarization Signatures and have Potential Applications for Clinical Health and Disease. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, p. 13351.
12. Bedoret D., Wallemacq H., Marichal T., Desmet C., Quesada Calvo F., Henry E., Closset R., Dewals B., Thielen C., Gustin P., de Leval L., van Rooijen N., le Moine A., Vanderplasschen A., Cataldo D., Drion P.V., Moser M., Lekeux P., Bureau F. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J. Clin. Invest.*, 2009, Vol. 119, no. 12, pp. 3723-3738.
13. Benoit M., Desnues B., Mege J.L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 6, pp. 3733-3739.

14. Biswas S.K., Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 10, pp. 889-896.
15. Biswas S.K., Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab.*, 2012, Vol. 15, no. 4, pp. 432-437.
16. Biswas S.K., Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.*, 2009, Vol. 30, no. 10, pp. 475-487.
17. Byers D.E., Holtzman M.J. Alternatively activated macrophages and airway disease. *Chest*, 2011, Vol. 140, no. 3, pp. 768-774.
18. Byrne A.J., Mathie S.A., Gregory L.G., Lloyd C.M. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax*, 2015, Vol. 70, no. 12, pp. 1189-1196.
19. Carlin L.M., Stamatiades E.G., Auffray C., Hanna R.N., Glover L., Vizcay-Barrena G., Hedrick C.C., Cook H.T., Diebold S., Geissmann F. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*, 2013, Vol. 153, no. 2, pp. 362-375.
20. Chávez-Galán L., Ollerios M.L., Vesin D., Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, p. 263.
21. Chupp G.L., Lee C.G., Jarjour N., Shim Y.M., Holm C.T., He S., Dziura J.D., Reed J., Coyle A.J., Kiener P., Cullen M., Grandsaigne M., Dombret M.C., Aubier M., Pretolani M., Elias J.A. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N. Engl. J. Med.*, 2007, Vol. 357, no. 20, pp. 2016-2027.
22. de Nadaï P., Charbonnier A.S., Chenivresse C., Sénéchal S., Fournier C., Gilet J., Vorng H., Chang Y., Gosset P., Wallaert B., Tonnel A.B., Lassalle P., Tsicopoulos A. Involvement of CCL18 in allergic asthma. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 10, pp. 6286-6293.
23. Decramer M., Janssens W., Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 2012, Vol. 379, no. 9823, pp. 1341-1351.
24. den Haan J.M., Kraal G. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J. Innate Immun.*, 2012, Vol. 4, no. 5-6, pp. 437-445.
25. Dong L., Wang S.J., Camoretti-Mercado B., Li H.J., Chen M., Bi W.X. FIZZ1 plays a crucial role in early stage airway remodeling of OVA-induced asthma. *J. Asthma*, 2008, Vol. 45, no. 8, pp. 648-653.
26. Donnelly L.E., Barnes P.J. Defective phagocytosis in airways disease. *Chest*, 2012, Vol. 141, no. 4, pp. 1055-1062.
27. Draijer C., Robbe P., Boorsma C.E., Hylkema M.N., Melgert B.N. Characterization of macrophage phenotypes in three murine models of house-dust-mite-induced asthma. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, p. 632049.
28. Draijer C., Boorsma C.E., Robbe P., Timens W., Hylkema M.N., Ten Hacken N.H., van den Berge M., Postma D.S., Melgert B.N. Human asthma is characterized by more IRF5⁺ M1 and CD206⁺ M2 macrophages and less IL-10⁺ M2-like macrophages around airways compared with healthy airways. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 140, no. 1, pp. 280-283.
29. Durham A.L., Caramori G., Chung K.F., Adcock I.M. Targeted anti-inflammatory therapeutics in asthma and chronic obstructive lung disease. *Transl. Res.*, 2016, Vol. 167, no. 1, pp. 192-203.
30. Fenyo I.M., Gafencu A.V. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology*, 2013, Vol. 218, no. 11, pp. 1376-1384.
31. Fleming B.D., Mosser D.M. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur. J. Immunol.*, 2011, Vol. 41, no. 9, pp. 2498-2502.
32. Fraig M., Shreesha U., Savici D., Katzenstein A.L. Respiratory bronchiolitis: a clinicopathologic study in current smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2002, Vol. 26, no. 5, pp. 647-653.
33. Franks T.J., Chong P.Y., Chui P., Galvin J.R., Lourens R.M., Reid A.H., Selbs E., McEvoy C.P., Hayden C.D., Fukuoka J., Taubenberger J.K., Travis W.D. Lung pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a study of 8 autopsy cases from Singapore. *Hum. Pathol.*, 2003, Vol. 34, no. 8, pp. 743-748.
34. Geissmann F., Jung S., Littman D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 2003, Vol. 19, no. 1, pp. 71-82.
35. Herbein G., Varin A. The macrophage in HIV-1 infection: from activation to deactivation? *Retrovirology*, 2010, Vol. 7, p. 33.
36. Herold S., Steinmueller M., von Wulffen W., Cakarova L., Pinto R., Pleschka S., Mack M., Kuziel W.A., Corazza N., Brunner T., Seeger W., Lohmeyer J. Lung epithelial apoptosis in influenza virus pneumonia: the role of macrophage-expressed TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 13, pp. 3065-3077.
37. Hodge S., Matthews G., Mukaro V., Ahern J., Shivam A., Hodge G., Holmes M., Jersmann H., Reynolds P.N. Cigarette smoke-induced changes to alveolar macrophage phenotype and function are improved by treatment with procysteine. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2011, Vol. 44, no. 5, pp. 673-681.
38. Hogg J.C., Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev. Pathol.*, 2009, Vol. 4, pp. 435-459.

39. Hong J.Y., Chung Y., Steenrod J., Chen Q., Lei J., Comstock A.T., Goldsmith A.M., Bentley J.K., Sajjan U.S., Hershenov M.B. Macrophage activation state determines the response to rhinovirus infection in a mouse model of allergic asthma. *Respir. Res.*, 2014, Vol. 15, p. 63.
40. Hubeau C., Puchelle E., Gaillard D. Distinct pattern of immune cell population in the lung of human fetuses with cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, Vol. 108, no. 4, pp. 524-529.
41. Ingersoll M.A., Spanbroek R., Lottaz C., Gautier E.L., Frankenberger M., Hoffmann R., Lang R., Haniffa M., Collin M., Tacke F., Habenicht A.J., Ziegler-Heitbrock L., Randolph G.J. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 3, pp. e10-9.
42. Italiani P., Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 514.
43. Jackson A.D. Airway goblet-cell mucus secretion. *Trends Pharmacol. Sci*, 2001, Vol. 22, no. 1, pp. 39-45.
44. Jackson D.J., Makrinioti H., Rana B.M., Shamji B.W., Trujillo-Torralbo M.B., Footitt J., Jerico Del-Rosario, Telcian A.G., Nikonova A., Zhu J., Aniscenko J., Gogsadze L., Bakhsoliani E., Traub S., Dhariwal J., Porter J., Hunt D., Hunt T., Stanciu L.A., Khaitov M., Bartlett N.W., Edwards M.R., Kon O.M., Mallia P., Papadopoulos N.G., Akdis C.A., Westwick J., Edwards M.J., Cousins D.J., Walton R.P., Johnston S.L. IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations *in vivo*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2014, Vol. 190, no. 12, pp. 1373-1382.
45. Jenner R.G., Young R.A. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, Vol. 3, no. 4, pp. 281-294.
46. Jiang Z., Zhu L. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. *J. Asthma Allergy*, 2016, Vol. 9, pp. 101-107.
47. Joshi A.D., Oak S.R., Hartigan A.J., Finn W.G., Kunkel S.L., Duffy K.E., Das A., Hogaboam C.M. Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages. *BMC Immunol.*, 2010, Vol. 11, p. 52.
48. Kim H.B. Protein microarray analysis in patients with asthma: elevation of the chemokine PARC/CCL18 in sputum. *Chest*, 2009, Vol. 135, no. 2, pp. 295-302.
49. Kiszewski A.E., Becerril E., Aguilar L.D., Kader I.T., Myers W., Portaels F., Hernández Pando R. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, Vol. 143, no. 3, pp. 445-451.
50. Kurowska-Stolarska M., Stolarski B., Kewin P., Murphy G., Corrigan C.J., Ying S., Pitman N., Mirchandani A., Rana B., van Rooijen N., Shepherd M., McSharry C., McInnes I.B., Xu D., Liew F.Y. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 10, pp. 6469-6477.
51. Labonte A.C., Tosello-Trampont A.C., Hahn Y.S. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Mol. Cells*, 2014, Vol. 37, no. 4, pp. 275-285.
52. Lambrecht B.N., Hammad H. The immunology of asthma. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 1, pp. 45-56.
53. Lin S.L., Castaño A.P., Nowlin B.T., Lupher M.L. Jr, Duffield J.S. Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 10, pp. 6733-6743.
54. Lugo-Villarino G., Vérollet C., Maridonneau-Parini I., Neyrolles O. Macrophage polarization: convergence point targeted by mycobacterium tuberculosis and HIV. *Front. Immunol.*, 2011, Vol. 2, p. 43.
55. Luzina I.G., Papadimitriou J.C., Anderson R., Pochetuhin K., Atamas S.P. Induction of prolonged infiltration of T lymphocytes and transient T lymphocyte-dependent collagen deposition in mouse lungs following adenoviral gene transfer of CCL18. *Arthritis Rheum*, 2006, Vol. 54, no. 8, pp. 2643-2655.
56. MacMicking J., Xie Q.W., Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev. Immunol.*, 1997, Vol. 15, pp. 323-350.
57. Malavia N.K., Mih J.D., Raub C.B., Dinh B.T., George S.C. IL-13 induces a bronchial epithelial phenotype that is profibrotic. *Respir. Res.*, 2008, Vol. 9, p. 27.
58. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, 2002, Vol. 23, no. 11, pp. 549-555.
59. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.*, 2014, Vol. 6, p. 13.
60. Melgert B.N., Oriss T.B., Qi Z., Dixon-McCarthy B., Geerlings M., Hylkema M.N., Ray A. Macrophages: regulators of sex differences in asthma? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2010, Vol. 42, no. 5, pp. 595-603.
61. Melgert B.N., ten Hacken N.H., Rutgers B., Timens W., Postma D.S., Hylkema M.N. More alternative activation of macrophages in lungs of asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 127, no. 3, pp. 831-833.
62. Meyer K.C., Raghu G., Baughman R.P., Brown K.K., Costabel U., du Bois R.M., Drent M., Haslam P.L., Kim D.S., Nagai S., Rottoli P., Saltini C., Selman M., Strange C., Wood B. American Thoracic Society Committee on BAL in Interstitial Lung Disease. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility

of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2012, Vol. 185, no. 9, pp. 1004-1014.

63. Mills C.D., Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. *J. Innate Immun.*, 2014, Vol. 6, no. 6, pp. 716-726.

64. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, no. 12, pp. 6166-6173.

65. Moreira A.P., Hogaboam C.M. Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2011, Vol. 31, no. 6, pp. 485-491.

66. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 12, pp. 958-969.

67. Murray P.J., Wynn T.A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, Vol. 89, no. 4, pp. 557-563.

68. Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 11, pp. 723-307.

69. Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., Fisher E.A., Gilroy D.W., Goerdt S., Gordon S., Hamilton J.A., Ivashkiv L.B., Lawrence T., Locati M., Mantovani A., Martinez F.O., Mege J.L., Mosser D.M., Natoli G., Saeij J.P., Schultze J.L., Shirey K.A., Sica A., Suttles J., Udalova I., van Ginderachter J.A., Vogel S.N., Wynn T.A. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 2014, Vol. 41, no. 1, pp. 14-20.

70. Mylonas K.J., Nair M.G., Prieto-Lafuente L., Paape D., Allen J.E. Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 5, pp. 3084-3094.

71. Nabe T., Wakamori H., Yano C., Nishiguchi A., Yuasa R., Kido H., Tomiyama Y., Tomoda A., Kida H., Takiguchi A., Matsuda M., Ishihara K., Akiba S., Ohya S., Fukui H., Mizutani N., Yoshino S. Production of interleukin (IL)-33 in the lungs during multiple antigen challenge-induced airway inflammation in mice, and its modulation by a glucocorticoid. *Eur. J. Pharmacol.*, 2015, Vol. 757, pp. 34-41.

72. Nagarkar D.R., Bowman E.R., Schneider D., Wang Q., Shim J., Zhao Y., Linn M.J., McHenry C.L., Gosangi B., Bentley J.K., Tsai W.C., Sajjan U.S., Lukacs N.W., Hershenon M.B. Rhinovirus infection of allergen-sensitized and -challenged mice induces eotaxin release from functionally polarized macrophages. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 4, pp. 2525-2535.

73. Nahrendorf M., Swirski F.K., Aikawa E., Stangenberg L., Wurdinger T., Figueiredo J.L., Libby P., Weissleder R., Pittet M.J. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 12, pp. 3037-3047.

74. O'Donnell R., Breen D., Wilson S., Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax*, 2006, Vol. 61, no. 5, pp. 448-454.

75. Ofulue A.F., Ko M. Effects of depletion of neutrophils or macrophages on development of cigarette smoke-induced emphysema. *Am. J. Physiol.*, 1999, Vol. 277, no. 1, Pt 1, pp. L97-105.

76. Page C., Goicochea L., Matthews K., Zhang Y., Klover P., Holtzman M.J., Hennighausen L., Frieman M. Induction of alternatively activated macrophages enhances pathogenesis during severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Virol.*, 2012, Vol. 86, no. 24, pp. 13334-13349.

77. Pesce J.T., Ramalingam T.R., Mentink-Kane M.M., Wilson M.S., El Kasbi K.C., Smith A.M., Thompson R.W., Cheever A.W., Murray P.J., Wynn T.A. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog.*, 2009, Vol. 5, no. 4, e1000371. doi: 10.1371/journal.ppat.1000371.

78. Pope S.M., Fulkerson P.C., Blanchard C., Akei H.S., Nikolaidis N.M., Zimmermann N., Molkentin J.D., Rothenberg M.E. Identification of a cooperative mechanism involving interleukin-13 and eotaxin-2 in experimental allergic lung inflammation. *J. Biol. Chem.*, 2005, Vol. 280, no. 14, pp. 13952-13961.

79. Retamales I., Elliott W.M., Meshi B., Coxson H.O., Pare P.D., Scirba F.C., Rogers R.M., Hayashi S., Hogg J.C. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, Vol. 164, no. 3, pp. 469-473.

80. Robbe P., Draijer C., Borg T.R., Luinge M., Timens W., Wouters I.M., Melgert B.N., Hylkema M.N. Distinct macrophage phenotypes in allergic and nonallergic lung inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2015, Vol. 308, no. 4, pp. L358-67.

81. Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, p. 816460.

82. Sang Y., Miller L.C., Blecha F. Macrophage Polarization in Virus-Host Interactions. *J. Clin. Cell Immunol.*, 2015, Vol. 6, no. 2, pp. 1-23.

83. Satoh T., Takeuchi O., Vandenbon A., Yasuda K., Tanaka Y., Kumagai Y., Miyake T., Matsushita K., Okazaki T., Saitoh T., Honma K., Matsuyama T., Yui K., Tsujimura T., Standley D.M., Nakanishi K., Nakai K., Akira S. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 10, pp. 936-944.

84. Schneberger D., Aharonson-Raz K., Singh B. Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung. *Cell Tissue Res.*, 2011, Vol. 343, no. 1, pp. 97-106.
85. Shaykhiyev R., Krause A., Salit J., Strulovici-Barel Y., Harvey B.G., O'Connor T.P., Crystal R.G. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 4, pp. 2867-2883.
86. Shibata Y., Berclaz P.Y., Chroneos Z.C., Yoshida M., Whitsett J.A., Trapnell B.C. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity*, 2001, Vol. 15, no. 4, pp. 557-567.
87. Shirey K.A., Pletneva L.M., Puche A.C., Keegan A.D., Prince G.A., Blanco J.C., Vogel S.N. Control of RSV-induced lung injury by alternatively activated macrophages is IL-4R alpha-, TLR4-, and IFN-beta-dependent. *Mucosal Immunol.*, 2010, Vol. 3, no. 3, pp. 291-300.
88. Shirey K.A., Lai W., Pletneva L.M., Karp C.L., Divanovic S., Blanco J.C., Vogel S.N. Role of the lipoxigenase pathway in RSV-induced alternatively activated macrophages leading to resolution of lung pathology. *Mucosal Immunol.*, 2014, Vol. 7, no. 3, pp. 549-557.
89. Staples K.J., Hinks T.S., Ward J.A., Gunn V., Smith C., Djukanović R. Phenotypic characterization of lung macrophages in asthmatic patients: overexpression of CCL17. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 130, no. 6, pp. 1404-12.e7.
90. Stein M., Keshav S., Harris N., Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.*, 1992, Vol. 176, no. 1, pp. 287-292.
91. Sun H., Sun Y., Pu J., Zhang Y., Zhu Q., Li J., Gu J., Chang K.C., Liu J. Comparative virus replication and host innate responses in human cells infected with three prevalent clades (2.3.4, 2.3.2, and 7) of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses. *J. Virol.*, 2014, Vol. 88, no. 1, pp. 725-729.
92. Tarique A.A., Logan J., Thomas E., Holt P.G., Sly P.D., Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2015, Vol. 53, no. 5, pp. 676-688.
93. Tate M.D., Pickett D.L., van Rooijen N., Brooks A.G., Reading P.C. Critical role of airway macrophages in modulating disease severity during influenza virus infection of mice. *J. Virol.*, 2010, Vol. 84, no. 15, pp. 7569-7580.
94. Teijaro J.R. Mapping the innate signaling cascade essential for cytokine storm during influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2014, Vol. 111, no. 10, pp. 3799-3804.
95. Tsou C.L., Peters W., Si Y., Slaymaker S., Aslanian A.M., Weisberg S.P., Mack M., Charo I.F. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, no. 4, pp. 902-909.
96. Verreck F.A., de Boer T., Langenberg D.M., Hoeve M.A., Kramer M., Vaisberg E., Kastelein R., Kolk A., de Waal-Malefyt R., Ottenhoff T.H. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2004, Vol. 101, no. 13, pp. 4560-4565.
97. Verreck F.A., de Boer T., Langenberg D.M., van der Zanden L., Ottenhoff T.H. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 79, no. 2, pp. 285-293.
98. Vlahos R., Bozinovski S. Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 435.
99. Welliver R.C., Sr. The immune response to respiratory syncytial virus infection: friend or foe? *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2008, Vol. 34, no. 2, pp. 163-173.
100. Wong C.K., Leung T.F., Chu I.M., Dong J., Lam Y.Y., Lam C.W. Aberrant expression of regulatory cytokine IL-35 and pattern recognition receptor NOD2 in patients with allergic asthma. *Inflammation*, 2015, Vol. 38, no. 1, pp. 348-360.
101. Woodruff P.G., Koth L.L., Yang Y.H., Rodriguez M.W., Favoreto S., Dolganov G.M., Paquet A.C., Erle D.J. A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2005, Vol. 172, no. 11, pp. 1383-1392.
102. Xu F., Kang Y., Zhang H., Piao Z., Yin H., Diao R., Xia J., Shi L. Akt1-mediated regulation of macrophage polarization in a murine model of Staphylococcus aureus pulmonary infection. *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 208, no. 3, pp. 528-538.
103. Yona S., Kim K.W., Wolf Y., Mildner A., Varol D., Breker M., Strauss-Ayali D., Viukov S., Guillemins M., Misharin A., Hume D.A., Perlman H., Malissen B., Zelzer E., Jung S. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 1, pp. 79-91.
104. Zhao J., van Rooijen N., Perlman S. Evasion by stealth: inefficient immune activation underlies poor T cell response and severe disease in SARS-CoV-infected mice. *PLoS Pathog.*, 2009, Vol. 5, no. 10, e1000636. doi: 10.1371/journal.ppat.1000636.

105. Zhao X., Dai J., Xiao X., Wu L., Zeng J., Sheng J., Su J., Chen X., Wang G., Li K. PI3K/Akt signaling pathway modulates influenza virus induced mouse alveolar macrophage polarization to M1/M2b. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 8, e104506. doi: 10.1371/journal.pone.0104506.

106. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 16, pp. e74-80.

Авторы:

Никонова А.А. — к.б.н., заведующая лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

Хайтов М.Р. — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, исполняющий обязанности директора ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

Хайтов Р.М. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

Authors:

Nikonova A.A., PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Biotechnology, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; NRC Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation

Khaitov M.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Acting Director, Institute of Immunology, NRC Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation

Khaitov R.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, NRC Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation

Поступила 27.07.2017

Отправлена на доработку 22.09.2017

Принята к печати 29.09.2017

Received 27.07.2017

Revision received 22.09.2017

Accepted 29.09.2017

МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА

Матвеева Л.В.

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»,
г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Резюме. Развитию и хронизации воспалительного процесса в слизистой оболочке желудка может способствовать персистенция в организме ряда микроорганизмов — *Helicobacter (H.) pylori*, *Staphylococcus (S.) aureus*, *Candida species (spp.)*, *Herpesvirus* и других. Многими авторами признана важная роль Т-хелперов (Th) 1 типа и регуляторных Т-клеток в гастритическом процессе, значение цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) до сих пор уточняется. В данном обзоре представлен анализ имеющихся научных сведений об индукционных механизмах клеточной цитотоксичности при воспалительном процессе в слизистой желудка. Бактерии в зависимости от плотности популяции способны регулировать экспрессию генов, кодирующих синтез белковых факторов вирулентности, ускоряя адаптацию к меняющимся условиям среды. При рецепторном распознавании характерных для микроорганизмов структур — патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs) и сигналов опасности, поврежденных при стрессе или под влиянием инфекта клеточных структур (DAMPs), активируются транскрипционные факторы, что приводит к продукции ранних провоспалительных интерлейкинов (IL), интерферонов (IFN) I типа и индукции иммунных реакций. Показано, что антигены *H. pylori* и *Candida spp.* способствуют инфильтрации слизистой желудка активированными CD8⁺ ЦТЛ, а герпесвирусы индуцируют значимое увеличение количества перфорин-позитивных (Pr⁺) CD8⁺ и CD16⁺ клеток, изменение фенотипа CD4⁺ лимфоцитов с приобретением прямой цитолитической активности.

Ключевые слова: Т-лимфоцит, клеточная цитотоксичность, интерлейкин, интерферон, *Helicobacter pylori*, герпесвирус, *Candida*

MECHANISMS OF CELLULAR CYTOTOXICITY INDUCTION IN GASTRIC MUCOSAL INFLAMMATION

Matveeva L.V.

National Research State University of Mordovia, Saransk, Russian Federation

Abstract. Development and chronicity of inflammatory process in gastric mucosa may contribute to persistence of a number of microorganisms — *Helicobacter (H.) pylori*, *Staphylococcus (S.) aureus*, *Candida species (spp.)*, *Herpesvirus* and others in the host organism. Many authors have recognized an important role of T helper (Th) type 1 and regulatory T cells in evolvement of gastritis, whereas importance of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) is still to be confirmed. This review presents analysis of available scientific data about

Адрес для переписки:

Матвеева Любовь Васильевна
Медицинский институт ФГБОУ ВО «Национальный
исследовательский Мордовский государственный
университет им. Н.П. Огарёва»
430032, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск,
ул. Ульянова, 26а.
Тел.: 8 (8342) 35-25-16.
Факс: 8 (8342) 32-19-83.
E-mail: MatveevaLjubov1@mail.ru

Address for correspondence:

Matveeva Lyubov V.
Medical Institute, National Research State University
of Mordovia
430032, Russian Federation, Republic of Mordovia, Saransk,
Ulyanov str., 26a.
Phone: 7 (8342) 35-25-16.
Fax: 7 (8342) 32-19-83.
E-mail: MatveevaLjubov1@mail.ru

Образец цитирования:

Л.В. Матвеева «Механизмы индукции клеточной
цитотоксичности при воспалительном процессе
в слизистой оболочке желудка» // Медицинская
иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 673–682.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-673-682
© Матвеева Л.В., 2017

For citation:

L.V. Matveeva “Mechanisms of cellular cytotoxicity induction
in gastric mucosal inflammation”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017,
Vol. 19, no. 6, pp. 673–682.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-673-682
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-673-682

induction mechanisms of cellular cytotoxicity in inflammatory process affecting gastric mucosa. Bacterial populations, depending on their density, are able to regulate expression of genes encoding synthesis of protein virulence factors, thus accelerating adaptation for changing environmental conditions. Upon receptor-mediated recognition of characteristic microbial structures, i.e., pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and danger signals altered by stress, or cellular structures damaged by infectious pathogens (DAMPs), transcription factors are activated, thus leading to production of early pro-inflammatory interleukins (IL), interferons (IFN) type I and induction of immune responses. It is shown that the antigens of *H. pylori* and *Candida spp.* promote infiltration of mucosa gastric by activated CD8⁺CTLs, and *Herpesvirus* induce a significant increase in the number of perforin-positive (Pr⁺) CD8⁺ and CD16⁺ cells, phenotypic changes in CD4⁺lymphocytes, with acquisition of direct cytolytic activity.

Keywords: *T lymphocytes, cell cytotoxicity, interleukin, interferon, Helicobacter pylori, Herpesvirus, Candida*

Введение

Развитию воспалительного процесса в слизистой оболочке желудка (СОЖ) может способствовать персистенция в организме человека некоторых микроорганизмов, нарушающих баланс нормомикробиоценоза, иммуноцитокинную регуляцию и трофику тканей.

Согласно научным источникам [29, 34, 52, 68], в неизменной СОЖ наиболее распространены стрептококки, микрококки, вейлонеллы, актиномицеты, фузобактерии, нейссерии и др.

По данным ряда авторов [3, 28, 29], при обострении хронического гастрита в биоптате СОЖ преобладают стрептококки, стафилококки, *H. pylori*, *Escherichia coli* (*E. coli*), грибы рода *Candida*. Выявлено [29], что наличие *H. pylori* в СОЖ в условиях дисбиоза способствует появлению и/или увеличению количества условно патогенных *S. aureus*, стрептококков, грибов рода *Candida* и снижению уровня лактобацилл. Имеются исследования [62], которые выявили в микромицетах гены, специфические для *H. pylori*, и позволили рассматривать дрожжеподобные грибы в качестве их переносчиков [25].

Полученные собственные результаты согласуются с имеющимися научными данными. При нарастании стадии атрофии СОЖ происходит снижение частоты высеваемости актиномицетов, кишечной палочки с нормальной сахаролитической активностью, *H. pylori*, нейссерий, *S. epidermidis* — с сохранением повышенной встречаемости, увеличение высеваемости *Candida spp.*, *S. aureus*, стрептококков. То есть развитие и усиление дисбиотических изменений сопровождается увеличением распространенности и выраженности атрофического процесса в СОЖ на фоне активного воспаления [14, 18], что может способствовать мета- и дисплазии желудочного эпителия [9].

Рядом исследований [7, 19] установлено, что микст-инфекция *H. pylori* и представителей семейства *Herpesviridae* приводит к прогрессирующей деструкции СОЖ, создавая благоприятные условия для длительной персистенции других патогенных микроорганизмов.

Герпесвирусы могут оказывать цитопатическое действие на эпителиоциты ротоглотки, протоков

слюнных желез, желудочно-кишечного тракта, эндотелиоциты сосудов, CD3⁺, CD16⁺ лимфоциты, нейтрофилы, макрофаги, В-лимфоциты [2, 10]. Известны случаи острого гастрита, ассоциированного с инфекцией вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ) [4, 23]. По данным Г.В. Волюнец [4], у пациентов, имеющих ДНК ВЭБ в СОЖ, в 88,6% случаев диагностируется аутоиммунный гастрит. В исследовании А. Schetter и соавт. [61] выявлена ассоциация уровня антител к ядерному и капсидному антигенам ВЭБ с течением хронического атрофического гастрита, кишечной метаплазией и дисплазией. Т.В. Авдеенко и соавт. [1] при заболеваниях желудка отмечали наличие антител к антигенам ВЭБ во всех случаях полной кишечной метаплазии и дисплазии 2-3 степени.

Таким образом, изменения нормобиоценоза желудка сопровождаются прямыми и опосредованным повреждением клеток организма, развитием и хронизацией воспалительного процесса.

Многими авторами [15, 17, 22, 41, 49, 50, 60] признана важная роль Th1-типа и регуляторных Т-клеток в гастритическом процессе, значение ЦТЛ до сих пор уточняется.

Целью данного обзора стал анализ имеющихся научных сведений об индукционных механизмах клеточной цитотоксичности при воспалительном процессе в СОЖ с определением их патогенетической роли.

Распознавание молекулярных паттернов микробиоты желудка

Интересными представляются научные данные [27] о химической коммуникации у бактерий — Quorum Sensing (QS) — регуляции экспрессии генов бактерий, зависящей от плотности их популяции. Системы QS включают низкомолекулярные сигнальные молекулы, легко диффундирующие через клеточную стенку — аутоиндукторы (AI), и связывающиеся с ними регуляторные белки. При увеличении популяции бактерий AI накапливаются до порогового значения и взаимодействуют с регуляторными белками, что приводит к резкой индукции экспрессии определенных генов и способствует быстрой адаптации популяции к меняющимся условиям среды.

У грамотрицательных бактерий, в том числе *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, имеются QS системы, функционирующие с участием AI

N-ацил-гомосеринлактонов (АНЛ или AI-1). АНЛ взаимодействуют с регуляторными белками, содержащими 2 домена, способными связываться с AI и ДНК, функционируя как активатор транскрипции [27].

У грамположительных бактерий (*S. aureus*) при контроле вирулентности используются секретрируемые пептиды (AIP): линейные пептиды и пептиды с тиолактонным кольцом, распознаваемые специфическими рецепторами — сенсорными гистидин-киназами. Сенсорная киназа фосфорилируется, после чего фосфорильная группа переносится на белок-регулятор ответа, который связывается с ДНК и активирует транскрипцию гена-мишени. Так, стафилококки при низкой плотности популяции продуцируют белковые факторы, способствующие их адгезии и колонизации, при высокой плотности популяции — репрессируют синтез этих факторов, секретируют протеазы и токсины, что регулируется Agr QS системой (AIP и agrBDCA-оперон). У *S. aureus* функционирует и другая QS система — рибосомальный белок L2 (RAP) и цитоплазматический транскрипционный фактор (TRAP). Белок RAP стимулирует активацию РНК (RNA) TRAP в фосфорилированном состоянии. Вирулентность стафилококка может угнетаться RNA III inhibiting peptide (RIP) путем ингибирования фосфорилирования TRAP, как следствие синтеза РНК III, что приводит к подавлению синтеза токсинов [27].

По данным Е.И. Ивановой и соавт. [8], наибольший адгезивный потенциал по отношению к слизистым оболочкам проявляют грамотрицательные бактерии *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* и *E. coli*, что, вероятно, связано с наличием фимбриальных структур. При сравнении адгезивной активности разных видов стафилококков установлено, что *S. aureus* характеризуется более высокой скоростью адгезивного процесса. В единичных случаях наблюдалось резкое уменьшение адгезивной скорости *S. aureus* на фоне ассоциации с грибами рода *Candida*, что могло быть обусловлено конкуренцией за адгезируемый субстрат.

Известно [5, 30, 55], что при проникновении микроорганизма и рецепторном распознавании характерных для него структур — патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs), и сигналов опасности поврежденных при стрессе или под влиянием инфекта клеточных структур (DAMPs) происходит передача внутриклеточных сигналов от рецепторов к транскрипционным факторам с активацией конкретных генов. Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptor, TLR) специфичны к молекулярным паттернам определенных микроорганизмов: TLR1, TLR2, TLR6 — к PAMPs грамположительных бактерий, грибов, TLR4, TLR5 — к PAMPs грамотрицательных бактерий, TLR3, TLR7, TLR8 — к дву- и односпи-

ральной РНК вирусов, TLR9 — к участкам ДНК с неметилированными последовательностями цитидин-фосфат гуанозина (CpG), характерными для бактерий и вирусов. С-лектиновые рецепторы миелоидных клеток (маннозный, DC-SIGN, дектин-1, дектин-2) специфичны к маннозе, фукозе, глюкозе, N-ацетилглюкозамину бактерий, β -глюкану грибов и обеспечивают их поглощение [30, 44, 55]. Рецепторы-мусорщики (Scavenger receptor (SR)-1, SR-2) распознают липопротеины, липотейхоевые кислоты стафилококков, липополисахарид (ЛПС) нейссерий, NOD (nucleotide binding oligomerization domain)-like receptor (NLRC1, NLRC2) — пептидогликаны, NLRP3 — АТФ, ЛПС, поступившие в цитозоль после фагоцитоза и расщепления микроорганизмов. В цитозоле могут присутствовать рецепторы — RIG (retinoic acid inducible gene I)-like receptors (RLR) — RIG-I и melanoma-differentiation-associated proteins 5 (MDA5), распознающие вирусные и бактериальные РНК [30, 45, 55]. Мембранные и внутриклеточные рецепторы, участвующие в распознавании молекулярных паттернов микроорганизмов желудка, отражены в таблицах 1 и 2.

DAMPs — белки теплового шока (heat shock proteins (HSP) 22, 60, 70, 72, гликопротеин 96), амфотерин (high-mobility group proteins B1, HMGB1), протеогликан, РНК, рибонуклеопротеин, ДНК — могут повышать биологическую активность PAMPs, в частности ЛПС, способствуют рецепторному распознаванию нуклеиновых кислот вирусов, бактерий [30, 44, 59].

Итогом распознавания PAMPs и DAMPs рецепторным аппаратом клеток, активации транскрипционных факторов является продукция ранних провоспалительных IL, TNF α , IFN I типа, молекул адгезии, металлопротеиназ, циклооксигеназы-2, индуцибельной NO-синтазы [30, 44, 45, 55, 59] и, как следствие, индукция хемотаксиса нейтрофилов, а затем и моноцитов, лимфоцитов в очаг гастритического процесса.

Установлено, что *S. aureus* способен специфически связываться с ингибирующим рецептором PIR-B (paired immunoglobulin-like receptor B) и подавлять воспалительный ответ, опосредованный TLR. Наоборот, у PIR-B-дефицитных макрофагов при адгезии стафилококков развивается сильная провоспалительная реакция [5]. У *S. aureus* имеется ряд механизмов ускользания от иммунного распознавания: нейтрализация компонентов системы комплемента (C1q, C3b и др.); блокада хемотаксиса нейтрофилов путем связывания ингибирующим белком рецепторов к C5a и формилпептиду; конвертация плазминогена в плазмин под действием стафилокиназы, приводящая к разрушению IgG и C3b на поверхности бактерий и блокаде опсонизации фагоцитов. В свою очередь, протеин А *S. aureus*, связываясь с рецептором к туморнекротизирующему

ТАБЛИЦА 1. МЕМБРАННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, РАСПОЗНАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПАТТЕРНЫ МИКРООРГАНИЗМОВ ЖЕЛУДКА [30, 44, 55]

TABLE 1. MEMBRANE RECEPTORS, RECOGNITIZING MOLECULAR PATTERNS OF GASTRIC MICROORGANISMS [30, 44, 55]

Рецептор Receptor	PAMPs	Сигнальный путь Signalling Pathway
TLR1 + TLR2	Триацил-липопротеины, пептидогликан, тейхоевые и липотейхоевые кислоты, порин, зимозан Triacylated lipoproteins, peptidoglycan (PGN), teichoic and lipoteichoic acid, porin, zimosan	TIRAP-MyD88-TRAF6-IKK α / β -NF- κ B*
TLR2 + TLR6	Диацил-липопротеины, пептидогликан, тейхоевые и липотейхоевые кислоты, порин, зимозан Diacylated lipoproteins, PGN, teichoic and lipoteichoic acid, porin, zimosan	TIRAP-MyD88-TRAF6-IKK α / β -NF- κ B
TLR3	Двуспиральная РНК Doublestranded (ds) RNA	TRIF-TRAF3-TBK1/IKK ϵ -IRF3 TRIF-RIP1-IKK α / β -NF- κ B**
TLR4	Липополисахарид (ЛПС), липотейхоевые кислоты, пили Lipopolysaccharide (LPS), lipoteichoic acid, pili	TIRAP/MyD88/TRIF/TRAM-TRAF3/6-TBK1/IKK α / β -IRF3/NF- κ B***
TLR5	Флагеллин Flagellin	MyD88-TRAF6-IKK α / β -NF- κ B
TLR7, TLR8	Односпиральная РНК вируса Singlestranded RNA viruses	MyD88-IRAK-TRAF6-IKK α -IRF7**** MyD88-IRAK-TRAF6-IKK α / β -NF- κ B
TLR9	ДНК с неметилованными CpG-тандемами Unmethylated CpG-rich DNA	MyD88-IRAK-TRAF6-IKK α -IRF7 MyD88-IRAK-TRAF6-IKK α / β -NF- κ B
Маннозный Mannoses	Манноза, глюкоза, N-ацетилглюкозамин Mannosa, glukosa, N-acetylglucosamine	FcR γ -Syk-PLC γ -CARD9-IKK α / β -NF- κ B FcR γ -Syk-PLC γ -Calcineurin-NFAT*****
DC-SIGN	Манноза, фукоза Mannose, fucose	LSP1-Ras/Raf-1-NF- κ B*****
Дектин-1 Dectin-1	β-глюкан β -Glucan	Syk-PLC γ -CARD9-IKK α / β -NF- κ B Syk-PLC γ -Calcineurin-NFAT
Дектин-2 Dectin-2	Манноза, α-маннан Mannose, α -mannan	FcR γ -Syk-PLC γ -CARD9-IKK α / β -NF- κ B FcR γ -Syk-PLC γ -Calcineurin-NFAT
SR-1, SR-2	Липопептиды, ЛПС, липотейхоевые кислоты Lipopeptides, LPS, lipoteichoic acid	MyD88-TRAF6-IKK α / β -NF- κ B

Примечание. * TIRAP – TIR-доменсодержащий адаптерный протеин, MyD88 – белок-88 миелоидной дифференцировки первичного генного ответа, TRAF – TNF рецептор-ассоциированный фактор, IKK – I κ B киназа, ** TRIF – TIR-доменсодержащий адаптерный белок, индуцирующий интерферон- β , TBK1 – TANK (член TRAF семейства, ассоциированный с NF- κ B активатором)-связывающая киназа 1, IRF – интерферон-регулирующий фактор, RIP – взаимодействующий с рецептором белок, *** TRAM – TRIF-связанная адаптерная молекула

Note. * TIRAP – TIR domain-containing adapter protein, MyD88 – myeloid differentiation primary response protein 88, TRAF – TNF receptor-associated factor, IKK – I κ B kinase protein kinases;

** TRIF – TIR domaincontaining adaptor proteininducing IFN β , TBK1 – TANK (TRAF Family Member Associated NF- κ B Activator) – binding kinase 1, IRF – IFN regulatory factors, RIP – receptor-interacting serine/threonine-protein kinase;

*** TRAM – TRIF related adaptor molecule, **** IRAK – interleukin-1 receptor-associated kinase;

***** Syk – spleen tyrosine kinase, PLC γ – phospholipase C γ , CARD – Caspase activation and recruitment domains, NFAT – Nuclear factor of activated T-cells;

***** LSP1 – Lymphocyte-specific protein 1, Raf – Rapidly Accelerated Fibrosarcoma.

фактору- α (TNF α) – TNFR1, расположенным на эпителии слизистой оболочки, индуцирует хемокиновый и цитокиновый каскады, что способствует развитию и усилению воспалительного процесса [5].

Индукция клеточной цитотоксичности бактериями желудка

Хронический гастрит часто ассоциирован с инфекцией *H. pylori* и характеризуется инфиль-

трацией тканей нейтрофилами, плазматическими клетками, лимфоцитами, что обусловлено секрецией биологически активных веществ: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF α , IFN α , IFN γ , моноцитарного хемотаксического протеина (MCP) [12, 24]. В частности, MCP-1 является хемоаттрактантом не только для моноцитов, но и для активированных Т-лимфоцитов, дендритных клеток, естественных киллеров, мастоцитов [26].

ТАБЛИЦА 2. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, РАСПОЗНАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПАТТЕРНЫ МИКРООРГАНИЗМОВ ЖЕЛУДКА [30, 44, 55]

TABLE 2. INTRACELLULAR RECEPTORS, RECOGNIZING MOLECULAR PATTERNS OF GASTRIC MICROORGANISMS [30, 44, 55]

Рецептор Receptor	PAMPs	Сигнальный путь Signalling Pathway
NLRC1	Мезодиаминопимелиновая кислота мурамилдипептида Muramildipeptide (mesodiaminopimelic acid)	RIP2-IKK α / β -NF- κ B
NLRC2	Мурамилдипептид Muramildipeptide	RIP2-IKK α / β -NF- κ B CARD9-MAPK/ERK-AP1*
NLRP3	аденозинтрифосфат, ЛПС Adenosine triphosphate, LPS	ASC-Caspase-1-IL-1 β , IL-18**
RIG-1	Двуспиральная РНК, односпиральная РНК dsRNA, ssRNA	TRIF-TRAF3-TBK1-IRF3 IPS1-TBK1/IKKi-IRF3/7***
MDA5	Двуспиральная РНК, односпиральная РНК dsRNA, ssRNA	TRIF-TRAF3-TBK1-IRF3 IPS1-TBK1/IKKi-IRF3/7
DAI	Двуспиральная ДНК dsDNA	STING-TBK1-IRF3**** STING-TRAF6-TBK1/IKK α / β -NF- κ B

Примечание. * MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы, ERK – внеклеточная сигнал-регулирующая киназа, AP-1 – активирующий протеин-1, ** ASC – апоптоз-ассоциированный Спекс-подобный белок, содержащий CARD, *** IPS-1 – IFN β промотора стимулятор 1, **** DAI – ДНК-зависимый активатор интерферон-регуляторных факторов, STING – стимулятор генов интерферона.

Note. * MAPK – mitogen-activated protein kinases, ERK – extracellular signal-regulated kinase, AP-1 – activating protein-1;

** ASC – apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD;

*** IPS-1 – IFN β promoter stimulator 1;

**** DAI – DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors, STING – Stimulator of Interferon Genes.

В исследованиях F. Backhed и соавт. [33] выявлено, что эпителиоциты антрального отдела желудка экспрессируют TLR2, TLR3, TLR5, но не TLR4, что лимитирует распознавание ЛПС клеточной стенки грамотрицательных бактерий, в частности *H. pylori*, и может являться механизмом ограничения воспалительного процесса. В то же время TLR4 определялись в тканевых культурах желудка, но не отвечали на стимуляцию ЛПС. Отмечается [33], что *H. pylori*-инфицированные клетки желудка секретируют IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , инициируя активацию клеток врожденного и адаптивного иммунитета, при этом продукция IL-1 β в 4 раза превышает уровень IL-8, резко снижающийся в течение суток после инфицирования. Уменьшение индуцированной *H. pylori* повышенной секреции IL-8 может быть обусловлено как терминальной дифференцировкой эпителиоцитов, так и модуляцией иммунного ответа путем продукции противовоспалительных факторов, способствуя хронизации воспалительного процесса.

Имеются данные [43], что цитотоксин-ассоциированный протеин (CagA) *H. pylori* может активировать ядерный транскрипционный фактор κ B (NF- κ B), приводя к секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов. В исследованиях, проведенных M. Kido, N. Watanabe на мышах, было показано [46], что CagA⁺ штаммы *H. pylori* вызывают преимущественное повышение CD4⁺ лимфоцитов в очаге воспаления. Более того, считается [57], что инфицирование *H. pylori* запускает Th1-путь клеточного иммунного ответа. Также

известно [47], что, благодаря системе секреции IV типа, *H. pylori* может вводить непосредственно в цитозоль вакуолизирующий токсин (VacA) и CagA, которые при протеосомальной деградации запускают цитотоксические реакции. Позднее B. Kronsteiner и соавт. [49] обнаружили при инфицировании свиней *H. pylori* индукцию Th1-ответа с последующей активацией ЦТЛ в виде выраженной экспансии CD8⁺Tbet⁺ клеток, коррелирующей с повышенной секрецией IFN γ , накоплением гранзимов A, B, перфорина, экспрессией CD16. Кроме того, по данным J. Azem и соавт. [32], у инфицированных *H. pylori* лиц относительно неинфицированных в ответ на субъединицу В уреазы, хеликобактерный липопротеин (HpaA), презентируемые В-лимфоцитами и дендритными клетками, отмечалась значимо большая пролиферация CD8⁺ клеток памяти. В свою очередь, связывание HpaA с TLR2 NK-клеток способствует индукции секреции IFN γ [53].

По данным T. Fukui и соавт. [41], у инфицированных хеликобактериями мышей, дефицитных по антигенам главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II, с CD4⁺Т-лимфоцитопенией развиваются тяжелые гастриты с выраженной инфильтрацией CD8⁺ клетками при отсутствии FoxP3⁺ клеток, увеличением экспрессии генов IL-1 β и Fas-лиганда, низким сывороточным уровнем антихеликобактерных антител.

N. Ohtani и соавт. [58] выявлено, что лимфоциты в воспаленной СОЖ экспрессируют обильно CCR5, реже CXCR3 и редко CCR4, численность

CCR5⁺ клеток, к которым относятся в основном CD8⁺ и частично CD4⁺Т-клетки, положительно коррелирует со степенью нейтрофильной инфильтрации и уменьшается в участках СОЖ с кишечной метаплазией или атрофией. RANTES/CCL5 (лиганд CCR5) был в основном локализован в CD8⁺ и частично в CD4⁺Т-клетках, которые распределялись наиболее плотно вокруг шейки желудочных желез, гибридизация *in situ* подтвердила экспрессию мРНК CCL5 в этих клетках. При иммуноэлектронной микроскопии определена локализация CCL5 в ЦТЛ – в мембраносвязанных гранулах с перфорином. Полученные N. Ohtani и соавт. [58] данные свидетельствуют о том, что наряду с нейтрофилами важную роль в активном воспалительном процессе в СОЖ играют CCL5⁺Т-клетки, в основном активированные ЦТЛ, накоплению их в ткани способствует механизм самостоятельного рекрутинга с участием CCR5 и CCL5.

Индукция клеточной цитотоксичности грибами рода *Candida*

Белковые антигены грибов рода *Candida* относят к полноценным Т-зависимым, активным стимуляторам клеточного иммунитета [15].

Имеется несколько путей разрушения грибов рода *Candida*: 1) прямое распознавание белков теплового шока и других антигенов и уничтожение грибов CD8⁺ ЦТЛ [22, 35]; 2) цитолиз инфицированных грибами клеток CD8⁺ ЦТЛ, распознающими на поверхности клеток-мишеней антигены грибов в комплексе с антигенами МНС I типа; 3) активация макрофагов Th1-типа при участии IL-2, IFN γ , что усиливает гибель грибов в фаголизосомах макрофагов [22, 60].

IL-12 при кандидозе направляет дифференцировку наивных CD4⁺ лимфоцитов в сторону Th1-типа, стимулирует функциональное созревание CD8⁺ ЦТЛ и выработку IFN γ [15].

По данным Т.Г. Маланичевой и соавт. [16], у больных с хроническими заболеваниями гастродуоденальной зоны, ассоциированными с грибами рода *Candida*, наблюдается прямая корреляция между сывороточной концентрацией циркулирующего кандидозного антигена и экспрессией CD11b⁺ на нейтрофилах, количеством CD25⁺, HLADR⁺ лимфоцитов, обратная взаимосвязь с численностью CD4⁺ клеток. Повышенная экспрессия молекул адгезии на нейтрофилах способствует миграции и взаимодействию иммунокомпетентных клеток в месте инвазии грибов, что подтверждается увеличением экспрессии ранних и поздних маркеров активации на Т-лимфоцитах [16].

Индукция клеточной цитотоксичности герпес-вирусами

Ранее [6] у больных с герпесвирусными инфекциями (ГИ) было выявлено высокое содержание CD3⁺ лимфоцитов и значимое повышение относительного числа CD3⁺/CD25⁺, CD4⁺, CD16⁺/

CD56⁺ клеток, уменьшение CD3⁺/CD95⁺ клеток по сравнению со здоровыми лицами, количество CD8⁺ ЦТЛ не отличалось от показателей здоровых лиц. Полученные авторами данные могли быть обусловлены высоким уровнем репликации вируса. При сочетанном инфицировании вирусом простого герпеса (ВПГ)-1/2 с цитомегаловирусом (ЦМВ) определялось значимое повышение числа CD3⁺/CD25⁺ и CD4⁺ клеток, большее, чем при сочетании ВПГ-1/2 с ВЭБ, когда наблюдалось резкое снижение CD3⁺/CD95⁺ клеток, что свидетельствовало о нарушении процессов индукции апоптоза лимфоцитов в условиях выраженной стимуляции герпесвирусами.

Известно, что одним из ключевых механизмов реализации цитотоксической функции лимфоцитов является экзоцитоз литических гранул, содержащих перфорин и гранзимы, при этом количество перфорин-позитивных (Pr⁺) клеток может существенно меняться [42, 54]. Установлено [11], что у пациентов с умеренной частотой рецидивов ГИ суммарное содержание CD8⁺ и CD16⁺ лимфоцитов было достоверно выше, чем у здоровых лиц и пациентов с частыми рецидивами заболевания, количество Pr⁺ клеток было выше, чем у пациентов с частыми рецидивами, но не отличалось от показателя здоровых лиц. В свою очередь, у пациентов с высокой частотой рецидивов ГИ суммарное содержание CD8⁺ и CD16⁺ лимфоцитов, количество Pr⁺ лимфоцитов были ниже, чем у здоровых лиц. Применение антигена ВПГ в качестве стимулятора моноцитов у пациентов с ГИ способно индуцировать значимое увеличение количества Pr⁺ лимфоцитов, что подтверждает важную роль активации ЦТЛ моноцитарно-макрофагальными клетками [56].

Установлено [20, 31, 37], что у части здоровых доноров в крови циркулирует минорная субпопуляция CD4⁺Т-клеток – CD4⁺ ЦТЛ, которые содержат гранулы с цитотоксическими белками, способны к дегрануляции и цитолизу клетки-мишени. Характерными чертами CD4⁺ ЦТЛ являются утрата экспрессии костимуляторной молекулы CD28 и появление маркера терминальной дифференцировки CD57, ассоциированного с наступлением клеточной старости [36, 64], а также с накоплением перфорина, гранзимов, гранулизины в цитоплазматических гранулах [13, 38, 51].

Показано, что фактор транскрипции ZBTB7B экспрессируется в CD4⁺Т-клетках [63] и подавляет в них экспрессию генов, характерных для CD8⁺ клеток (CD8, перфорин, гранзим В) [65, 66]. У мышей с гипофункцией ZBTB7B или с его избирательным нокаутом в CD4⁺Т-клетках происходит RUNX3-зависимая реактивация экспрессии CD8-ассоциированных генов [65]. Кроме того, RUNX3 совместно с фактором транскрипции эомезодермином (EOMES) контролирует дифференцировку наивных CD8⁺Т-клеток в эф-

факторные ЦТЛ [39, 67]. В работах М.В. Пашенкова, Б.В. Пинегина [21] установлено, что в CD4⁺ ЦТЛ экспрессия мРНК RUNX3, EOMES была выше, а ZBTB7B ниже, чем в обычных CD4⁺Т-клетках. Таким образом, закономерно предположение, что накопление перфорина и гранзима В в CD4⁺ ЦТЛ обусловлено повышением экспрессии RUNX3 и EOMES [21].

Выявлена связь между повышенным содержанием CD4⁺ ЦТЛ и наличием латентной инфекции ЦМВ [31, 37, 40, 64]. Установлено [37], что при стимуляции ЦМВ CD4⁺Т-клетки реагируют на эпителий вируса pp65, рестриктивный молекулами МНС класса II, и изменяют свои свойства: одновременно продуцируют макрофагальный воспалительный белок-1β (MIP-1β), TNFα, IFNγ при низком синтезе IL-2, появляется прямая цитолитическая активность, связанная с поверхностной мобилизацией CD107a, внутриклеточной экспрессией перфорина и гранзимов, способностью к дегрануляции. Таким образом, зрелые ЦМВ-специфические CD4⁺CD27⁺Т-клетки по функциональной активности напоминают противовирусные CD8⁺Т-клетки.

Заключение

Бактерии способны регулировать экспрессию генов, кодирующих синтез белковых факторов вирулентности: при низкой плотности популяции продуцируют факторы адгезии и колонизации, при высокой численности секретируют ферменты инвазии, агрессии и токсины, уско-

ря адаптацию к меняющимся условиям среды и иммунную эвазию. Изменения состава мукозальной нормобиоты желудка инициируют распознавание PAMPs и DAMPs специфическими рецепторами клеток СОЖ, активацию адаптерных белков, киназ и транскрипционных факторов, приводя к продукции ранних провоспалительных цитокинов и индукции воспалительного процесса, поглощению и киллингу микроорганизмов фагоцитами с презентацией антигенов лимфоцитам. Эндосомальная и протеосомальная деградация бактерий, грибов, вирусов индуцирует Th1-ответ и активацию CD8⁺, CD16⁺ лимфоцитов соответственно. Показано, что антигены *H. pylori* и *Candida spp.* способствуют инфильтрации слизистой желудка активированными CD8⁺ ЦТЛ, а герпесвирусы индуцируют значимое увеличение количества перфорин-позитивных (Pr⁺) CD8⁺ и CD16⁺ клеток, изменение фенотипа CD4⁺ лимфоцитов с приобретением прямой цитолитической активности.

Таким образом, изменения нормомикробиоты желудка инициируют реакции врожденного и адаптивного иммунитета, направленные на уничтожение патогенов путем развития, а затем рестрикции воспалительного процесса, хронизации которого способствует иммунная эвазия микроорганизмов, что сопровождается повышением клеточной цитотоксичности лимфоцитов, увеличением распространенности и выраженности атрофического процесса в слизистой оболочке желудка.

Список литературы / References

1. Авдеенко Т.В., Вусик М.В., Уразова Л.Н., Евтушенко В.А., Матвиенко О.А. Роль вируса Эпштейна-Барр в формировании групп повышенного онкологического риска среди пациентов с предопухоловой патологией желудка // Сибирский онкологический журнал, 2010. Прил. 1. С. 10. [Avdeenko T.V., Vusik M.V., Urazova L.N., Evtushenko V.A., Matvienko O.A. The role of Epstein-Barr virus in the formation of groups of increased cancer risk among patients with disorders of the stomach pretumor. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal* = *Siberian Journal of Oncology*, 2010, app. 1, p. 10. (In Russ.)]
2. Баринский И.Ф. Герпесвирусные инфекции – иммунодефицитные заболевания // Аллергология и иммунология, 2004. Т. 5, № 1. С. 202-204. [Barinsky I.F. Herpesvirus infection – immunodeficiency disease. *Allergologiya i immunologiya* = *Allergology and Immunology*, 2004, Vol. 5, no. 1, pp. 202-204. (In Russ.)]
3. Ведерников В.Е., Захарова Ю.А., Шилкина Т.В. Видовой состав и биологические свойства микрофлоры желудка у пациентов с гастритами // Медицина экстремальных ситуаций, 2011. № 1 (35). С. 90-96. [Vedernikov V.E., Zakharova Yu.A., Shilkina T.V. Species composition and biological properties of the microflora of the stomach in patients with gastritis. *Medsina ekstremalnykh situatsiy* = *Medicine of Extreme Situations*, 2011, no. 1 (35), pp. 90-96. (In Russ.)]
4. Вольнец Г.В. Клинические и диагностические особенности и принципы терапии аутоиммунного гастрита у детей // Детская гастроэнтерология, 2005. № 3. С. 33-37. [Volynets G.V. Clinical and diagnostic features and treatment principles of autoimmune gastritis in children. *Detskaya gastroenterologiya* = *Pediatric Gastroenterology*, 2005, no. 3, pp. 33-37. (In Russ.)]
5. Гариб Ф.Ю., Ризопулу А.П. Взаимодействия патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина // Инфекция и иммунитет, 2012. Т. 2, № 3. С. 581-596. [Garib F.Yu., Rizopulu A.P. Interactions of pathogenic bacteria with innate immune reactions of host. *Infektsiya i immunitet* = *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2012, Vol. 2, no. 3, pp. 581-596. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2012-3-581-596
6. Долгих Т.И., Соколова Т.Ф., Минакова Е.Ю. Изучение иммунофенотипа лимфоцитов у пациентов с микст-инфекцией, вызванной вирусами семейства *Herpesviridae* // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 4-5. С. 433-436. [Dolgikh T.I., Sokolova T.F., Minakova E.Yu. Studies of lymphocyte subsets in patients with a mixed infection caused by the viruses from herpesviridae family. *Medsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 4-5, pp. 433-436. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2010-4-5-433-436
7. Дудаева Н.Г., Гречушников В.Б., Бугаева И.О., Тарасова Г.Н., Головачева Т.В. Иммунологические и морфологические аспекты диагностики инфекции *Helicobacter pylori* и вирусов семейства *Herpesviridae* // Саратовский научно-медицинский журнал, 2010. Т. 6, № 2. С. 361-364. [Dudaeva N.G., Grechushnikov V.B., Bugayeva I.O., Tarasova G.N.,

Golovacheva T.V. Immunological and morphological aspects of diagnostics of *Helicobacter pylori* infection and *Herpesviridae* viruses. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2010, Vol. 6, no. 2, pp. 361-364. (In Russ.)]

8. Иванова Е.И., Попкова С.М., Шабанова Н.М., Петрова И.В., Горбунова Е.Л., Савелькаева М.В., Данусевич И.Н. Адгезивные свойства микроорганизмов, колонизирующих различные биотопы организма человека // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология», 2011. Т. 4, № 4. С. 25-29. [Ivanova E.I., Popkova S.M., Shabanova N.M., Petrova I.V., Gorbunova E.L., Savelkaeva M.V., Danusevich I.N. Adhesive properties of microorganisms colonising different biotopes of the human body. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya "Biologiya. Ekologiya" = "The Bulletin of Irkutsk State University", Series "Biology. Ecology"*, 2011, Vol. 4, no. 4, pp. 25-29. (In Russ.)]

9. Исаков В.А. Диагностика и лечение инфекции, вызванной *Helicobacter pylori*: IV Маастрихтское соглашение. Новые рекомендации по диагностике и лечению инфекции *H. pylori* – Маастрихт IV (Флоренция) // Best Clinical Practice. Русское издание, 2012. Вып. 2. С. 4-23. [Isakov V.A. Diagnosis and treatment of infection caused by *Helicobacter pylori*: IV Maastricht Treaty. The new recommendations for the diagnosis and treatment of infection *H. pylori* – Maastricht IV (Florence). *Best Clinical Practice. Russkoe izdanie = Best Clinical Practice. Russian Edition*, 2012, Issue 2, pp. 4-23. (In Russ.)]

10. Исаков В.А., Рыбалкин С.Б., Романцов М.Г. Герпесвирусная инфекция: рекомендации для врачей. СПб., 2006. 96 с. [Isakov V.A., Rybalkin S.B., Romantsov M.G. Herpes virus infection: recommendations for doctors]. St. Petersburg, 2006. 96 p.

11. Коляда Т.И., Макаревич В.А. Роль моноцитарной фракции мононуклеаров периферической крови в регуляции цитотоксического потенциала лимфоцитов при герпетической инфекции // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2015. № 4. С. 47-50. [Kolyada T.I., Makarevich V.A. Role of monocyte fraction of peripheral blood mononuclear cells in the regulation of lymphocyte cytotoxic potential in herpetic infection. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i ego zdorovye" = Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and his health"*, 2015, no. 4, pp. 47-50. (In Russ.)]

12. Кондрашина Э.А., Калинина Н.М., Давыдова Н.И., Барановский А.Ю., Кондрашин А.С. Особенности цитокинового профиля у пациентов с хроническим *H. pylori*-ассоциированным гастритом и язвенной болезнью // Цитокины и воспаление, 2002. № 4. С. 3-11. [Kondrashina E.A., Kalinina N.M., Davydova N.I., Baranovsky A.Yu., Kondrashin A.S. Features of the cytokine profile in patients with chronic *H. pylori*-associated gastritis and peptic ulcer disease. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2002, no. 4, pp. 3-11. (In Russ.)]

13. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Волков А.Е., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки // Тихоокеанский медицинский журнал, 2015. № 2. С. 30-35. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Volkov A.E., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Polevshchikov A.V. CD56 and CD57 expression by distinct populations of human cytotoxic T lymphocytes. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2015, no. 2, pp. 30-35. (In Russ.)]

14. Курусин В.М., Матвеева Л.В. Гендерные различия микробиоты желудка при заболеваниях гастродуоденальной зоны // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2016. № 2 (126). С. 25-29. [Kurusin V.M., Matveeva L.V. Gender features changes of microbiota gastric at diseases gastroduodenal zone. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya = Russian Journal of Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2016, no. 2 (126), pp. 25-29. (In Russ.)]

15. Лебедева Т.Н. Иммунитет при кандидозе (обзор) // Проблемы медицинской микологии, 2004. Т. 6, № 4. С. 8-16. [Lebedeva T.N. Immunity in patients with candidosis (review). *Problemy meditsinskoj mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2004, Vol. 6, no. 4, pp. 8-16. (In Russ.)]

16. Маланичева Т.Г., Файзуллина Р.А., Зиятдинова Н.В., Нарыков Р.Х. Иммунологические нарушения у детей с хронической гастродуоденальной патологией, осложненной кандидозной инфекцией // Практическая медицина, 2011. № 5 (53). С. 70-73. [Malanicheva T.G., Fayzullina R.A., Ziatdinova N.V., Narykov R.Kh. Immunological disorders in children with chronic gastroduodenal pathology complicated with *Candida* infection. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2011, no. 5 (53), pp. 70-73. (In Russ.)]

17. Матвеева Л.В. Особенности иммунного реагирования основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови при обострении хронического гастрита // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 27-32. [Matveeva L.V. Features of immune response among major lymphocyte subpopulations from peripheral blood during exacerbation of chronic gastritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 27-32. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-27-32

18. Матвеева Л.В., Капкаева Р.Х., Мосина Л.М., Курусин В.М. Изменения пристеночной микробиоты желудка в зависимости от стадии атрофии слизистой оболочки на фоне активного воспалительного процесса // Медицинский альманах, 2016. № 1 (41). С. 44-47. [Matveeva L.V., Kapkaeva R.Kh., Mosina L.M., Kurusin V.M. Change of parietal gastric microbiota depending on the stage of mucous coat atrophy against the background of active inflammation. *Meditsinskiy almanakh = Medical Almanac*, 2016, no. 1, pp. 44-47. (In Russ.)]

19. Нелюбин В.Н., Мудров В.П., Чеканов А.В., Сепиашвили Р.И. Цитокиновая регуляция иммунного ответа при бактериально-вирусной инфекции желудочно-кишечного тракта, обусловленной *Helicobacter pylori* и вирусами герпеса // Вестник РУДН, серия Медицина, 2011. № 2. С. 41-46. [Nelyubin V.N., Mudrov V.P., Chekanov A.V., Sepiashvili R.I. Cytokine regulation of immune response against bacterial and viral co-infection of gut, caused by *Helicobacter pylori* and herpes viruses. *Vestnik RUDN, seriya Meditsina = RUDN Journal of Medicine*, 2011, no. 2, pp. 41-46. (In Russ.)]

20. Пашенков М.В., Муругина Н.Е., Муругин В.В., Пинегин Б.В. Выявление и характеристика цитолитических CD8⁺- и CD4⁺-Т-клеток // Иммунология, 2010. № 1. С. 4-12. [Paschenkov M.V., Murugina N.E., Murugin V.V., Pinegin B.V. Identification and characterization of cytolytic CD8⁺- and CD4⁺-T cells. *Immunologiya = Immunology*, 2010, no. 1, pp. 4-12. (In Russ.)]

21. Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Экспрессия CD8-ассоциированных генов в циркулирующих CD4⁺-цитотоксических лимфоцитах у здоровых доноров // Иммунология, 2013. № 2. С. 72-75. [Paschenkov M.V., Pinegin B.V. Expression of CD8-associated genes in the circulating CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Immunologiya = Immunology*, 2013, no. 2, pp. 72-75. (In Russ.)]

22. Сергеев А.Ю. Иммуитет при кандидозе // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 1999. № 1. С. 91-99. [Sergeev A.Yu. Immunity for candidiasis. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya* = *International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*, 1999, no. 1, pp. 91-99. (In Russ.)]
23. Симованьян Э.Н., Денисенко В.Б., Сарычев А.М., Григорян А.В. Хроническая инфекция вируса Эпштейна-Барр у детей: современные аспекты диагностики и лечения // *Consilium Medicum*, 2006. № 2. С. 29-35. [Shimovonyan E.N., Denisenko V.B., Sarychev A.M., Grigoryan A.V. Chronic infection of Epstein-Barr children: modern aspects of diagnosis and treatment. *Consilium Medicum* = *Consilium Medicum*, 2006, no. 2, pp. 29-35. (In Russ.)]
24. 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. (In Russ.)]
25. Ткаченко Е.И., Барышникова Н.В., Успенский Ю.П., Авалуева Е.Б. Хеликобактериоз и дисбиоз желудочно-кишечного тракта: биологические и клинические проблемы сосуществования // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова, 2008. № 3 (28). С. 115-120. [Tkachenko E.I., Baryshnikova N.V., Uspensky Yu.P., Avalueva E.B. Gastrointestinal tract helicobacteriosis and disbiosis: biological and clinical problems of coexistence. *Vestnik Sankt-Petersburgskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii im. I.I. Mechnikova* = *Bulletin of Mechnikov St. Petersburg State Medical Academy*, 2008, no. 3 (28), pp. 115-120. (In Russ.)]
26. Фрейдлин И.С., Шейкин Ю.А. Эндотелиальные клетки в качестве мишеней и продуцентов цитокинов // Медицинская иммунология, 2001. Т. 3, № 4. С. 499-514. [Freidlin I.S., Sheikine Yu.A. Endothelial cells as targets and producers of cytokines. *Meditsinskaja immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2001, Vol. 3, no. 4, pp. 499-514. (In Russ.)]
27. Хмель И.А., Белик А.С., Зайцева Ю.В., Данилова Н.Н. Quorum sensing и коммуникация бактерий // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология, 2008. № 1. С. 28-35. [Khmel I.A., Belik A.S., Zaitseva Yu.V., Danilova N.N. Quorum sensing and communication of bacteria. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya* = *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 2008, no. 1, pp. 28-35. (In Russ.)]
28. Циммерман Я.С., Захарова Ю.А., Ведерников В.Е. Сравнительная оценка диагностических тестов определения *Helicobacter pylori* и спектр мукозной микрофлоры желудка при гастрите и язвенной болезни // Клиническая медицина, 2013. Т. 91, № 4. С. 42-48. [Tcimmerman Ya.S., Zakharova Yu.A., Vedernikov V.E. Comparative estimation of diagnostic tests for *Helicobacter pylori* and the spectrum of gastric mucosal microflora in gastritis and ulcer disease. *Klinicheskaya meditsina* = *Clinical Medicine (Russian Journal)*, 2013, Vol. 91, no. 4, pp. 42-48. (In Russ.)]
29. Чернин В.В. Болезни пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки. М.: МИА, 2010. 528 с. [Chernin V.V. Diseases of the esophagus, stomach and duodenum]. Moscow: MIA, 2010. 528 p.
30. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
31. Appay V., Zaunders J.J., Papagno L., Sutton J., Jaramillo A., Waters A., Easterbrook P., Grey P., Smith D., McMichael A.J., Cooper D.A., Rowland-Jones S.L., Kelleher A.D. Characterization of CD4(+) CTLs *ex vivo*. *Journal of Immunology*, 2002, Vol. 168, pp. 5954-5958.
32. Azem J., Svennerholm A.M., Lundin B.S. B cells pulsed with *Helicobacter pylori* antigen efficiently activate memory CD8⁺ T cells from *H. pylori*-infected individuals. *Clinical Immunology*, 2006, Vol. 118, pp. 284-291.
33. Bäckhed F., Rokbi B., Torstensson E., Zhao Y., Nilsson C., Seguin D., Normark S., Buchan A.M.J., Richter-Dahlfors A. Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4. *The Journal of Infectious Diseases*, 2003, Vol. 187, no. 5, pp. 829-836.
34. Bacterial species as partners and pathogens. Editors: P.J. Heidt, T. Midtvedt, V. Rusch, J. Versalovic. *Old Herborn University Foundation, Herborn-Dill, Germany*. 2012, pp. 45-52, 99-103.
35. Beno D.W., Stever A.G., Mathews H.L. Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8⁺ lymphocytes. *Journal of Immunology*, 1995, Vol. 154, no. 10, pp. 5273-5281.
36. Brenchley J.M., Karandikar N.J., Betts M.R., Ambrozak D.R., Hill B.J., Grotty L.E., Casazza J.P., Kuruppu J., Migueles S.A., Connors M., Roederer M., Douek D.C., Koup R.A. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood*, 2003, Vol. 101, pp. 2711-2720.
37. Casazza J.P., Betts M.R., Price D.A., Precopio M.L., Ruff L.E., Brenchley J.M., Hill B.J., Roederer M., Douek D.C., Koup R.A. Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4⁺ T lymphocytes with cellular maturation. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, Vol. 203, pp. 2865-2877.
38. Chattopadhyay P.K., Betts M.R., Price D.A., Costick E., Horton H., Roederer M., de Rosa S.C. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 2009, Vol. 85, no. 1, pp. 88-97.
39. Cruz-Guilloty F., Pipkin M.E., Djuretic I.M., Levanon D., Lotem J., Lichtenheld M.G., Groner Y., Rao A. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *Journal of Experimental Medicine*, 2009, Vol. 206, pp. 51-59.
40. Fletcher J.M., Vukmanovic-Stejić M., Dunne P.J., Birch K.E., Cook J.E., Jackson S.E., Salmon M., Rustin M.H., Akbar A.N. Cytomegalovirus-specific CD4⁺ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion. *Journal of Immunology*, 2005, Vol. 175, pp. 8218-8225.
41. Fukui T., Nishio A., Okazaki K., Kasahara K., Saga K., Tanaka J., Uza N., Ueno S., Kido M., Ohashi S., Asada M., Nakase H., Watanabe N., Chiba T. Cross-primed CD8⁺ cytotoxic T cells induce severe *Helicobacter*-associated gastritis in the absence of CD4⁺ T cells. *Helicobacter*, 2007, Vol. 12, no. 5, pp. 486-497.
42. Groscurth P., Filgueira L. Killing mechanisms of cytotoxic T lymphocytes. *News in Physiological Sciences*, 1998, Vol. 13, no. 3, pp. 156-162.
43. Jones K.R., Whitmire J.E., Merrel D.S. A tale of two toxins: *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2010, no. 1, p. 115.
44. Kawai T., Akira S. TLR signaling. Edited by G Kroemer. *Cell Death and Differentiation*, 2006, no. 13, pp. 816-825.
45. Kawai T., Takahashi K., Sato S., Coban C., Kumar H., Kato H., Ishii K. J., Takeuchi O., Akira S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature Immunology*, 2005, no. 6, pp. 981-988.

46. Kido M., Watanabe N., Aoki N., Iwamoto S., Nishiura H., Maruoka R., Ikeda A., Azuma T., Chiba T. Dual roles of CagA protein in *Helicobacter pylori*-induced chronic gastritis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, Vol. 412, no. 2, pp. 266-272.
47. Kim I.J., Blanke S.R. Remodeling the host environment: modulation of the gastric epithelium by the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012, no. 2, p. 37.
48. Kim J.J., Nottingham L.K., Sin J.I., Tsai A., Morrison L., Oh J., Dang K., Hu Y., Kazahaya K., Bennet M., Dentchev T., Wilson D.M., Chalian A.A., Boyer J.D., Agadjanyan M.G., Weiner D.B. CD8 positive T-cells influence antigen-specific immune responses through the expression of chemokines. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, Vol. 102, no. 6, pp. 1112-1124.
49. Kronsteiner B., Bassaganya-Riera J., Philipson N., Hontecillas R. Novel insights on the role of CD8⁺T cells and cytotoxic responses during *Helicobacter pylori* infection. *Gut Microbes*, 2014, Vol. 5, no. 3, pp. 357-362.
50. Kusters J.G., van Vliet A.H., Kuipers E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, Vol. 19, no. 3, pp. 449-490.
51. le Priol Y., Puthier D., Lecureuil C., Combadiere C., Debre P., Nguyen C., Combadiere B. High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8⁺ CD57⁺ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *Journal of Immunology*, 2006, Vol. 177, no. 8, pp. 5145-5154.
52. Li L., Wong G.L., To K.F., Wong V.W., Lai L.H., Chow D.K., Lau J.Y., Sung J.J., Ding C. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, e7985. doi: 10.1371/journal.pone.0007985.
53. Lindgren A., Pavlovic V., Flach C.F., Sjöling A., Lundin S. Interferon-gamma secretion is induced in IL-12 stimulated human NK cells by recognition of *Helicobacter pylori* or TLR2 ligands. *Innate Immunity*, 2011, Vol. 17, no. 2, pp. 191-203.
54. MACPF/CDC Proteins – Agents of Defence, Attack and Invasion. *Subcellular Biochemistry* 80 / Eds. G. Anderluh, R. Gilbert. Netherlands: Springer Science+Business Media Dordrecht, 2014, 322 p.
55. Mahla R.S., Reddy M.C., Prasad D.V., Kumar H. Sweeten PAMPs: role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology. *Frontiers in Immunology*, 2013, Vol. 4, p. 248.
56. Melchjorsen J., Matikainen S., Paludan S.R. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus. *Viruses*, 2009, Vol. 1, no. 3, pp. 737-759.
57. Mohammadi M., Czinn S., Redline R., Nedrud J. *Helicobacter*-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *Journal of Immunology*, 1996, Vol. 156, pp. 4729-4738.
58. Ohtani N., Ohtani H., Nakayama T., Naganuma H., Sato E., Imai T., Nagura H., Yoshie O. Infiltration of CD8⁺T cells containing RANTES/CCL5⁺cytoplasmic granules in actively inflammatory lesions of human chronic gastritis. *Laboratory investigation*, 2004, Vol. 84, no. 3, pp. 368-375.
59. Piccinini A.M., Midwood K.S. DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators of Inflammation*, 2010, Vol. 2010, 21 p.
60. Romani L. Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, Vol. 2, no. 4, pp. 363-367.
61. Schetter A.J., You W.C., Lennette E.T., Gail M.T., Rabkin C.S. Association of Epstein–Barr virus antibody levels with precancerous lesions in a highrisk cohort. *Cancer Science*, 2008, Vol. 99, no. 2, pp. 350-354.
62. Siavoshi F., Salmanian A.H., Kbari F.A., Malekzadeh R., Massarrat S. Detection of *Helicobacter pylori*-specific genes in the oral yeast. *Helicobacter*, 2005, Vol. 10, no. 4, pp. 318-322.
63. Sun G., Liu X., Mercado P., Jenkinson S.R., Kypriotou M., Feigenbaum L., Galera P., Bosselut R. The zinc finger protein cKrox directs CD4 lineage differentiation during intrathymic T cell positive selection. *Nature Immunology*, 2005, no. 6, pp. 373-381.
64. van Leeuwen E.M., Remmerswaal E.B., Vossen M.T., Rowshani A.T., Wertheim-van Dillen P.M., van Lier R.A., ten Berge I.J. Emergence of a CD4⁺CD28⁺ granzyme B⁺, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *Journal of Immunology*, 2004, Vol. 173, pp. 1834-1841.
65. Wang L., Wildt K.F., Castro E., Xiong Y., Feigenbaum L., Tessarollo L., Bosselut R. The zinc finger transcription factor Zbtb7b represses CD8-lineage gene expression in peripheral CD4⁺ T cells. *Immunity*, 2008, no. 29, pp. 876-887.
66. Wang L., Wildt K.F., Zhu J., Zhan X., Feigenbaum L., Tessarollo L., Paul W.E., Fowlkes B.J., Bosselut R. Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4⁺ T cells. *Nature Immunology*, 2008, no. 9, pp. 1122-1130.
67. Woolf E., Xiao C., Fainaru O., Lotem J., Rosen D., Negreanu V., Bernstein Y., Goldenberg D., Brenner O., Berke G., Levanon D., Groner Y. Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, Vol. 100, no. 13, pp. 7731-7736.
68. Zilberstein B., Quintanilha A.G., Santos M.A., Pajeccki D., Moura E.G., Alves P.R., Maluf Filho F., de Souza J.A., Gama-Rodrigues J. Digestive tract microbiota in healthy volunteers. *Clinics (Sao Paulo)*, 2007, Vol. 62, no. 1, pp. 47-54.

Автор:

Матвеева Л.В. — к.м.н., доцент, доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии, Медицинский институт ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Author:

Matveeva L.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology, Medical Institute, National Research State University of Mordovia, Saransk, Russian Federation

Поступила 07.03.2017

Отправлена на доработку 11.03.2017

Принята к печати 02.05.2017

Received 07.03.2017

Revision received 11.03.2017

Accepted 02.05.2017

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК СТРАТЕГИЯ ЛЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА: АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Зафранская М.М., Нижегородова Д.Б.

Международный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета,
г. Минск, Республика Беларусь
Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск, Республика Беларусь

Резюме. Способность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) оказывать регуляторное/супрессорное влияние на аутоиммунный процесс и стимулировать ремиелинизацию позволяет рассматривать их в качестве нового метода терапии рассеянного склероза (РС), модифицирующего течение заболевания. Генетическая стабильность, пролиферативный потенциал, способность к миграции в область повреждения ткани и отработанные протоколы выделения и культивирования являются основными преимуществами для успешного проведения клеточной терапии как аутологичными, так и аллогенными МСК. Предварительные результаты клинических исследований по использованию МСК у пациентов с РС указывают на эффективность и безопасность данного метода лечения. Тем не менее, демонстрация успешности клеточной терапии при РС возможна только после глубокого изучения и понимания биологии МСК и механизмов межклеточного взаимоотношения при их применении. В данной статье приведен аналитический обзор накопленного опыта по использованию иммуномодулирующих и нейропротекторных свойств МСК при РС и освещаются проблемные вопросы обоснованности применения клеточной терапии с учетом результатов *in vitro* и *in vivo* исследований.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, рассеянный склероз, клеточная терапия

MESENCHYMAL STEM CELLS AS A THERAPEUTIC STRATEGY FOR MULTIPLE SCLEROSIS: ISSUES AND PERSPECTIVES

Zafranskaya M.M., Nizhegorodova D.B.

International Sakharov Environmental Institute, Belorussian State University, Minsk, Republic of Belarus
Belorussian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Abstract. The ability of mesenchymal stem cells (MSC) to influence the regulatory/suppressive effect in the autoimmune process and promote remyelination allows to consider them a new method of multiple sclerosis (MS) therapy, by means of modifying the disease activity. Genetic stability, proliferative potential, ability to migrate into the damaged tissue areas and agreed protocols for isolation and culture are the main advantages for

Адрес для переписки:

Зафранская Марина Михайловна
Международный экологический институт
им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного
университета
220070, Республика Беларусь, г. Минск,
ул. Долгобродская, 23.
Тел.: +375 (296) 31-25-48.
Факс: +375 (17) 398-99-53.
E-mail: zafranskaya@gmail.com

Address for correspondence:

Zafranskaya Marina M.
International Sakharov Environmental Institute, Belorussian
State University
220070, Republic of Belarus, Minsk, Dolgobrodskaya str., 23.
Phone: +375 (296) 31-25-48.
Fax: +375 (17) 398-99-53.
E-mail: zafranskaya@gmail.com

Образец цитирования:

М.М. Зафранская, Д.Б. Нижегородова «Мезенхимальные
стволовые клетки как стратегия лечения рассеянного
склероза: актуальные проблемы и перспективы»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 683–704.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-683-704
© Зафранская М.М., Нижегородова Д.Б., 2017

For citation:

M.M. Zafranskaya, D.B. Nizhegorodova “Mesenchymal stem
cells as a therapeutic strategy for multiple sclerosis: issues and
perspectives”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 683–704.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-683-704
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-683-704

successful autologous, as well as allogeneic MSC therapy. Preliminary results from clinical studies using MSC application in MS patients show efficiency and safety of this therapeutic approach. Nevertheless, successful demonstration of the cell therapy in MS is only possible after detailed analysis and understanding of MSC biology and mechanisms of appropriate intercellular interactions. The article reviews general experience in usage of immunomodulatory and neuroprotective properties of MSC in MS, and highlights the issues of validity in cell-based therapy taking into account both *in vitro* and *in vivo* studies.

Keywords: *mesenchymal stem cells, multiple sclerosis, cell-based therapy*

Введение

Рассеянный склероз (РС) — хроническое мультифакториальное прогрессирующее демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС) с выраженными воспалительным, миелин- и аксон-дегенеративным компонентами и вовлечением клеток иммунной системы в развитие патологического процесса [5, 21, 56, 117, 145]. Для РС характерно нарушение баланса между регуляторными и потенциально миелин-реактивными клонами Т-лимфоцитов с последующим развитием специфического Т-клеточного иммунного ответа, эффекторные реакции которого направлены на повреждение компонентов миелиновой оболочки аксонов [67, 68, 69, 144]. В связи с этим подходы к терапии РС должны заключаться в отмене иммуномодулированного повреждения посредством модулирования или индукции толерантности в сочетании с обеспечением защиты ткани ЦНС и, в идеале, с поддержкой функциональной регенерации как невральных клеток, так и процессов миелинизации [19, 24, 134]. Используемые при данной патологии кортикостероиды, иммуномодуляторы, иммуносупрессанты и методы эфферентной терапии не дают продолжительного, устойчивого эффекта, а существующие направления селективной антиген-специфической иммунотерапии, основанные на применении модифицированных пептидных лигандов, моноклональных антител, ДНК- и Т-клеточной вакцинации, не всегда являются эффективными [31, 41, 72, 82, 84, 123, 136]. Отсутствие оптимальных протоколов лечения РС, направленных на селективное подавление аутореактивных клонов Т-лимфоцитов и восстановление поврежденных участков ЦНС, объясняет все возрастающий интерес исследователей к использованию иммуномодулирующих и нейропротекторных свойств мезенхимальных стволовых клеток [33, 112, 153, 154]. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляют собой гетерогенную популяцию постнатальных клеток-предшественников стромального происхождения (мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки), могут быть выделены из различных тканей организма и, наряду с регенеративным потенциалом, обладают выраженными как *in vitro*, так и *in vivo* иммуномодулирующими свойствами [114, 129, 142, 151, 152]. Кроме

того, МСК обладают большей степенью пластичности по сравнению с другими популяциями стволовых клеток, в том числе способностью дифференцироваться *in vitro* в клетки немезодермального типа, такие как нейроны и астроциты.

Предварительные результаты клинических исследований по использованию МСК у пациентов с РС указывают на эффективность и безопасность данного метода лечения [17, 27, 28, 81]. Тем не менее, успешное применение клеточной терапии при РС возможно только после глубокого изучения и понимания биологии, взаимодействия с локальным микроокружением и алгоритма использования МСК (доза, пути и кратность введения, миграция клеток в органы и ткани организма и др.). Следует также усовершенствовать критерии включения пациентов и идентификацию потенциальных иммунологических маркеров терапевтической эффективности [45, 60, 155].

Одна из целей базисного исследования биологии МСК заключается в создании *in vivo* и *in vitro* аналитических систем [165]. При этом, несмотря на огромное количество работ, посвященных изучению иммуномодулирующих свойств МСК, не определена взаимосвязь между выявляемыми эффектами МСК *in vitro* и их эффектами *in vivo*, что объясняется отсутствием универсального общепринятого *in vitro* метода определения потенциального терапевтического эффекта МСК *in vivo* [142]. Кроме того, при исследовании *in vivo* иммунный статус опосредуется множеством эндогенных и экзогенных факторов, что создает проблему оценки функционального состояния отдельных пулов аутореактивных клеток при РС, а изменения функциональных свойств и активности лимфоцитов после клеточной терапии оцениваются по узкому спектру параметров. При этом эффект от введения МСК может варьировать в значительных пределах как в зависимости от характеристик самих МСК, так и от состояния иммунной системы реципиента.

В данной статье приведен аналитический обзор накопленного опыта по использованию иммуномодулирующих и нейропротекторных свойств мезенхимальных стволовых клеток при РС и освещаются проблемные вопросы обоснованности применения клеточной терапии с учетом результатов *in vitro* и *in vivo* исследований.

Т-лимфоциты в патогенезе рассеянного склероза

Этиопатогенез РС многокомпонентный и включает комбинацию факторов генетической предрасположенности и окружающей среды. Среди ассоциированных с заболеванием генов выделяют антигены (Ag) гистосовместимости 2-го класса (MHC II) (HLA-DRB1)*1501 и (HLA-DRB5)*0101 аллели, аллели рецептора IL-2 и IL-7, что и подразумевает наличие генетической предрасположенности к заболеванию. Предположительно мутации генов рецептора интерлейкина-1 (IL-1) и антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra), CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) генов рецепторов к Fc-фрагменту иммуноглобулинов и гена, кодирующего аполипопротеин E, определяют течение РС [108, 116]. В качестве триггерных факторов окружающей среды выступают вирусы (вирус Эпштейна-Барр, ретровирусы, герпесвирусы 1, 2, 6 типов, парамиксовирусы), недостаток витамина D, генетические детерминанты кишечной микробиоты и др. [7, 15, 23, 93].

За прошедшее десятилетие стало очевидно, что патогенез РС намного более сложен, чем описанный ранее при изучении механизмов индукции заболевания на модели аутоиммунного экспериментального энцефаломиелита (ЭАЭ). В настоящее время принято считать, что при РС ключевым моментом в появлении характерного воспаления и развитии демиелинизации является инфильтрация тканей ЦНС Т-клетками, проходящими через ГЭБ. Полагают, что этот процесс может инициироваться попаданием вирусных или бактериальных факторов в нервную ткань и появлением их белков на мембранах олигодендроцитов и миелиновых оболочках. Последующий аутоиммунный ответ направлен против миелиновых Ag, что приводит к нарушениям в системе распознавания последних [4, 52].

Иммунологические механизмы детально описаны сравнительно недавно в ходе изучения эффективности применения иммуносупрессивных препаратов при активном течении заболевания [25, 62]. Ведущая роль в развитии РС отводится миелин-специфическим CD4⁺Т-хелперным лимфоцитам 1-го типа (Th1), Th17, а также цитотоксическим CD8⁺Т-клеткам, повреждающим компоненты миелиновой оболочки, в первую очередь — основной белок миелина (ОБМ), протеолипидный протеин (ПЛП) и миелин-олигодендроцитарный гликопротеин (МОГ) [52, 64, 67, 89, 100].

Разнообразие клинических и патологических проявлений у пациентов с РС свидетельствует о сложных и комплексных механизмах активации Т-лимфоцитов и иммунной реакции в ЦНС [111, 119, 138]. Для инициации воспали-

тельных процессов в ЦНС миелин-специфические Т-клетки должны активироваться на периферии, проникнуть в ЦНС и впоследствии реактивироваться антиген-презентирующими клетками (АПК), представляющими миелиновые аутоантигены (аутоAg) Т-лимфоцитам. Реактивация Т-лимфоцитов приводит к продукции различными клетками провоспалительных медиаторов, дополнительно привлекающих клетки иммунной системы в очаг воспаления, и развитию демиелинизирующих процессов (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки) [52].

В настоящее время неизвестно, как Т-клетки, специфические для миелиновых протеинов, активируются на периферии, т.к. данные белки присутствуют только в ЦНС и синтезируются олигодендроцитами. Тем не менее, у мышей, экспрессирующих трансгенный Т-клеточный рецептор, специфичный для ПЛП и ОБМ, развивается спонтанный ЭАЭ. При этом миелин-специфический ответ со стороны Т-лимфоцитов обнаруживается в дренирующих ЦНС цервикальных лимфатических узлах [44, 169].

То есть некоторые миелиновые Ag конститутивно присутствуют в региональных лимфатических узлах и при определенных условиях, которые до настоящего времени так и не определены, способны активировать Т-клетки АПК, которые презентуют миелиновые эпитопы наивным (naïve) Т-лимфоцитам в виде иммуногенного комплекса. Кроме того, миелин-специфическая Т-клеточная активация может являться результатом молекулярной мимикрии, хотя специфический возбудитель, инициирующий развитие РС, также окончательно не идентифицирован [52].

Параллельно с активацией Т-лимфоцитов на периферии воздействие локальных факторов в ЦНС (персистирующая вирусная инфекция, метаболический стресс, продукция провоспалительных цитокинов) способствует экспрессии на эндотелиальных клетках (ЭК) адгезивных молекул ICAM-1, VCAM-1, Е-селектинов, что облегчает адгезию аутореактивных Т-лимфоцитов к клеткам церебрального эндотелия и облегчает их проникновение через ГЭБ.

Показано, что только активированные Т-клетки, экспрессирующие VLA-4, $\alpha 4\beta 1$ -интегрин или CD49d/CD29, способны проникать в ЦНС. Протеазы, включая матричные металлопротеиназы, в дальнейшем способны усиливать миграцию аутореактивных лимфоцитов путем деградации макромолекул внеклеточного матрикса, в частности коллагена IV типа. Воспалительные цитокины, высвобождаемые активированными Т-лимфоцитами, IFN γ и TNF α , повышают экспрессию поверхностных клеточных маркеров и активируют близлежащие лим-

фоциты и АПК, что способствует инфильтрации периваскулярного пространства [117].

Проникнув в ЦНС, активированные аутореактивные Т-лимфоциты распознают предполагаемые аутоАг, презентируемые АПК, в составе тримолекулярного комплекса. Периваскулярные моноциты, клетки микроглии и макрофаги, паренхимальные лимфоциты и, возможно, астроциты экспрессируют молекулы МНС I и МНС II, которые в результате процессинга связывают белковый аутоАг и представляют его либо CD4⁺, либо CD8⁺Т-лимфоцитам [73, 93].

Считается, что Th1 обладают способностью в присутствии миелиновых аутоАг активироваться и продуцировать провоспалительные медиаторы IFN γ , TNF α , IL-2. Посредством местной продукции провоспалительных цитокинов лимфоциты Th1 привлекают в очаг воспаления CD8⁺Т-клетки и макрофаги и способствуют реализации их цитотоксического потенциала. В частности, IFN γ индуцирует цитотоксическую активацию макрофагов и клеток микроглии, а также усиливает клетками нервной ткани экспрессию белков МНС I, которые необходимы для активации и реализации цитотоксического действия CD8⁺Т-лимфоцитов. Значимую роль в развитии РС отводят CD4⁺Th17-клеткам, которые продуцируют провоспалительные цитокины IL-17A и IL-17F. Данные цитокины, в свою очередь, стимулируют другие типы клеток, синтезирующие провоспалительные медиаторы, такие как IL-6, GM-CSF, матричные металлопротеиназы и CXC хемокины. Th17, продуцируя IL-17A, IL-17F и IL-22, увеличивают проницаемость ГЭБ, что способствует попаданию аутоАг из ЦНС на периферию и, вследствие этого, активации и пролиферации на периферии миелинреактивных Т- и В-лимфоцитов с последующим проникновением аутореактивных клеток обратно в ЦНС [89].

На сегодняшний день значимую патогенетическую роль при РС играют инфламмасомы. Инфламмасомы (inflammasomes) представляют собой большой макромолекулярный комплекс, который включает множество копий рецептора молекулярных паттернов патогена или повреждения и который приводит к запуску воспалительной реакции. Показано, что инфламмасомы модулируют нейровоспалительные клетки и начальные этапы нейровоспаления [43]. Ключевой активатор воспалительных заболеваний, известен как NLRP3-инфламмасома. NLRP3, или криопирин (cryopyrin) — цитозольный белок, NOD-подобный рецептор семейства NALP, вовлечен в активацию каспаз 1 и 5, что приводит к внутриклеточному процессингу и образованию зрелой активной формы IL-1 β и IL-18. NLR — нуклеотидная последовательность, свя-

зывающая лейцин, известная также как NOD-подобная, представляет собой класс цитозольных рецепторов, реагирующих на разнообразные PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), которые принадлежат микроорганизмам, а также на DAMPs (damage-associated molecular patterns), появляющиеся при тканевом повреждении. Наиболее интенсивно изучаемый класс NLRs — инфламмасом-формирующие NLRs. При распознавании DAMPs и PAMPs эти NLRs, включающие NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRC5, NLRP6, NLRP7 и NLRP12, медируют высвобождение провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 [140].

Гиперактивация IL-1 β и IL-18 инфламмасом-формирующим белковым комплексом вовлекается в патогенез РС. IL-1 β и IL-18 побуждают дифференцировку наивных CD4⁺Т-клеток в Th17 и Th1, которые приводят к демиелинизации и гибели нейронов при РС. Клинические исследования свидетельствуют о наличии ассоциации повышенной экспрессии каспазы-1, IL-1 β и IL-18 с восприимчивостью, прогрессией и тяжестью течения РС [108].

IL-1 β и IL-18 — цитокины врожденного иммунитета и являются критическими в пролиферации нейро-иммунореактивных клеток нервной ткани микроглии и астроцитов, которые реагируют немедленно на нейрональное повреждение и гибель. IL-18, первоначально охарактеризованный как IFN γ индуцирующий фактор, действует синергично с IL-12, обеспечивая дифференцировку наивных CD4⁺Т-клеток в Th1-лимфоциты [94].

На экспериментальной модели показано, что присутствие протеинов, ассоциированных с инфламмасомами, таких как ASC (apoptotic speck containing protein with a CARD), каспаза-1, IL-1 β и IL-18, может приводить к обострениям в патогенезе РС [94]. В последнее время доказано, что NLRP3 способствует развитию РС, ускоряя демиелинизацию на экспериментальной модели, вызванной купризомом, и индуцируя миграцию Т-лимфоцитов в ЦНС [53, 70].

Терапевтический потенциал мезенхимальных стволовых клеток

В настоящее время в исследовательских лабораториях используются два типа стволовых клеток: эмбриональные и зрелые (соматические) тканеспецифичные клетки. Эмбриональные стволовые клетки, клиническое применение которых сопряжено с определенными этическими проблемами, получают из эмбриональных бластомеров, они дают начало любым клеткам организма. Зрелые (соматические) тканеспецифичные стволовые клетки впоследствии разделяются на гемопоэтические, мезенхимальные и невральные стволовые клетки (НСК).

МСК представляют собой клетки-предшественники стромального происхождения, которые более корректно следует называть мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, поскольку их истинная «стволовость» не установлена, несмотря на демонстрацию и подтверждение мультипотентности взрослых стволовых клеток [76, 121].

Первоначально клетки рассматривались как «регенеративные» вследствие их способности трансдифференцироваться в другие типы тканей. В настоящее время высоко оценивается их способность индуцировать различные паракринные эффекты, положительные результаты которых доказаны *in vitro* на экспериментальных моделях и в клинических исследованиях. Некоторые из этих эффектов реализуются за счет растворимых факторов, другие — за счет межклеточного контакта и «репрограммирования» клеток-мишеней. Помимо этого, МСК проявляют некоторые особенные свойства: иммунологическая привилегированность (выживание в аллогенном окружении) и активный хоуминг [36, 96]. Известно, что введенные *in vivo* МСК способны к долгосрочной персистенции в организме реципиента, сохраняют после трансплантации мультипотентность и, вероятно, уникальные иммунологические характеристики, позволяющие им оставаться в ксеногенном окружении. Приживление аллогенных и ксеногенных МСК в организме иммунокомпетентного хозяина, а также снижение проявления или полное предотвращение РТПХ позволяет предположить, что МСК индуцируют в организме хозяина периферическую и центральную толерантность. Таким образом, введение аллогенных МСК с терапевтическими целями приведет к формированию стабильной химеры в организме реципиента и длительному влиянию на иммунный статус, включая воздействие на все этапы иммунного ответа [13, 99, 161].

Роль МСК в поддержании тканевого гомеостаза и восстановлении недостаточно ясна. Вероятнее всего, они занимают определенную нишу в воспалительном процессе, участвуя в разрешающей фазе повреждения. При этом потенциальными источниками МСК являются перидциты, которые образуются из поврежденных сосудов костного мозга. МСК также могут появляться в поврежденной ткани (особенно в легких и почках) через механизм эпидермально-мезенхимальной транзиции. При использовании нефизиологически большого количества экзогенных клеток *in vivo* МСК могут инициировать различные биологические механизмы гомеостатического процесса [34].

Регуляторная активность МСК проявляется по отношению к огромному количеству эффекторных клеток врожденного и адаптив-

ного иммунитета, включая Т-клеточные субпопуляции, В-клетки, натуральные киллеры (НК-лимфоциты), ДК моноцитарного происхождения и нейтрофилы [14, 30, 37, 90, 125, 126, 127, 146, 149]. Данные свойства проявляют не только МСК, выделенные из костного мозга, но и полученные из других тканей (жир, тимус, селезенка), что позволяет отнести адипоциты, остеобласты и фибробласты к различным тканевым источникам. В частности, независимо от дифференцировочного состояния и происхождения, фибробласты и дифференцированные мезенхимальные клетки предотвращают пролиферацию и апоптоз активированных Т-клеток. То есть потенциально физиологическая функция иммунной регуляции *in vivo* регулируется стромальными клетками, происходящими из мезенхимальных стромальных клеток [57, 58, 77].

В МСК-медиированную иммунную регуляцию вовлечен широкий спектр молекулярных механизмов, включая $IFN\gamma$, $IL-1\beta$, $TGF-\beta 1$, индолеамин-2,3-диоксигеназу (IDO — indoleamine-2,3-dioxygenase), $IL-6$, $IL-10$, ПГЕ₂, фактор роста гепатоцитов (HGF — hepatocyte growth factor), $TNF\alpha$, NO, гемоксигеназу (hemeoxygenase-1), HLA-G5 и многие другие растворимые факторы, большинство из которых пока не идентифицированы [2, 91, 110, 113, 118, 143]. Следует отметить, что данная сложная панель биологических регуляторов взаимно активируется и в конечном итоге приводит к анергии эффекторных клеток иммунной системы независимо от антигенного стимула.

Таким образом, модулирующая активность не является конститутивным свойством МСК. На МСК влияют:

- провоспалительные цитокины, которые продуцируются стимулированными клетками в результате антигенного контакта и активируют МСК [91, 122, 143];

- стимулы, которые могут препятствовать проявлению ингибиторных механизмов, такие как триггерные сигналы инфекционных агентов для Toll-подобных рецепторов (TLRs) или эндогенные сигналы опасности (danger signals) [35, 120, 158];

- время контакта с эффекторными клетками иммунной системы в процессе активации [18].

Суммирующие данные о механизмах противовоспалительного и иммуномодулирующего действия МСК представлены в таблице 1.

Все исследователи едины во мнении, что МСК активируются провоспалительными цитокинами, продуцируемыми стимулированными Т-клетками, которые впоследствии и ингибируются через механизмы действия МСК [56]. $IFN\gamma$ является одним из первых цитокинов, продуцируемым в процессе Т-клеточного ответа на анти-

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ МЕХАНИЗМЫ МСК [112]

TABLE 1. IMMUNOMODULATORY MECHANISMS OF MSC [112]

Мишень Target cell	Механизм действия Mechanism	Первичный эффект Primary effect	Вторичный эффект Secondary effect
ДК Dendritic cells	ПГЕ₂/прямой контакт PGE ₂ /direct contact	↓ TNFα, IL-12, дифференцировка и активация ↓ TNFα, IL-12, differentiation and activation	Ингибирующее влияние на полежащие НК-клетки Impairs effect on resting NK cells ↓ Т-клеточной пролиферации ↓ T-cell proliferation ↓ продукции IFNγ Th1 ↓ IFNγ by Th1 cells
	ПГЕ₂, IL-6, IL-8 и SDF-1 PGE ₂ , IL-6, IL-8 and SDF-1	↑ IL-10	↑ продукции IL-4 Th2 ↑ IL-4 by Th2 cells
Незрелые ДК Immature Dendritic cells	ПГЕ₂ PGE ₂	↑ IL-10	↑ количества T_{reg} ↑ T _{reg} production ↑ продукции IL-10 T_{reg} ↑ IL-10 by T _{reg} cells
Т-клетки (CD4⁺, Th) T cells (CD4 ⁺ , helper T cells)	ПГЕ₂, IDO, HGF, TGF-β1 и NO PGE ₂ , IDO, HGF, TGF-β1 and NO	↓ CD4⁺Т-клеточной пролиферации (S-, G₀/G₁) ↓ CD4 ⁺ T-cell proliferation by S-phase entry block and G ₀ /G ₁ phase arrest Ингибирование функций Т-клеток Inhibits T-cell functions	↓ пролиферации В-лимфоцитов ↓ B-cell proliferation ↓ продукции Ig/Ат В-лимфоцитами ↓ Ig antibody production by B cells
	IL-10	Инактивация Th1 Inactivate Th1 cells	
Т-клетки (CD8⁺, ЦТЛ) T cells (CD8 ⁺ , cytotoxic T cells)	sHLA-G5	↓ цитотоксичности ↓ cytotoxicity	
T_{reg}-клетки T _{reg} cells	IL-10	↑ количества T_{reg} ↑ T _{reg} production ↑ продукции IL-10 T_{reg} ↑ IL-10 by T _{reg} cells	
	sHLA-G5	↓ дифференцировки T_{reg} ↓ T _{reg} differentiation	
В-клетки Bcells	ПГЕ₂, HGF, TGF-β1 IDO, NO и PD-L1 PGE ₂ , HGF, TGF-β1, IDO, NO and PD-L1	↓ В-клеточной пролиферации (остановка G₀/G₁) ↓ B-cell proliferation by G ₀ /G ₁ phase arrest ↓ продукции Ig/Ат В-лимфоцитами ↓ Ig antibody production by B cells ↓ хемотаксиса В-клеток ↓ B cells chemotaxis	
НК-клетки NK cells	ПГЕ₂, IDO, sHLA-G5, HGF, TGF-β1 PGE ₂ , IDO, sHLA-G5, HGF, TGF-β1	↓ продукции IFNγ ↓ IFNγ ↓ пролиферации НК-клеток ↓ NK cell proliferation ↓ цитотоксичности ↓ cytotoxicity	

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Мишень Target cell	Механизм действия Mechanism	Первичный эффект Primary effect	Вторичный эффект Secondary effect
Моноциты Monocytes	ПГЕ₂ PGE ₂	↓ пролиферации Мн (остановка G ₀ /G ₁) ↓ Monocyte proliferation by G ₀ /G ₁ phase arrest ↓ дифференцировки Мн в ДК ↓ Monocytes difference to DC	
Макрофаги Macrophages	IL-6	↓ TNFα	↓ TNFα и IL-1 ↓ TNFα and IL-1
	TSG-6	↓ NF-κB	↓ синтез MMPs ↓ MMP synthesis
	ПГЕ₂ PGE ₂	Изменяет М1 (провоспалительный) на М2 (антивоспалительный) тип Мф Convert M1 (pro-inflammatory) type to M2 (anti-inflammatory) type macrophages	↓ IL-10, IL-12, TNFα
Нейтрофилы Neutrophils	IL-6	↓ респираторного взрыва ↓ апоптоза ↓ respiratory burst ↓ apoptosis	
Неспецифическое действие No specific target	VEGF	Проангиогенное действие Pro-angiogenic	Улучшение тканевого питания O ₂ Increased nutrient O ₂ and waste transport
	IL-1ra	Антагонист IL-1 Antagonizes IL-1	↓ Т-клеточной пролиферации ↓ T-cell proliferation
	sTNF-R	Ингибирует продукцию TNFα Inhibits TNFα production	↓ продукции IFNγ Th1 ↓ IFNγ by Th1 cells

Примечание. Сокращения: HGF – фактор роста гепатоцитов, HLA – лейкоцитарный антиген человека, IDO – индолеамин 2,3-диоксигеназа, IL-1ra – антагонист рецептора интерлейкина 1, IFN – интерферон, MMP – матриксная металлопротеиназа, МСК – мезенхимальные стволовые клетки, NF-κB – транскрипционный фактор NF-κB, НК – натуральные киллеры, NO – оксид азота, PD-L1 – лиганд мембранного белка, инициирующего апоптоз, ПГЕ₂ – простагландин E2, SDF-1 – стромальный клеточный фактор 1, sTNF-R – растворимый рецептор фактора некроза опухоли альфа, TGF – трансформирующий ростовой фактор, TNF – фактор некроза опухоли, TSG – фактора некроза опухоли альфа стимулирующий ген, VEGF – сосудистый фактор роста.

Note. Abbreviations: HGF – hepatocyte growth factor, HLA – human leukocyte antigen, IDO – indoleamine 2,3-dioxygenase, IL-1ra – IL-1 receptor antagonist, IFN – interferon, MMP – matrix metalloproteinase, MSC – mesenchymal stem cells, NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell, NK – natural killer, NO – nitrous oxide, PD-L1 – programmed cell death ligand-1, PGE₂ – prostaglandin 2, SDF-1 – stromal cell-derived factor-1, sTNF-R – soluble TNFα receptor, TGF – transforming growth factor, TNF – tumor necrosis factor, TSG – tumor necrosis alpha-stimulating gene, VEGF – vascular endothelial growth factor.

генную стимуляцию, который и поддерживает активацию и экспансию Т-лимфоцитов. На модели *in vitro* использования блокирующих антител к IFNγ и при исследовании IFNγ рецептор-негативных МСК показано, что в присутствии МСК IFNγ супрессирует Т-клеточную пролиферацию, а также пролиферации В- и НК-клеток, запуская ингибиторный механизм МСК [91]. В поляризации МСК аналогично типам иммунного ответа Th1/Th2 решающим фактором является концентрация IFNγ и других провоспалительных

цитокинов. Показано, что под влиянием IFNγ МСК проявляют не только ингибиторные свойства, но могут превращаться в АПК, индуцируя специфический иммунный ответ по отношению к различным Аг [147]. МСК могут даже презентировать экзогенные Аг МНС I вследствие кросс-презентации, индуцируя специфический иммунный ответ цитотоксическими CD8⁺Т-лимфоцитами [42]. Однако сложно распространить свойства IFNγ, обнаруженные *in vitro*, на микроокружение *in vivo*, так как локальная

продукция $IFN\gamma$ не может быть измерена. Таким образом, физиологическая роль МСК в качестве АПК, как и ингибиторных клеток, остается неизвестной.

Кроме $IFN\gamma$, в поляризации МСК участвуют другие провоспалительные цитокины ($TNF\alpha$, $IL-1\alpha$ и $IL-1\beta$), усиливая его эффект. $IFN\gamma$ в сочетании с $TNF\alpha$ изменяет фенотип МСК (индукция МНС I, VCAM-1, *de novo* экспрессия МНС II, ингибиторного лиганда B7-H1 (PD-L1 — programmed cell death ligand-1), способствует продукции $IL-8$, $IL-6$, HGF, ПГЕ₂ и активности циклооксигеназы-2, тогда как при действии только $IFN\gamma$ индуцируются только IDO и B7-H1. Следует отметить, что провоспалительное праймирование МСК посредством индукции циклооксигеназы-2 определяет down-регуляцию активности геммоксигеназы-1, что препятствует проявлению ингибиторного эффекта МСК, индукции регуляторных Т-клеток и стимуляции продукции $IL-10$. Кроме того, совместное праймирование $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ приводит к активации супероксиддисмутазы 3, провоспалительного фермента, вовлеченного в катаболизм O_2 , предотвращающего повреждение нейронов. Сочетание $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ индуцирует продукцию хемокинов CCR5, CCR10, CXCL9, CXCL10 и CXCR3, которые вовлечены в хемотаксис и ингибицию пролиферации эффекторных клеток иммунной системы. В итоге данное синергичное действие приводит к продукции NO через индуцибельную NO синтазу, что необходимо для ингибиции Т-клеток *in vitro* и РТПХ *in vivo* [65].

Проявление иммуносупрессивных свойств МСК зависит от различных стимулов, которые могут функционально поляризовать МСК. Важную роль в этом играют TLRs (Toll-like receptors) — семейство некаталитических рецепторов, которые локализованы на клеточной поверхности и цитоплазматической мембране. Они распознают различные молекулы микробного происхождения (PAMPs) и потенциальные сигналы опасности от мертвых клеток. TLRs вовлечены в индукцию врожденного иммунного ответа и в подготовку адаптивного через активацию ДК [135].

МСК экспрессируют TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR9, уровень которых регулируется различными факторами. TLR2 индуцирует продукцию $IL-6$ и пролиферацию клеток, ингибирует адипо-/остео-/хондро- дифференцировку и иммунную модуляцию. TLR3 индуцирует миграцию и, наряду с TLR4, TLR5 и TLR9, продукцию цитокинов/хемокинов $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$, $IL-10$, $TNF\alpha$ и $IL-12p70$. На МСК, выделенных из жировой ткани, показано, что TLR2 индуцирует продукцию цитокинов/хемокинов, в то время как TLR2 и TLR4 усиливают диффе-

ренцировку остеобластов, а TLR9 ингибирует пролиферацию [102, 120].

Экспрессия на МСК TLR3 и TLR4 вызывает особенный интерес. Связывание специфическими лигандами данных рецепторов (poly (I:C) для TLR3 и ЛПС для TLR4) приводит к down-регуляции тирозинкиназы Jagged T. В результате этого МСК не могут связывать Notch1 (Notch homolog 1), экспрессируемый Т-лимфоцитами, что интерферирует с МСК-медирированной иммуномодуляцией. Кроме того, TLR3 и TLR4 определяют индукцию провоспалительных молекул $IL-1$, $IL-6$, $IL-8$, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) и CCL5 и повышают активность индуцибельной NO синтазы, что способствует развитию воспалительного ответа по отношению к патогену [115, 135].

Следует отметить, что условия функциональной поляризации МСК неоднозначны, так как исследователи в этой области использовали различные концентрации лигандов и различное время культивирования. Описаны функции МСК, опосредованные сигналами через TLRs, что аналогично механизмам активации моноцитов/макрофагов (Мн/Мф) через эти рецепторы: $IFN\gamma$ и агонист TLR4 ЛПС определяют провоспалительный тип Мн/Мф (M1-фенотип), $IL-4$ — противовоспалительный с тканево-восстановительными функциями (M2-фенотип). По аналогии, праймирование МСК через TLR4 приводит к продукции в основном провоспалительных цитокинов ($IL-6$, $IL-8$, $TGF-\beta$) и активации Т-клеток (фенотип МСК1). Праймирование МСК через TLR3 приводит к продукции иммуносупрессивных молекул $IL-4$, $IL-1ra$, IDO и ПГЕ₂ (фенотип МСК2) [158]. Но все эти доказательства сложно перенести на систему *in vivo* в силу неконтролируемого влияния лигандов TLRs и одновременного воздействия нескольких цитокинов. Таким образом, МСК обладают пластичностью по отношению к иммунной системе, которая зависит от их способностей отвечать на агонисты TLRs в микроокружении. То есть лиганды TLRs могут влиять на дифференцировку, активацию и реализацию иммунных функций МСК, особенно в контексте инфекций и иммуномедирированных заболеваний, меняя МСК из провоспалительных (TLR4-праймирование) на иммуносупрессивные (TLR3-праймирование) клетки [9, 49, 102].

В действительности после системного введения эффект МСК обусловлен продукцией растворимых факторов в очаге воспаления. МСК определяются в организме всего несколько дней. Клинический эффект МСК при одном и том же заболевании проявляется по-разному, зависит от источника получения клеток, времени/протокола их введения и т.д. Показательным примером является применение МСК на модели ЭАЭ,

где клеточная терапия эффективна при введении клеток на 3–8 день заболевания и совершенно бесполезна на 10–15 сутки после начала заболевания [166]. Вместе с тем показано, что выделенные из жировой ткани МСК способны предупреждать обострение заболевания на модели ЭАЭ не только на начальных этапах, но и после стабилизации заболевания за счет экспрессии на своей поверхности VLA-4, которые взаимодействуют с VCAM-1 на ЭК ГЭБ [29].

Современные направления терапии рассеянного склероза

Тактика терапевтического решения направлена на стратификацию (индивидуализацию) лечения на фоне сомнительного прогноза. При этом первостепенной задачей лечения РС является приостановка прогрессирования заболевания на ранней стадии воспалительного процесса в надежде на его стабилизацию и минимизацию инвалидизации [39, 137]. Основная терапевтическая мишень при РС – иммунная система, воздействие на которую оказывается как по неспецифическому пути (системная иммуносупрессия с использованием цитотоксических препаратов), так и при помощи иммуномодуляции с целью подавления воспалительного процесса, который приводит к демиелинизации [148, 159]. Разработанная терапия, основанная на молекулярно-клеточных механизмах развития заболевания, недостаточна для всех аспектов патогенеза РС вследствие многофакторности заболевания и наличия миелин-/аксон-дегенеративного компонента. Несмотря на присутствие эндогенных олигодендроцитарных предшественников (OPCs, oligodendrocyte progenitor cells) и спонтанной ремиелинизации, на ранних этапах развития РС их уровня и качества, по-видимому, недостаточно для длительного эндогенного функционального восстановления [33].

Инновационная терапия РС основана на использовании препаратов, модифицирующих течение заболевания, к которым относятся β -интерфероны (IFN β), пептидные лиганды, МАТ, а также оральные препараты, включающие финголимод, терифлуномид и диметилфумарат, митоксантрон и др. [1, 3, 62, 84, 105, 123, 136].

Исследование роли TLR-сигнального пути при РС также открывает новые терапевтические мишени для клинических и доклинических исследований [35, 49]. Иммунная система полагается на иммунные рецепторы, распознающие патогенные self- и non-self компоненты и сигналы опасности (danger signals) – PRRs (pattern recognition receptors). PRRs распознают широкий спектр рецепторов, включая TLRs, мембранно-связанный рецептор лектина С-типа, NLRs (nucleotid-binding oligomerization domain-like receptors), RLRs (retinoic acid-inducible gene-I

(RIG-I)-like receptors) [130]. TLRs, как наиболее важные PRRs, взаимодействуют как посредством экзогенных PAMPs, так и посредством эндогенных DAMPs. Такое взаимодействие способствует транскрипции провоспалительных цитокинов в основном через MyD88-сигнальный путь, которые играют критическую роль в патогенезе АИЗ, включая РС. Применение агонистов TLR3 (Poly I:C12U, Ampligen) открывает многообещающую перспективу патогенетического лечения РС [75, 150]. С другой стороны, ингибирование MyD88-сигнального пути с использованием антагонистов TLR2, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 также может быть эффективной. Кроме того, анти-ЛПС терапия и применение растворимых форм TLRs рассматриваются для применения в лечении АИЗ [63]. Однако следует учитывать, что модуляция TLRs может привести к серьезным побочным осложнениям.

Известно, что инфламмасом-формирующие белки NLRP1, NLRP3 и NLRC4 играют решающую роль в секреции IL-1 β и IL-18, представляя тем самым потенциально идеальную терапевтическую цель [43, 70]. Новые данные свидетельствуют о том, что NLRP3 обладает терапевтическим эффектом при РС, аналогично IFN β . Полагают, что IFN β проявляет терапевтическую эффективность путем ослабления биохимических путей NLRP3 и NLRP1 в инфламмасомах и путем ингибирования продукции IL-1 β [54, 71]. Более того, при ЭАЭ эффективность терапии IFN β NLRP3-зависимая, и мыши с отсутствием NLRP3 не чувствительны к IFN β . По результатам клинических исследований показано, что пациенты с РС, чувствительные к терапии IFN β , имели повышенную экспрессию NLRP3 и IL-1 β . Таким образом, NLRP3 может играть определенную роль в эффективности терапии IFN β у пациентов с РС, хотя точный механизм его вовлечения неизвестен [107]. Coll и соавт. (2015) идентифицировали небольшую молекулу MCC950 как потенциальный селективный ингибитор NLRP3 инфламмасомы [26]. Являясь антагонистом секреции IL-1 β , MCC950 снижает продукцию IL-1 β *in vivo*, тяжесть течения ЭАЭ и поэтому имеет значительный терапевтический потенциал при РС.

Таким образом, в идеале патогенетическая терапия РС должна:

1. Подавлять аутоиммунно-воспалительный компонент и проявлять иммуномодулирующую активность.
2. Влиять на нейродегенеративный процесс и являться нейропротекторной.
3. Способствовать структурным и функциональным восстановительным механизмам – ремиелинизации [133].

Исходя из этого, стратегия клеточной терапии с использованием МСК является перспективной альтернативой для лечения РС.

Двойственная природа МСК как стволовых (дифференцировка в различные клетки мезодермального происхождения) и стромальных клеток (регуляция активности и состояния гемопоэтических стволовых клеток через паракринные механизмы) представляет их преимущество в плане адаптации к невральному микроокружению при патологическом процессе в ходе развития РС [24, 141, 142]. В отличие от невральных и олигодендроцитарных предшественников, которые находятся в ЦНС, и, следовательно, их можно получить только инвазивным путем, МСК достаточно доступны для выделения из тканей организма человека. МСК обладают стромальными свойствами и запускают иммуномодулирующую и нейрорепрессивную активность, влияют на судьбу олигодендроцитов и дифференцировку/созревание взрослых невральных предшественников, что предполагает существование регулируемой МСК ремиелинизирующей активности [19, 66, 132]. Кроме того, трансплантированные МСК способствуют функциональному восстановлению миелина, что продемонстрировано на различных экспериментальных моделях [124, 133, 166, 170]. Jaramillo-Merchán и соавт. (2013) показали, что при хронической демиелинизации белого вещества трансплантированные МСК активируют OPCs и индуцируют ремиелинизацию в ткани вокруг трансплантированных клеток [74]. Однако факторы, способствующие ремиелинизации хронических очагов при РС, изучены недостаточно.

В связи с иммунопривилегированностью МСК и выраженными иммуномодулирующими свойствами, трансплантация данных клеток в организм человека позволяет избежать реакций иммунологического отторжения и проведения дополнительной иммуносупрессии организма [16, 47, 92].

В настоящее время показано, что Т-клеточная пролиферация может быть супрессирована активированными *in vitro* МСК. МСК эффект на Т-клеточную пролиферацию *in vitro* обусловлен как контакт-зависимыми, так и контакт-независимыми механизмами [6, 164]. Данное заключение базируется на полученных результатах о том, что кондиционированная среда, полученная от культур МСК, активированных или в комбинации с цитокинами (IL-1 β , TNF α , IFN γ) или при кокультивировании с аллогенными мононуклеарами периферической крови, позволяет снижать митоген-индуцированную Т-клеточную пролиферацию [46, 48, 98]. При этом IFN γ является основным цитокином, праймирующим МСК *in vitro*, и, теоретически, может пересекать-

ся/отражать функцию МСК [91]. Огромным недостатком интерпретации является отсутствие соотношения этих данных с эффективностью применения МСК по результатам исследований различных групп [142]:

1. Отсутствует разработанный способ, позволяющий коррелировать способность МСК снижать Т-клеточную пролиферацию с их потенциальным терапевтическим эффектом.

2. Индивидуальные образцы/серии МСК проявляют разнообразную супрессивную способность *in vitro*, но является ли это прогнозом такой возможности *in vivo* в значительной степени, неизвестно.

3. Эффект МСК *in vivo* является плеiotропным, определяется локальным микроокружением и теряется при клеточном контакте *in vitro*.

Остается дискуссионным вопрос, является ли клиническое улучшение заболевания следствием клеточного замещения олигодендроцитов, последующей активации ремиелинизации и защиты аксонов, или это результат иммунологических эффектов [8, 61, 114].

Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита

В биологии МСК не решены вопросы, требующие исследований *in vivo* на животных моделях. В течение последних десятилетий несколько исследовательских групп наблюдали снижение демиелинизации, модуляцию воспаления и усиление функционального восстановления, стимуляцию нейрорепрессии и регенерацию поврежденной области на модели ЭАЭ [46, 50, 51, 83, 168, 170]. На сегодняшний день ЭАЭ является единственной моделью для изучения влияния новых методов терапии РС *in vivo*. Результаты, полученные при анализе ЭАЭ, лежат в основе различных современных концепций и понимания патофизиологии РС. Исследователи иммунизируют животных миелиновыми белками или иммуогенными пептидами в комбинации с адьювантом, что приводит к мультифокальному воспалению, демиелинизации и аксональному повреждению в ЦНС. В зависимости от природы иммуногена и генетических особенностей (фона) животных можно индуцировать или рецидивно-ремиттирующее течение, аналогичное ранним стадиям РС, или хронический процесс, аналогичный прогрессивному течению РС. Эта модель информативна как в плане изучения иммунологических механизмов, приводящих к повреждению ткани, так и для определения потенциальных терапевтических подходов. Несмотря на то, что большинство исследователей считают ЭАЭ валидной моделью РС, некоторые авторы настроены скептически, полагая, что ЭАЭ отражает только процессы, развивающиеся при остром распространенном энцефаломиелите [12,

24]. При остром и хроническом ЭАЭ внутривенное введение МСК улучшает клиническое течение заболевания [79, 170], снижает клеточную инфильтрацию, демиелинизацию и повреждение аксонов. Потенциальный механизм включает иммуномодуляцию как иммунопатологического процесса, так и ответа ЦНС на воспалительные реакции [78].

При ЭАЭ, индуцированном пептидами МОГ₃₅₋₅₅ или ПЛП₁₃₉₋₁₅₁, лечение МСК костномозгового происхождения уменьшает относительное количество IFN γ -продуцирующих спленоцитов при одновременном увеличении количества IL-4-секретирующих клеток. Предполагается, что МСК редуцируют провоспалительные Th1 и увеличивают ингибирующее влияние Th2 при воспалении на модели ЭАЭ [10]. Вследствие *in vitro* стимуляции спленоцитов, полученных от животных с ЭАЭ, индуцированного МОГ₃₅₋₅₅ и пролеченных МСК, уровень Th1/Th17 воспалительных цитокинов (IFN γ , IL-17, IL-2, IL-12p70, и TNF α) достоверно снижался, в то время как уровень противовоспалительных Th2 цитокинов (IL-4 и IL-5) увеличивался [167]. Кроме того, МСК непосредственно секретируют широкий спектр субстанций, обеспечивающих трофическое питание поврежденной нервной ткани, в том числе и противовоспалительные цитокины IL-10 и TGF- β , способные индуцировать экспрессию протективного фенотипа иммунных клеток и запускать процессы ремиелинизации [78, 83, 160].

Некоторые исследования на модели ЭАЭ показывают, что только незначительное количество МСК детектируется в ЦНС реципиента [46]. Большинство трансплантированных МСК мигрируют в лимфатические узлы и селезенку. Учитывая вышесказанное, можно предположить, что при ЭАЭ положительный эффект на клиническое течение заболевания и патологический процесс связан с ингибированием периферических энцефалитогенных Т-клеток [38].

Однако существуют доказательства положительного воздействия МСК при ЭАЭ также за счет более прямого влияния на реакции со стороны нервных клеток при воспалительном процессе в ЦНС. Ранее считалось, что при соответствующей стимуляции МСК могут дифференцироваться в клетки немезенхимального происхождения, включая невральные клетки (non-mesenchymal lineages) — так называемая трансдифференцировка, эктопические маркеры которой неясны [76]. При этом исследования с использованием меченых МСК не доказывают, что трансплантированные клетки приобретают свойства нервных клеток [10]. Вероятно, трансплантированные МСК продуцируют растворимые факторы, поддерживающие развитие внутренних/собственных нервных клеток [132].

Таким образом, широкий спектр исследований на животных подтверждает гипотезу, что МСК поддерживают, скорее, эндогенные механизмы восстановления, чем дифференцируются непосредственно в восстановительный элемент. Нейропротективные механизмы стимуляции восстановления ЦНС, возможно, обусловлены продукцией нейротрофических факторов МСК. Введение кондиционированной среды от МСК, содержащей HGF, способствует генерации и олигодендроцитов, и нейронов при ЭАЭ, индуцированном МОГ₃₅₋₅₅ [11, 132].

В дополнение к воздействию на клеточную пролиферацию, МСК выраженно влияют на Т-клеточную дифференцировку. На модели ЭАЭ МСК снижают провоспалительный Th1- и Th17-ответы и способствуют противовоспалительному Th2-ответу. Объяснения данного эффекта, полученного на экспериментальной модели, до сих пор не имеется. Доклинические исследования с использованием МСК человека показали, что как фетальные, так и взрослые клетки или их продукты секреции могут парадоксально увеличивать Th17-ответ, причем данный эффект резко усиливается при преколонизации с IL-1 β .

Показана способность МСК дифференцироваться в невральные и глиальные клетки преимущественно *in vitro* (при химической индукции или использовании факторов роста), а также их потенциал в отношении нейрорегенерации на модели поражения нервной ткани *in vivo*. Трансплантация МСК стимулирует олигодендрогенез, пролиферацию, миграцию и дифференцировку эндогенных НСК, повышает выживаемость нервных клеток, активизирует нейрогенез, защищает нейроны от оксидативного стресса посредством секреции нейротрофинов, таких как нейротрофический фактор головного мозга и фактор роста нервов, других нейрорегуляторных молекул (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки).

В настоящее время получены данные о том, что после инфузии *in vivo* МСК распределяются в разных органах неравномерно. Важной особенностью является то, что МСК мигрируют преимущественно в очаги поражений, что позволяет предположить их способность реагировать на локальное микроокружение и приводить к функциональному восстановлению ткани. Их способность пересекать базальную мембрану регулируется металлопротеиназами, которые секретируются МСК под влиянием воспалительных цитокинов, таких как TNF α , TGF- β 1 и IL-1 β . Более того, МСК экспрессируют на своей поверхности определенный набор функциональных хемокиновых рецепторов, таких как хемокиновый рецептор 4-го типа, который играет важную роль в распознавании места повреждения. МСК также

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МСК В ТЕРАПИИ РС [22]

TABLE 2. CLINICAL TRIALS OF MSC-BASED THERAPY OF MULTIPLE SCLEROSIS [22]

Фаза (годы) Phase (years)	Цель исследования Purpose of the study	Тип течения PC MS form	Кол-во пациентов Enrollment	Тип клеток, способ введения Assigned interventions	Руководитель, страна Investigator, location
I (2011-2014)	Безопасность, осуществимость, переносимость Safety, feasibility, tolerability	РР, ВП, ПР RR, SP, PR	24	Аутологичные, в/в, 2 млн/кг Autologous, intravenously, 2 mln/kg	Jeffrey A Cohen, USA
I (2014-2017)	Безопасность, переносимость Safety, tolerability	ПП, ВП PP, SP	18	Аутологичные МСК- нейральные проге- ниторные клетки, интратекально, 2-10 млн, трехкратно Autologous MSC-NP, intrathecally, 2-10 mln, 3 doses	Saud A Sadiq, USA
I, II (2015-2017)	Безопасность, осуществимость, переносимость Safety, feasibility, tolerability	РР, ВП, ПР RR, SP, PR	12	Аутологичные, в/в, 1-2 млн/кг, двукратно Autologous, intravenously, 1-2 mln/kg, 2 doses	Clanet Michel, France
I, II (2015-2017)	Безопасность, осуществимость, переносимость Safety, feasibility, tolerability	РР RR	69	Аллогенные МСК пуповинной крови, в/в 50 млн и интра- текально 100 млн Allogeneic UC-MSC, intravenously 50 mln, intrathecally 100 mln	Bill Brashier, Три- нидад и Тобаго Bill Brashier, Trinidad and Tobago
I (2015-2016)	Безопасность, эффективность Safety, efficacy	РР, ВП, ПР RR, SP, PR	40	Аутологичные, в/в, 1-2 млн/кг Autologous, intravenously, 1-2 mln/kg	Mark S. Freedman, Canada
IIa (2014-2016)	Определение оп- тимальной дозы и пути введения Optimal dosage and the way of administration	РР, ВП RR, SP	36	Аутологичные, в/в, интратекально, в/в и интратекально Autologous, intravenously, intrathecally, intravenously and intrathecally	Dimitrios Karussis, Israel

Примечание. РР – рецидивно-ремиттирующая форма РС, ПП – первично-прогрессивная форма РС, ВП – вторично-прогрессивная форма РС, ПР – прогрессирующе-ремиттирующая форма РС.

Note. RR, relapsing remitting multiple sclerosis; PP, primary progressive multiple sclerosis; SP, secondary progressive multiple; PR, progressive relapsing multiple sclerosis.

Abbreviations: MS, multiple sclerosis; MSC, mesenchymal stem cells; MSC-NP, mesenchymal stem cell-derived neural progenitor cells; UC-MSC, human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells.

экспрессируют специфические функциональные рецепторы, которые при стимуляции модулируют способность самих МСК к пролиферации и дифференцировке [36].

Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток пациентам с рассеянным склерозом

Несмотря на клиническое использование МСК в неврологии, механизмы терапевтического эффекта неясны вследствие неполного понимания биологии МСК и их пути после трансплантации *in vivo* [80, 154]. Публикации по применению МСК для лечения РС имеют сдержанный, но все же многообещающий характер. В настоящее время зарегистрировано более 50 клинических испытаний по лечению РС с использованием МСК [17, 22, 27]. Характеристика некоторых из них представлена в таблице 2.

Connick и соавт. (2011) опубликовали результаты клинического использования МСК (фаза IIa) для лечения пациентов с вторично-прогрессивной формой РС, которым однократно ввели $1,1-2,0 \times 10^6$ клеток/кг массы тела, подтвердив безопасность и выраженную положительную динамику неврологического статуса со снижением степени инвалидизации по EDSS (Expanded Disability Status Scale) в течение 12 месяцев после клеточной терапии при отсутствии изменений со стороны когнитивных функций, размеров очагов поражения и объема ткани головного мозга [28]. Кроме этого, Karussis и соавт. (2010) и Yamout и соавт. (2010) указывают на несущественные побочные эффекты и улучшение неврологического статуса пациентов по шкале EDSS в течение 6 месяцев посттрансплантационного периода. Улучшение неврологического статуса отмечалось не более чем в течение 12 месяцев после терапии, что обосновывает возможность повторного введения клеточных культур для продления терапевтического эффекта МСК. Для окончательного заключения об эффективности терапии необходимо более длительное наблюдение [81, 162].

Предполагаемые механизмы терапевтического эффекта:

1. Трансдифференцировка МСК в нейроны и/или олигодендроциты (пластичность).
2. Иммунорегуляторный эффект трансплантированных МСК (иммуномодуляция).
3. Опосредованный эффект МСК на выживание поврежденных нейронов и/или олигодендроглии (нейропротекция).
4. Опосредованный эффект МСК на состояние и дифференцировку эндогенных предшественников NPCs или OPCs, присутствующих в поврежденной области (ремиелинизация).

По итогам многочисленных исследований по изучению пути введения МСК для лечения РС показано, что системное введение является предпочтительным методом. Системное введение

МСК запускает механизмы дистальных (эндокринных) и локальных (паракринных) эффекторов, которые включают клеточно-медиаторные действия:

1. Стимуляция ангиогенеза: VEGF, IGF-1, MCP-1, FGF- β , IL-6.
2. Пролиферация и дифференцировка стволовых клеток: SCF (stem cell factor), M-CSF, SDF-1 (stromal derived factor-1), ангиопоэтин и актин.
3. Ингибция фиброза: HGF, FGF- β , адено-медуллин.
4. Ингибция апоптоза: VEGF, HGF, IGF-1, TGF- β , FGF- β , GM-CSF, активин А и тромбоспондин 1.

и иммуномедиаторные эффекты:

1. Супрессия Т- и В-клеток: HLA-G5, HGF, индуцибельная NO синтаза (iNOS), IDO, ПГЕ₂, FGF- β и TGF- β .
2. Регуляция дифференцировки T_{reg} и экспансии под влиянием TGF- β .
3. Ингибция НК за счет секреции IDO, ПГЕ₂, TGF- β .
4. Ингибция созревания ДК за счет секреции ПГЕ₂.

Прямые эффекты МСК заключаются в трансдифференцировке и индукции регенеративных процессов [40].

Официальные зарегистрированные продолжающиеся клинические испытания фокусируются преимущественно на безопасности и доказательности/обоснованности концепции. В будущем для адекватной оценки эффективности клеточной терапии клинические испытания должны быть направлены на уточнение следующих вопросов:

Доза клеточного трансплантата

Большинство исследователей использует 1-2 млн клеток/кг массы тела, исходя из возможностей культурального наращивания. Доказано, что данная доза безопасна, хотя имеются публикации о безопасном введении до 10 млн клеток/кг массы тела при других заболеваниях [28, 81, 86].

Поддержание оптимального культурального режима

Многочисленные факторы влияют на получение клеточной культуры, сохранение жизнеспособности, терапевтической эффективности и т.д. Важный момент культивирования — использование сыворотки. Накоплен огромный опыт применения эмбриональной телячьей сыворотки, которая может являться переносчиком инфекционных заболеваний и вызывать развитие аллергических реакций. Таким образом, приоритетно использовать бессывороточные среды, для чего необходимо валидизировать методы с включением оценки динамики роста и выхода конечного продукта клеток, экспрессии поверхностных маркеров, дифференцировочного потенциала,

иммуномодулирующих свойств, анализа хромосомных aberrаций и жизнеспособности криоконсервированных культур. Следующее сообщение касается того, можно ли праймировать или генетически модифицировать МСК для улучшения выживаемости и тканеспецифического хоуминга культур [157]. В случае РС для модификации МСК выделяют два потенциальных кандидата — цилиарный нейротрофический фактор и HGF [11, 104].

Способ введения

При внутривенном введении показано, что в пределах здоровой ткани грызунов и приматов МСК мигрировали преимущественно в легкие, а также определялись в печени, почках, костном мозге, селезенке, тимусе, сердце, костях, мышцах. МСК способны мигрировать и в очаг поражения/повреждения ткани, что показано при инсульте, хроническом отторжении сердечного трансплантата, травматическом повреждении головного мозга и др. [20, 103]. При анализе результатов лечения РС данные противоречивы: одни авторы указывают на миграцию МСК в ЦНС при хроническом ЭАЭ на модели мышей, другие описывают миграцию МСК только в лимфатические узлы и селезенку, но не в ЦНС [46, 166]. Внутриаггартальное введение продемонстрировано при лечении острой и хронической сердечной недостаточности. Интраназальное введение описано в неврологии [32]. Connick и соавт. (2012) для терапии РС применили внутривенную администратцию [28]. Другие использовали интратекальный путь введения, некоторые — комбинацию внутривенного и интратекального [17, 81, 101, 131, 162]. В большинстве случаев используется внутривенное введение вследствие безопасности и выполнимости процедуры.

Продолжительность эффекта

Степень приживления и жизнеспособность клеточного трансплантата в организме человека точно не определены. После трансплантации в организме реципиента донорские МСК выявить трудно. Кроме того, публикации по этой проблеме пока немногочисленны. На аутопсийном материале определяется только незначительное количество ДНК [156], и не обнаружена корреляция между приживляемостью клеточного трансплантата и степенью клинического эффекта. Отсутствуют данные о продолжительности клинического эффекта вследствие трансплантации. Тем не менее, учитывая ограниченную способность к самоподдержанию, рекомендуется повторное введение МСК, хотя возможна и сенсibilизация организма человека, особенно в случае введения аллогенных культур.

Использование аутологических или аллогенных культур

Относительные преимущества аутологичной vs аллогенной трансплантации МСК широко обсуждаются без наличия объективных доказательств превосходства одного вида клеточной терапии над другим [109], и предположение об использовании аутологических или аллогенных культур при лечении РС остается спорным. Некоторые исследователи полагают, что у пациентов с АИЗ МСК могут быть дефектными в отношении иммуномодулирующих, тканепротективных и репаративных возможностей. Larghero и соавт. (2008) поддерживают аутологичную трансплантацию МСК, демонстрируя у пациентов с системным склерозом аналогичные в сравнении с показателями здоровых доноров пролиферативные и иммуносупрессивные свойства МСК костного мозга [95]. Однако Koh и соавт. (2012) указывают на сниженную плюрипотентную и нейротрофическую способность МСК костного мозга пациентов с боковым амиотрофическим склерозом [87]. Кроме того, показано снижение миграционной способности МСК у пациентов с БАС вследствие снижения экспрессии одного из внутриклеточного фактора β -PIX, вовлеченного в клеточную миграцию, что объясняет неудачи клеточной терапии с использованием аутологических культур [88].

Аллогенная трансплантация возможна вследствие минимальной иммуногенности МСК. *In vitro* МСК не вызывают пролиферацию, лизис аллогенных Т-клеток и продукцию провоспалительных цитокинов [85, 97, 128]. *In vivo* аллогенные и ксеногенные МСК не отторгаются у мышей, и многочисленные исследования демонстрируют, что аллогенные МСК не отторгаются и у человека [59, 101]. Преимуществом аллогенных культур является возможность их применения при острых состояниях (инфаркт миокарда, инсульт или обострение при РС). Более того, абсолютно необходимо использовать аллогенные МСК при лечении генетических заболеваний [86]. Тем не менее, существует несколько практических вопросов, касающихся использования аллогенных культур: всесторонняя сертификация донорских клеток в отношении инфекции и малигнизации; проблематичность повторной трансплантации, что рекомендуется при РС, возможная сенсibilизация организма и образование клеток-памяти, как это показано на экспериментальных моделях [163].

Заключение

За последние десятилетия терапевтические подходы к лечению РС кардинально изменились.

В настоящее время основной целью является разработка методов лечения, основанных на индукции толерантности и активации собственных иммунорегуляторных механизмов. Перспективным направлением селективной антиген-специфической иммунотерапии является использование пептидных лигандов, ДНК- и Т-клеточной вакцинации, а также индукции оральной толерантности. Однако сложности в идентификации конкретных эпитопов аутоАг, вовлеченных в аутоиммунный процесс, ограничивают широкое внедрение данных методов терапии.

Результаты клинических исследований по применению клеточной терапии МСК у пациентов с РС указывают на ее эффективность и безопасность. Тем не менее, существует ряд проблем:

- отсутствие унифицированной интерпретации результатов различными исследовательскими группами вследствие: а) индивидуальных свойств МСК проявлять супрессивную способность *in vitro*, что затрудняет прогнозирование их возможностей *in vivo*; б) плеiotропного эффекта МСК *in vivo*, который определяется локальным микроокружением и теряется при клеточном контакте *in vitro*; в) отсутствия разработанного способа, позволяющего сопоставлять способность МСК снижать Т-клеточную пролиферацию с их потенциальным терапевтическим эффектом;

- усовершенствование критериев включения и исключения пациентов для клеточной терапии;
- сравнительная эффективность различных протоколов трансплантации;

- дальнейшее изучение биологии стволовых клеток, механизмов действия, путей миграции МСК и др. для оптимизации клинического использования клеточных технологий в патогенетической терапии РС.

Демонстрация успешности клеточной терапии при РС возможна только после глубокого изучения и понимания биологии и механизмов межклеточного взаимоотношения при применении МСК. Для оценки регуляторного эффекта МСК на течение аутоиммунного процесса при РС *in vivo* необходимо создание адекватной *in vitro* модели МСК-индуцированной иммуносупрессии. Предварительная *in vitro* оценка иммуносупрессивного потенциала МСК у пациентов с РС может представлять собой исключительный интерес с точки зрения разработки специфических методов прогнозирования терапевтической эффективности и персонализации протокола лечения, что позволит уменьшить число рецидивов и, в свою очередь, будет иметь экономическую и социальную значимость.

Список литературы / References

1. Лихачев С.А., Забродец Г.В., Ровбут С.М., Голец Ю.Н., Буняк А.Г., Редут В.В., Франчук К.А., Наумова Г.И., Багинский Ф.В., Кулеш С.Д., Орловская Т.Ю., Тумилович Е.Н., Гетманова А.О. Опыт лечения рассеянного склероза с использованием рекомбинантного человеческого интерферона бета – 1a Ребиф // Медицинские новости, 2012. № 1. С. 49-53. [Likhachev S.A., Zabrodets G.V., Rovbut S.M., Golets Yu.N., Bunyak A.G., Reduto V.V., Franchuk K.A., Naumova G.I., Baginsky F.V., Kulesh S.D., Orlovskaya T.Yu., Tumilovich E.N., Getmanova A.O. The experience of disseminated sclerosis treatment using recombinant human interferon beta-1a Rebif. *Meditsinskie novosti = Medical News*, 2012, no. 1, pp. 49-53. (In Russ.)]
2. Маянская И.В., Гоганова Ю.А., Толкачева Н.И. Иммуносупрессивное действие мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток // Иммунология, 2013. Т. 34, № 2. С. 122-128. [Mayanskaya I.V., Goganova Yu.A., Tolкачева N.I. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem (stromal) cells. *Immunologiya = Immunology*, 2013, Vol. 34, no. 2, pp. 122-128. (In Russ.)]
3. Переседова А.В., Завалишин И.А., Адарчева Л.С., Аскарова Л.Ш., Захарова М.Н., Елисева Д.Д., Ниязбекова А.С., Стойда Н.И., Трифонова О.В. Глатирамера ацетат (Копаксон) в лечении рассеянного склероза. Результаты длительного применения: возникающие вопросы и направления дальнейших исследований // Нервные болезни, 2012. № 4. С. 26-30. [Peresedova A.V., Zavalishin I.A., Alarcheva L.S., Askarova L.Sh., Zakharova M.N., Eliseeva D.D., Niyazbekova A.S., Trifonova O.V. Glatiramera atsetat (Kopakson) v lechenii rasseyannogo skleroza. Resultaty dlitelnogo primeneniya: vznukayushchie voprosy i napravleniya. *Nervnye bolezni = Nervous Diseases*, 2012, no. 4, pp. 26-30. (In Russ.)]
4. Пивнева Т.А. Механизмы демиелинизации при рассеянном склерозе // Нейрофизиология, 2009. Т. 41, № 5. С. 429-437. [Pivneva T.A. Demyelinating mechanisms in multiple sclerosis. *Neyrofiziologiya = Neurophysiology*, 2009, Vol. 41, no. 5, pp. 429-437. (In Russ.)]
5. Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. Под ред. Е.И. Гусева, И.А. Завалишина, А.Н. Бойко. М.: Миклош, 2004. 540 с. [Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. Ed. by E.I. Gusev, I.A. Zavalishin, A.N. Boiko]. Moscow: Miklosh, 2004. 540 p.
6. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 4, pp. 1815-1822.
7. Allan G.M., Cranston L., Lindblad A., McCormack J., Kolber M.R., Garrison S., Korownyk C. Vitamin D: a narrative review examining the evidence for ten beliefs. *J. Gen. Intern. Med.*, 2016, Vol. 31, no. 7, pp. 780-791.
8. Auletta J.J., Bartholomew A.M., Maziars R.T., Deans R.J., Miller R.H., Lazarus H.M., Cohen J.A. The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. *Immunotherapy*, 2012, Vol. 4, no. 5, pp. 529-547.

9. Auletta J., Deans R., Bartholomew A. Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense. *Blood*, 2012, Vol. 23, no. 119, pp. 1801-1809.
10. Bai L., Lennon D.P., Eaton V., Maier K., Caplan A.I., Miller S.D., Miller R.H. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*, 2009, Vol. 57, no. 11, pp. 1192-1203.
11. Bai L., Lennon D.P., Caplan A.I., DeChant A., Hecker J., Janet Kranso J., Zaremba A., Miller R.H. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nat. Neurosci.*, 2012, Vol. 15, no. 6, pp. 862-870.
12. Baker D., Jackson S.J. Models of multiple sclerosis. *Adv. Clin. Neurosci. Rehabil.*, 2007, Vol. 6, no. 6, pp. 10-12.
13. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., McIntosh K., Patil S., Hardy W., Devine S., Ucker D., Deans R., Moseley A., Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.*, 2002, Vol. 30, no. 1, pp. 42-48.
14. Benvenuto F., Ferrari S., Gerdoni E., Gualandi F., Frassoni F., Pistoia V., Mancardi G., Uccelli A. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*, 2007, Vol. 25, no. 7, pp. 1753-1760.
15. Berge T., Leikfoss I.S., Brorson I.S., Bos S.D., Page C.M., Gustavsen M.W., Bjølgerud A., Holmøy T., Celius E.G., Damoiseaux J., Smolders J., Harbo H.F., Spurkland A. The multiple sclerosis susceptibility genes TAGAP and IL2RA are regulated by vitamin D in CD4⁺ T cells. *Genes Immun.*, 2016, Vol. 17, no. 2, pp. 118-127.
16. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 2001, Vol. 19, no. 3, pp. 180-192.
17. Bonab M.M., Sahraian M.A., Aghsaie A., Karvigh S.A., Hosseinian S.M., Nikbin B., Lotfi J., Khorramnia S., Motamed M.R., Togha M., Harirchian M.H., Moghadam N.B., Alikhani K., Yadegari S., Jafarian S., Gheini M.R. Autologous mesenchymal stem cell therapy in progressive multiple sclerosis: an open label study. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 2012, Vol. 7, no. 6, pp. 407-414.
18. Caplan A.I. Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem Cells Int.*, 2015, Vol. 2015.
19. Chandran S., Hunt D., Joannides A., Zhao C., Compston A., Franklin R.G.M. Myelin repair: the role of stem and precursor cells in multiple sclerosis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2008, Vol. 363, no. 1489, pp. 171-183.
20. Chen J., Li Y., Wang L., Zhang Z., Lu D., Lu M., Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2001, Vol. 32, no. 4, pp. 1005-1011.
21. Claes N., Fraussen J., Stinissen P., Hupperts R., Somers V. B Cells are multifunctional players in multiple sclerosis pathogenesis: insights from therapeutic interventions. *Front Immunol.*, 2015, Vol. 6, p. 642.
22. Clinicaltrials.gov: A service of the U.S. National Institutes of Health. URL: <https://clinicaltrials.gov>.
23. Cocuzza C.C., Piazza F., Musumeci R., Oggioni D., Andreoni S., Gardinetti M., Fusco L., Frigo M., Banfi P., Rottoli M.R., Confalonieri P., Rezzonico M., Ferrò M.T., Cavaletti G., Reindl M. Quantitative detection of Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid and blood samples of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 4, e94497. doi: 10.1371/journal.pone.0094497.
24. Cohen J.A. Mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, 2013, Vol. 333, no. 1/2, pp. 43-49.
25. Coles A.J., Wing M.G., Molyneux P., Paolillo A., Davie C.M., Hale G., Miller D., Waldmann H., Compston A. Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*, 1999, Vol. 46, no. 3, pp. 296-304.
26. Coll R.C., Robertson A.A., Chae J.J., Higgins S.C., Muñoz-Planillo R., Inserra M.C., Vetter I., Dungan L.S., Monks B.G., Stutz A., Croker D.E., Butler M.S., Haneklaus M., Sutton C.E., Núñez G., Latz E., Kastner D.L., Mills K.H., Masters S.L., Schroder K., Cooper M.A., O'Neill L.A. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.*, 2015, Vol. 21, no. 3, pp. 248-255.
27. Connick P., Kolappan M., Patani R., Scott M.A., Crawley C., He X.L., Richardson K., Barber K., Webber D.J., Wheeler-Kingshott C.A., Tozer D.J., Samson R.S., Thomas D.L., Du M.Q., Luan S.L., Michell A.W., Altmann D.R., Thompson A.J., Miller D.H., Compston A., Chandran S. The mesenchymal stem cells in multiple sclerosis (MSCIMS) trial protocol and baseline cohort characteristics: an open-label pre-test: post-test study with blinded outcome assessments. *Trials*, 2011, Vol. 12, p. 62.
28. Connick P., Kolappan M., Crawley C., Webber D.J., Patani R., Michell A.W., Du M.Q., Luan S.L., Altmann D.R., Thompson A.J., Compston A., Scott M.A., Miller D.H., Chandran S. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol.*, 2012, Vol. 11, no. 2, pp. 150-156.
29. Constantin G., Marconi S., Rossi B., Angiari S., Calderan L., Anghileri E., Gini B., Bach S.D., Martinello M., Bifari F., Galiè M., Turano E., Budui S., Sbarbati A., Krampera M., Bonetti B. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells*, 2009, Vol. 27, no. 10, pp. 2624-2635.
30. Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V., Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 2005, Vol. 107, no. 1, pp. 367-372.
31. Correale J., Flores J., Bonitto J.C., Rodríguez C.C., Oliveira E.M.L. Use of fingolimod in the management of relapsing-remitting multiple sclerosis: experience from Latin America. *Adv. Ther.*, 2015, Vol. 32, no. 7, pp. 612-625.
32. Danielyan L., Schäfer R., von Arnim-Mayerhofer A., Bernhard F., Verleysdonk S., Buadze M., Lourhmati A., Klopfer T., Schaumann F., Schmid B., Koehle C., Proksch B., Weissert R., Reichardt H.M., van den Brandt J., Buniatian G.H., Schwab M., Gleiter C.H., Frey W.H. Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease. *Rejuvenation Res.*, 2011, Vol. 14, no. 1, pp. 3-16.

33. Darlington P.J., Boivin M.N., Bar-Or A. Harnessing the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *Expert Rev. Neurother.*, 2011, Vol. 11, no. 9, pp. 1295-1303.
34. Dazzi F., Ramasamy R., Glennie S., Jones S.P., Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.*, 2006, Vol. 20, no. 3, pp. 161-171.
35. DelaRosa O., Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm.*, 2010, Vol. 2010, Article ID 865601.
36. Devine S.M., Cobbs C., Jennings M., Bartholomew A., Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 2003, Vol. 101, no. 8, pp. 2999-3001.
37. di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P.D., Matteucci P., Grisanti S., Gianni A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002, Vol. 99, no. 10, pp. 3838-3843.
38. Einstein O., Fainstein N., Vaknin I., Mizrachi-Kol R., Reihartz E., Grigoriadis N., Lavon I., Baniyash M., Lassmann H., Ben-Hur T. Neural precursors attenuate autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunosuppression. *Ann. Neurol.*, 2007, Vol. 61, no. 3, pp. 209-218.
39. Fernandez O., Arnal-Garcia C., Arroyo-Gonzalez R., Brieva L., Calles-Hernandez M.C., Casanova-Estruch B., Comabella M., de Las Heras V., Garcia-Merino J.A., Hernandez-Perez M.A., Izquierdo G., Matas E., Meca-Lallana J.E., Mendibe-Bilbao M.M., Munoz-Garcia D., Olascoaga J., Oreja-Guevara C., Prieto J.M., Ramio-Torrenta L., Rodriguez-Antiguedad A., Saiz A., Tellez N., Villar L.M., Tintore M., Grupo Post-Ectrims Grupo Post-Ectrims. Review of the novelties presented at the 28th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) (II). *Rev. Neurol.*, 2013, Vol. 57, no. 6, pp. 269-281.
40. Figueroa F.E., Carrión F., Villanueva S., Khoury M. Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: critical review. *Biol. Res.*, 2012, Vol. 45, no. 3, pp. 269-277.
41. Fox E.J., Wynn D., Coles A.J., Palmer J., Margolin D.H. Alemtuzumab improves neurological functional systems in treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *J. Neurol. Sci.*, 2016, Vol. 363, pp. 188-194.
42. François M., Romieu-Mourez R., Stock-Martineau S., Boivin M.N., Bramson J.L., Galipeau J. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 13, pp. 2632-2638.
43. Freeman L.C., Ting J.P. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.*, 2016, Vol. 136, Suppl. 1, pp. 29-38.
44. Furtado G.C., Marcondes M.C.G., Jo-Ann Latkowski J.A., Tsai J., Wensky A., Lafaille J.J. Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 7, pp. 4648-4655.
45. Gajofatto A., Benedetti M.D. Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop? *World J. Clin. Cases*, 2015, Vol. 3, no. 7, pp. 545-555.
46. Gerdoni E., Gallo B., Casazza S., Musio S., Bonanni I., Pedemonte E., Mantegazza R., Frassoni F., Mancardi G., Pedotti R., Uccelli A. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.*, 2007, Vol. 61, no. 3, pp. 219-227.
47. Gharibi T., Ahmadi M., Seyfizadeh N., Jadidi-Niaragh F., Yousefi M. Immunomodulatory characteristics of mesenchymal stem cells and their role in the treatment of multiple sclerosis. *Cell Immunol.*, 2015, Vol. 293, no. 2, pp. 113-121.
48. Glenn J.D., Whartenby K.A. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J. Stem Cells*, 2014, Vol. 6, no. 5, pp. 526-539.
49. Gooshe M., Aleyasi A.R., Abdolghaffar A.H., Rezae N. Toll like receptors: a new hope on the horizon to treat multiple sclerosis. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 10, no. 10, pp. 1277-1279.
50. Gordon D., Pavlovskaya G., Glover C.P., Uney J.B., Wraith D., Scolding N.J. Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration. *Neurosci. Lett.*, 2008, Vol. 448, no. 1, pp. 71-73.
51. Gordon D., Pavlovskaya G., Uney J.B., Wraith D.C., Scolding N.J. Human mesenchymal stem cells infiltrate the spinal cord, reduce demyelination, and localize to white matter lesions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2010, Vol. 69, no. 11, pp. 1087-1095.
52. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *J. Nat. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 9, no. 6, pp. 393-407.
53. Gris D., Ye Z., Iocca H.A., Wen H., Craven R.R., Gris P., Huang M., Schneider M., Miller S.D., Ting J.P. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 2, pp. 974-981.
54. Guarda G., Braun M., Staehli F. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity*, 2011, Vol. 34, no. 2, pp. 213-223.
55. Haddad R., Saldanha-Araujo F. Mechanisms of T-Cell Immunosuppression by Mesenchymal Stromal Cells: What Do We Know So Far. *BioMed Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, Article ID 216806.
56. Hafler D. Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.*, 2004, Vol. 113, no. 6, pp. 788-794.
57. Haniffa M.A., Wang X.N., Holtick U., Rae M., Isaacs J.D., Dickinson A.M., Hilken C.M., Collin M.P. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 3, pp. 1595-1604.
58. Haniffa M.A., Collin M.P., Buckley C.D., Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*, 2009, Vol. 94, no. 2, pp. 258-263.

59. Hare J.M., Traverse J.H., Henry T.D., Dib N., Strumpf R.K., Schulman S.P., Gerstenblith G., DeMaria A.N., Denktas A.E., Gammon R.S., Hermiller J.B.Jr., Reisman M.A., Schaer G.L., Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (Prohymal) after acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2009, Vol. 54, no. 24, pp. 2277-2286.
60. Harris V.K., Sadiq S.A. Biomarkers of Therapeutic Response in Multiple Sclerosis: Current Status. *Mol. Diagn. Ther.*, 2014, Vol. 18, no. 6, pp. 605-617.
61. Harris V.K., Sadiq S.A. Stem cell therapy in multiple sclerosis: a future perspective. *Neurodegener. Dis. Manag.*, 2015, Vol. 5, no. 3, pp. 167-170.
62. Hartung H.P., Gonsette R., König N., Kwiecinski H., Guseo A., Morrissey S.P., Krapf H., Zwingers T. Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study Group (MIMS). Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet*, 2002, Vol. 360, no. 9350, pp. 2018-2025.
63. Hayashia T., Graya C.S., Chana M., Tawataoa R.I., Ronacherb L., McGargillc M.A., Dattad S.K., Carsona D.A., Corrb M. Prevention of autoimmune disease by induction of tolerance to Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 8, pp. 2764-2769.
64. Hellings N., Barée M., Verhoeven C., D'hooghe M.B., Medaer R., Bernard C.C., Raus J., Stinissen P. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J. Neurosci. Res.*, 2001, Vol. 63, no. 3, pp. 290-302.
65. Hemeda H., Jakob M., Ludwig A.K., Giebel B., Lang S., Brandau S. IFN-gamma and TNF-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*, 2010, Vol. 19, no. 5, pp. 693-706.
66. Hermann A., Gastl R., Liebau S., Popa M.O., Fiedler J., Boehm B.O., Maisel M., Lerche H., Schwarz J., Brenner R., Storch A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.*, 2004, Vol. 117, pt. 19, pp. 4411-4422.
67. Hohlfeld R., Wekerle H. Immunological update on multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.*, 2001, Vol. 14, no. 3, pp. 299-304.
68. Hohlfeld R., Dornmair K., Meinl E., Wekerle H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4⁺ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. *Lancet Neurol.*, 2016, Vol. 15, no. 2, pp. 198-209.
69. Hohlfeld R., Dornmair K., Meinl E., Wekerle H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8⁺ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research. *Lancet Neurol.*, 2016, Vol. 15, no. 3, pp. 317-331.
70. Inoue M., Williams K.L., Gunn M.D., Shinohara M.L. NLRP3 inflammasome induces chemotactic immune cell migration to the CNS in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 26, pp. 10480-10485.
71. Inoue M., Williams K.L., Oliver T., Vandenabeele P., Rajan J.V., Miao E.A., Shinohara M.L. Interferon-beta therapy against EAE is effective only when development of the disease depends on the NLRP3 inflammasome. *Sci. Signal.*, 2012, Vol. 5, no. 225, Article [ra38].
72. Izquierdo G., Soler N.G., Rus M., García-Ruiz A.J. Effectiveness of glatiramer acetate compared to other multiple sclerosis therapies. *Brain Behav.*, 2015, Vol. 5, no. 6, e00337. doi: 10.1002/brb3.337.
73. Jack C., Ruffini F., Bar-Or A., Antel J.P. Microglia and multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.*, 2005, Vol. 81, no. 3, pp. 363-373.
74. Jaramillo-Merchán J., Jones J., Ivorra J.L., Pastor D., Viso-León M.C., Armengol J.A., Moltó M.D., Geijo-Barrientos E., Martínez S. Mesenchymal stromal-cell transplants induce oligodendrocyte progenitor migration and remyelination in a chronic demyelination model. *Cell Death Dis.*, 2013, Vol. 4, no. 8, e779. doi:10.1038/cddis.2013.304.
75. Jasani B., Navabi H., Adams M. Ampligen: a potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine*, 2009, Vol. 27, no. 25/26, pp. 3401-3404.
76. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, Vol. 418, no. 6893, pp. 41-49.
77. Jones S., Horwood N., Cope A., Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 5, pp. 2824-2831.
78. Jumah M., Abumaree M. The immunomodulatory and neuroprotective effects of mesenchymal stem cells (MSCs) in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): a model of multiple sclerosis (MS). *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, Vol. 13, no. 7, pp. 9298-9331.
79. Karussis D., Kassis I. Use of stem cells for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Rev. Neurother.*, 2007, Vol. 7, no. 9, pp. 1189-1201.
80. Karussis D., Kassis I., Kurkalli B.G., Slavin S. Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases. *J. Neurol. Sci.*, 2008, Vol. 265, no. 1/2, pp. 131-135.
81. Karussis D., Karageorgiou C., Vaknin-Dembinsky A., Gowda-Kurkalli B., Gomori J.M., Kassis I., Bulte J.W., Petrou P., Ben-Hur T., Abramsky O., Slavin S. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.*, 2010, Vol. 67, no. 10, pp. 1187-1194.
82. Karussis D., Shor H., Yachnin J., Lanxner N., Amiel M., Baruch K., Keren-Zur Y., Haviv O., Filippi M., Petrou P., Hajag S., Vourka-Karussis U., Vaknin-Dembinsky A., Khoury S., Abramsky O., Atlan H., Cohen I.R.,

Abulafia-Lapid R. T cell vaccination benefits relapsing progressive multiple sclerosis patients: a randomized, double-blind clinical trial. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 12, e50478. doi: 10.1371/journal.pone.0050478.

83. Kassis I., Grigoriadis N., Gowda-Kurkalli B., Mizrachi-Kol R., Ben-Hur T., Slavin S., Abramsky O., Karussis D. Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch. Neurol.*, 2008, Vol. 65, no. 6, pp. 753-761.

84. Khatri B.O. Fingolimod in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: long-term experience and an update on the clinical evidence. *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, 2016, Vol. 9, no. 2, pp. 130-147.

85. Klyushnenkova E., Mosca J.D., Zernetkina V., Majumdar M.K., Beggs K.J., Simonetti D.W., Deans R.J., McIntosh K.R. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J. Biomed. Sci.*, 2005, Vol. 12, no. 1, pp. 47-57.

86. Koç O.N., Day J., Nieder M., Gerson S.L., Lazarus H.M., Krivit W. Mesenchymal stem cells. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant.*, 2002, Vol. 30, no. 4, pp. 215-222.

87. Koh S.H., Baik W., Noh M.Y., Cho G.W., Kim H.Y., Kim K.S., Kim S.H. The functional deficiency of bone marrow mesenchymal stromal cells in ALS patients is proportional to disease progression rate. *Exp. Neurol.*, 2012, Vol. 233, no. 1, pp. 472-480.

88. Koh S.H., Huh Y.M., Noh M.Y., Kim H.Y., Kim K.S., Lee E.S., Ko H.J., Cho G.W., Yoo A.R., Song H., Hwang S., Lee K., Haam S., Frank J.A., Suh J.S., Kim S.H. β -PIX is critical for transplanted mesenchymal stromal cell migration. *Stem Cells Dev.*, 2012, Vol. 21, no. 11, pp. 1989-1999.

89. Kolbinger F., Huppertz C., Mir A., Padova F.D. IL-17A and multiple sclerosis: signaling pathways, producing cells and target cells in the central nervous system [Electronic resource]. *Curr. Drug Targets.*, 2016, Vol. 17, no. 16, pp. 1882-1893.

90. Krampera M., Glennie S., Dyson J., Scott D., Laylor R., Simpson E., Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 2003, Vol. 101, no. 9, pp. 3722-3729.

91. Krampera M., Cosmi L., Angeli R., Pasini A., Liotta F., Andreini A., Santarlasci V., Mazzinghi B., Pizzolo G., Vinante F., Romagnani P., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, Vol. 24, no. 2, pp. 386-398.

92. Krampera M., Franchini M., Pizzolo G., Aprili G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus.*, 2007, Vol. 5, no. 3, pp. 120-129.

93. Kuchroo V.K., Anderson A.C., Waldner H., Munder M., Bettelli E., Nicholson L.B. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 20, pp. 101-123.

94. Lalor S.J., Dungan L.S., Sutton C.E., Basdeo S.A., Fletcher J.M., Mills K.H. Caspase-1-processed cytokines IL-1 β and IL-18 promote IL-17 production by gamma delta and CD4 T cells that mediate autoimmunity. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 10, pp. 5738-5748.

95. Larghero J., Farge D., Braccini A., Lecourt S., Scherberich A., Foïs E., Verrecchia F., Daikeler T., Gluckman E., Tyndall A., Bocelli-Tyndall C. Phenotypical and functional characteristics of in vitro expanded bone marrow mesenchymal stem cells from patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2008, Vol. 67, no. 4, pp. 443-449.

96. le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 2003, Vol. 5, no. 6, pp. 485-489.

97. le Blanc K., Tammik L., Sundberg B., Haynesworth S.E., Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.*, 2003, Vol. 57, no. 1, pp. 11-20.

98. le Blanc K., Rasmusson I., Götherström C., Seidel C., Sundberg B., Sundin M., Rosendahl K., Tammik C., Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.*, 2004, Vol. 60, no. 3, pp. 307-315.

99. le Blanc K., Frassoni F., Ball L., Locatelli F., Roelofs H., Lewis I., Lanino E., Sundberg B., Bernardo M.E., Remberger M., Dini G., Egeler R.M., Bacigalupo A., Fibbe W., Ringdén O. Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, 2008, Vol. 371, no. 9624, pp. 1579-1586.

100. Lee D.H., Linker R.A. The role of myelin oligodendrocyte glycoprotein in autoimmune demyelination: a target for multiple sclerosis therapy? *Expert Opin. Ther. Targets.*, 2012, Vol. 16, no. 5, pp. 451-462.

101. Liang J., Zhang H., Hua B., Wang H., Lu L., Shi S., Hou Y., Zeng X., Gilkeson G.S., Sun L. Allogenic mesenchymal stem cell transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, Vol. 69, no. 8, pp. 1423-1429.

102. Liotta F., Angeli R., Cosmi L., Fili L., Manuelli C., Frosali F., Mazzinghi B., Maggi L., Pasini A., Lisi V., Santarlasci V., Consoloni L., Angelotti M.L., Romagnani P., Parronchi P., Krampera M., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells*, 2008, Vol. 26, no. 1, pp. 279-289.

103. Lu P., Tuszynski M.H. Can bone marrow-derived stem cells differentiate into functional neurons. *Exp. Neurol.*, 2005, Vol. 193, no. 2, pp. 273-278.

104. Lu Z., Hu X., Zhu C., Wang D., Zheng X., Liu Q. Overexpression of CNTF in mesenchymal stem cells reduces demyelination and induces clinical recovery in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J. Neuroimmunol.*, 2008, Vol. 206, no. 1/2, pp. 58-69.
105. Lundy S.K., Wu Q., Wang Q., Dowling C.A., Taitano S.H., Mao G., Mao-Draayer Y. Dimethyl fumarate treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis influences B-cell subsets [Electronic resource]. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, 2016, Vol. 3, no. 2, e211. doi: 10.1212/NXI.0000000000000211.
106. Luz-Crawford P., Kurte M., Bravo-Alegria J., Contreras R., Nova-Lamperti E., Tejedor G., Noël D., Jorgensen C., Figueroa F., Djouad F., Carrión F. Mesenchymal stem cells generate a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res. Ther.*, 2013, Vol. 4, no. 3, pp. 65-77.
107. Malhotra S., Río J., Urcelay E., Nurtdinov R., Bustamante M.F., Fernández O., Oliver B., Zettl U., Brassat D., Killestein J., Lechner-Scott J., Drulovic J., Chan A., Martinelli-Boneschi F., García-Merino A., Montalban X., Comabella M. NLRP3 inflammasome is associated with the response to IFN-beta in patients with multiple sclerosis. *Brain*, 2015, Vol. 138, Pt 3, pp. 644-652.
108. Mann C.L., Davies M.B., Stevenson V.L. Interleukin 1 genotypes in multiple sclerosis and relationship to disease severity. *J. Neuroimmunol.*, 2002, Vol. 129, no. 1/2, pp. 197-204.
109. Mehandru N., Cohen J. A potential cure for multiple sclerosis: the promising role mesenchymal stem cells play in the reparative process. *RCSlsmj.*, 2013, Vol. 6, no. 1, pp. 54-58.
110. Meisel R., Zibert A., Laryea M., Göbel U., Däubener W., Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase mediated tryptophan degradation. *Blood*, 2004, Vol. 103, no. 12, pp. 4619-4621.
111. Mohammad M.G., Tsai V.W., Ruitenberg M.J., Hassanpour M., Li H., Hart P.H., Breit S.N., Sawchenko P.E., Brown D.A. Immune cell trafficking from the brain maintains CNS immune tolerance. *J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 124, no. 3, pp. 1228-1241.
112. Murphy M.B., Moncivais K., Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine [Electronic resource]. *Exper. Mol. Med.*, 2013, Vol. 45, no. 11, e54. doi: 10.1038/emmm.2013.94.
113. Nasef A., Mathieu N., Chapel A., Frick J., François S., Mazurier C., Boutarfa A., Bouchet S., Gorin N.C., Thierry D., Fouillard L. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation*, 2007, Vol. 84, no. 2, pp. 231-237.
114. Nasef A., Ashammakhi N., Fouillard L. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. *Regen. Med.*, 2008, Vol. 3, no. 4, pp. 531-546.
115. Nemeth K., Mayer B., Mezey E. Modulation of bone marrow stromal cell functions in infectious diseases by toll-like receptor ligands. *J. Mol. Med.*, 2010, Vol. 88, no. 1, pp. 5-10.
116. Noseworthy J.H., Lucchinetti C., Rodriguez M., Weinshenker B.G. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 2000, Vol. 343, no. 13, pp. 938-952.
117. Nylander A., Hafler D.A. Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 4, pp. 1180-1188.
118. Oh I., Ozaki K., Sato K., Meguro A., Tatara R., Hatanaka K., Nagai T., Muroi K., Ozawa K. Interferon-gamma and NF-kappaB mediate nitric oxide production by mesenchymal stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, Vol. 355, no. 4, pp. 956-962.
119. Ortiz G.G., Pacheco-Moisés F.P., Bitzer-Quintero O.K., Ramírez-Anguiano A.C., Flores-Alvarado L.J., Ramírez-Ramírez V., Macías-Islas M.A., Torres-Sánchez E.D. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, 708659. doi: 10.1155/2013/708659.
120. Pevsner-Fischer M., Morad V., Cohen-Sfady M., Rousso-Noori L., Zanin-Zhorov A., Cohen S., Cohen I.R., Zipori D. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*, 2007, Vol. 109, no. 4, pp. 1422-1432.
121. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, Vol. 284, no. 5411, pp. 143-147.
122. Prasanna S.J., Gopalakrishnan D., Shankar S.R., Vasandan A.B. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton Jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS ONE*, 2010, Vol. 5, no. 2, e9016. doi: 10.1371/journal.pone.0009016.
123. Racke M.K., Lovett-Racke A.E. Glatiramer acetate treatment of multiple sclerosis: an immunological perspective. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 4, pp. 1887-1890.
124. Rafei M., Campeau P.M., Aguilar-Mahecha A., Buchanan M., Williams P., Birman E., Yuan S., Young Y.K., Boivin M.N., Forner K., Basik M., Galipeau J. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 10, pp. 5994-6002.
125. Raffaghello L., Bianchi G., Bertolotto M., Montecucco F., Busca A., Dallegri F., Ottonello L., Pistoia V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*, 2008, Vol. 26, no. 1, pp. 151-162.
126. Ramasamy R., Fazekasova H., Lam E.W., Soeiro I., Lombardi G., Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*, 2007, Vol. 83, no. 1, pp. 71-76.

127. Rasmusson I., Ringdén O., Sundberg B., le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*, 2003, Vol. 76, no. 8, pp. 1208-1213.
128. Rasmusson I., Uhlin M., le Blanc K., Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 82, no. 4, pp. 887-893.
129. Ren G., Su J., Zhang L., Zhao X., Ling W., L'huillie A., Zhang J., Lu Y., Roberts A.I., Ji W., Zhang H., Rabson A.B., Shi Y. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*, 2009, Vol. 27, no. 8, pp. 1954-1962.
130. Rezaei N. Therapeutic targeting of pattern-recognition receptors. *Int. Immunopharmacol.*, 2006, Vol. 6, no. 6, pp. 863-869.
131. Rice C.M., Mallam E.A., Whone A.L., Walsh P., Brooks D.J., Kane N., Butler S.R., Marks D.I., Scolding N.J. Safety and feasibility of autologous bone marrow cellular therapy in relapsing-progressive multiple sclerosis. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2010, Vol. 87, no. 6, pp. 679-685.
132. Rivera F.J., Couillard-Despres S., Pedre X., Ploetz S., Caioni M., Lois C., Bogdahn U., Aigner L. Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells. *Stem Cells*, 2006, Vol. 24, no. 10, pp. 2209-2219.
133. Rivera F.J., Aigner L. Adult mesenchymal stem cell therapy for myelin repair in multiple sclerosis. *Biol. Res.*, 2012, Vol. 45, no. 3, pp. 257-268.
134. Rodgers J., Robinson A., Miller S. Strategies for protecting oligodendrocytes and enhancing remyelination in multiple sclerosis. *Discov. Med.*, 2013, Vol. 16, no. 86, pp. 53-63.
135. Romieu-Mourez R., François M., Boivin M.N., Bouchentouf M., Spaner D.E., Galipeau J. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 12, pp. 7963-7973.
136. Ruck T., Bittner S., Wiendl H., Meuth S.G. Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: mechanism of action and beyond. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, Vol. 16, no. 7, pp. 16414-1639.
137. Rush C.A., MacLean H.J., Freedman M.S. Aggressive multiple sclerosis: proposed definition and treatment algorithm. *Nat. Rev. Neurol.*, 2015, Vol. 11, no. 7, pp. 379-389.
138. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subset: function, generation and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 745-763.
139. Sato K., Ozaki K., Oh I., Meguro A., Hatanaka K., Nagai T., Muroi K., Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*, 2007, Vol. 109, no. 1, pp. 228-234.
140. Shaw P.J., McDermott M.F., Kanneganti N.D. Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 2, pp. 57-64.
141. Siatskas C., Bernard C.C. Stem cell and gene therapeutic strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Curr. Mol. Med.*, 2009, Vol. 9, no. 8, pp. 992-1016.
142. Singer N., Caplan A. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2011, Vol. 6, pp. 457-478.
143. Sivanathan K.N., Gronthos S., Rojas-Canales D., Thierry B., Coates P.T. Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. *Stem Cell Rev.*, 2014, Vol. 10, no. 3, pp. 351-375.
144. Sobottka B., Harrer M.D., Ziegler U., Fischer K., Wiendl H., Hünig T., Becher B., Goebels N. Collateral bystander damage by myelin-directed CD8 T cells causes axonal loss. *Am. J. Pathol.*, 2009, Vol. 175, no. 3, pp. 1160-1166.
145. Sospedra M., Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 23, pp. 683-747.
146. Spaggiari G.M., Capobianco A., Becchetti S., Mingari M.C., Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 2006, Vol. 107, no. 4, pp. 1484-1490.
147. Stagg J., Pommey S., Eliopoulos N., Galipeau J. Interferon gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*, 2006, Vol. 107, no. 6, pp. 2570-2578.
148. Steinman L. Immunotherapy of multiple sclerosis: the end of the beginning. *Curr. Opin. Immunol.*, 2001, Vol. 13, no. 5, pp. 597-600.
149. Tabera S., Pérez-Simón J.A., Díez-Campelo M., Sánchez-Abarca L.I., Blanco B., López A., Benito A., Ocio E., Sánchez-Guijo F.M., Cañizo C., San Miguel J.F. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*, 2008, Vol. 93, no. 9, pp. 1301-1309.
150. Touil E., Fitzgerald D., Zhang G., Rostami A., Gran B. Cutting Edge: TLR3 stimulation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing endogenous IFN-beta. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 11, pp. 7505-7509.
151. Tyndall A., Uccelli A. Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks. *Bone Marrow Transplant.*, 2009, Vol. 43, no. 11, pp. 821-828.
152. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur. J. Immunol.*, 2006, Vol. 36, no. 10, pp. 2566-2573.
153. Uccelli A., Zappia E., Benvenuto F., Frassoni F., Mancardi G. Stem cells in inflammatory demyelinating disorders: a dual role for immunosuppression and neuroprotection. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2006, Vol. 6, no. 1, pp. 17-22.
154. Uccelli A., Laroni A., Freedman M.S. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol.*, 2011, Vol. 10, no. 7, pp. 649-656.

155. Uccelli A., Laroni A., Freedman M. Mesenchymal stem cells as treatment for MS – progress to date. *Mult. Scler.*, 2013, Vol. 19, no. 5, pp. 515-519.
156. von Bahr L., Batsis I., Moll G., Hägg M., Szakos A., Sundberg B., Uzunel M., Ringden O., le Blanc K. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells*, 2012, Vol. 30, no. 7, pp. 557-564.
157. Wagner J., Kean T., Young R., Dennis J.E., Caplan A.I. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Curr. Opin. Biotech.*, 2009, Vol. 20, no. 5, pp. 531-536.
158. Waterman R.S., Tomchuck S.L., Henkle S.L., Betancourt A.M. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, no. 4, e10088. doi: 10.1371/journal.pone.0010088.
159. Wiendl H., Hohlfeld R. Therapeutic approaches in multiple sclerosis: lessons from failed and interrupted treatment trials. *BioDrugs*, 2002, Vol. 16, no. 3, pp. 183-200.
160. Witherick J., Wilkins A., Scolding N., Kemp K. Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Dis.*, 2011, Vol. 2011, Article ID 164608.
161. Xu G., Zhang L., Ren G., Yuan Z., Zhang Y., Zhao R.C., Shi Y. Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Res.*, 2007, Vol. 17, no. 3, pp. 240-248.
162. Yamout B., Hourani R., Salti H., Barada W., El-Hajj T., Al-Kutoubi A., Herlopian A., Baz E.K., Mahfouz R., Khalil-Hamdan R., Kreidieh N.M., El-Sabban M., Bazarbachi A. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study. *J. Neuroimmunol.*, 2010, Vol. 227, no. 1/2, pp. 185-189.
163. Zangi L., Margalit R., Reich-Zeliger S., Bachar-Lustig E., Beilhack A., Negrin R., Reisner Y. Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*, 2009, Vol. 27, no. 11, pp. 2865-2874.
164. Zafranskaya M., Nizhegorodova D., Yurkevich M., Ivanchik G., Demidchik Y., Kozhukh H., Fedulov A. PGE2 contributes to *in vitro* MSC-mediated inhibition of non-specific- and antigen-specific T cells proliferation in MS patients. *Scand. J. Immunol.*, 2013, Vol. 78, no. 5, pp. 455-462.
165. Zafranskaya M.M., Nizhegorodova D.B., Yurkevich M.Y., Lamouskaya N.V., Motuzova Y.M., Bagatka S.S., Ivanchik H.I., Fedulov A.S. *In vitro* assessment of mesenchymal stem cells immunosuppressive potential in multiple sclerosis patients. *Immunol. Lett.*, 2013, Vol. 149, no. 1/2, pp. 9-18.
166. Zappia E., Casazza S., Pedemonte E., Benvenuto F., Bonanni I., Gerdoni E., Giunti D., Ceravolo A., Cazzanti F., Frassoni F., Mancardi G., Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 2005, Vol. 106, no. 5, pp. 1755-1761.
167. Zepp J., Wu L., Li X. IL-17 receptor signaling and T helper 17-mediated autoimmune demyelinating disease. *Trends Immunol.*, 2011, Vol. 32, no. 5, pp. 232-239.
168. Zhang J., Li Y., Chen J., Cui Y., Lu M., Elias S.B., Mitchell J.B., Hammill L., Vanguri P., Chopp M. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp. Neurol.*, 2005, Vol. 195, no. 1, pp. 16-26.
169. Zhang H., Podojil J.R., Luo X., Miller S.D. Intrinsic and induced regulation of the age-associated onset of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 7, pp. 4638-4647.
170. Zhang J., Li Y., Lu M., Cui Y., Chen J., Noffsinger L., Elias S.B., Chopp M. Bone marrow stromal cells reduce axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J. Neurosci. Res.*, 2006, Vol. 84, no. 3, pp. 587-595.

Авторы:

Зафранская М.М. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой иммунологии, Международный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета; руководитель иммунологической группы, Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск, Республика Беларусь

Нижегородова Д.Б. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, Международный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета; доцент кафедры иммунологии, Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск, Республика Беларусь

Authors:

Zafranskaya M.M., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Immunology Department, International Sakharov Environmental Institute, Belorussian State University; Chief for Research, Immunological Group, Belorussian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Nizhegorodova D.B., PhD (Biology), Leading Research Associate, International Sakharov Environmental Institute, Belorussian State University; Associate Professor, Immunology Department, Belorussian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Поступила 15.03.2017

Отправлена на доработку 02.05.2017

Принята к печати 14.07.2017

Received 15.03.2017

Revision received 02.05.2017

Accepted 14.07.2017

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СЕЛЕКТИВНЫХ И НЕСЕЛЕКТИВНЫХ АГОНИСТОВ NOD-РЕЦЕПТОРОВ

Дагиль Ю.А., Арбатский Н.П., Алхазова Б.И., Львов В.Л.,
Пащенко М.В.

ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» ФМБА России, Москва, Россия

Резюме. Мурамилпептиды — фрагменты бактериального пептидогликана, играющие важную роль в активации врожденной иммунной системы. Основной структуры мурамилпептидов является остаток N-ацетилмурамовой кислоты (MurNAc), с которым ковалентно связан пептид длиной 2–5 аминокислотных остатков. Первой аминокислотой пептида обычно является L-аланин, второй — D-изоглутамин или D-изоглутаминовая кислота, в четвертой и пятой — D-аланин. Наиболее вариативен третий аминокислотный остаток, который у грамположительных бактерий чаще всего представлен L-лизином или L-орнитином, а у грамотрицательных — мезо-диаминопимелиновой кислотой (meso-DAP). Мурамилпептиды являются перспективными иммуностимуляторами и адъювантами. Известно, что основную роль в их распознавании играют рецепторы NOD1 и NOD2. Однако данные о рецепторной специфичности ряда распространенных мурамилпептидов отсутствуют или являются неполными.

Цель: расширить представления о взаимосвязи между структурой природных и химически модифицированных мурамилпептидов и их селективностью по отношению к рецепторам NOD1 и NOD2.

Исследовали способность природных мурамилпептидов и их производных активировать рецепторы NOD1 и NOD2 человека, для чего использовали новую биологическую тест-систему — модифицированные клетки HEK293T с NF-κB-зависимой экспрессией репортерного гена (люциферазы) и нокаутами собственных генов NOD1 и/или NOD2.

Показано, что рецептор NOD2 имеет более широкий спектр естественных агонистов, чем полагали ранее. В частности, NOD2 распознает мурамилпептиды грамотрицательных бактерий, содержащие остаток meso-DAP, ранее считавшиеся неактивными по отношению к этому рецептору. Рецептор NOD1 распознает только мурамилпептиды, содержащие остаток meso-DAP, однако этот остаток может находиться не только в концевом положении, как считалось ранее, но и внутри пептидной цепи. Из этих данных следует, что природные мурамилпептиды, содержащие остаток meso-DAP, обладают двойной рецепторной специфичностью (NOD1 и NOD2), т.е. являются неселективными агонистами NOD-рецепторов. Разрушение остатка MurNAc устраняет активность этих мурамилпептидов в отношении NOD2, но не влияет на активность в отношении NOD1. Таким образом, модифицированные мурамилпептиды, у которых разрушен остаток MurNAc и имеется остаток meso-DAP, являются селективными агонистами NOD1. Природные мурамилпептиды, имеющие интактный остаток MurNAc и не содержащие остатка meso-DAP, являются селективными агонистами NOD2.

Адрес для переписки:

Пащенко Михаил Владимирович
ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» ФМБА России
115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.
Тел.: 8 (499) 617-76-49.
Факс: 8 (499) 617-10-27.
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru

Address for correspondence:

Pashenkov Mikhail V.
National Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical-Biological Agency of Russia
115478, Russian Federation, Moscow, Kashirskoe rd, 24.
Phone: 7 (499) 617-76-49.
Fax: 7 (499) 617-10-27.
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru

Образец цитирования:

Ю.А. Дагиль, Н.П. Арбатский, Б.И. Алхазова, В.Л. Львов, М.В. Пащенко «Структурные особенности селективных и неселективных агонистов NOD-рецепторов» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 705–714. doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-705-714
© Дагиль Ю.А. и соавт., 2017

For citation:

Yu.A. Dagil, N.P. Arbatsky, B.I. Alkhazova, V.L. Lvov, M.V. Pashenkov “Structural features of selective and non-selective NOD receptor agonists”, *Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 705–714. doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-705-714
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-705-714

Выводы: 1) охарактеризованы основные структурные особенности селективных агонистов NOD1 и NOD2, а также неселективных агонистов NOD-рецепторов; 2) показана значимость вновь полученных данных для регуляции врожденного иммунного ответа и создания новых иммуностимуляторов мурамилпептидной природы.

Ключевые слова: мурамилпептиды, NOD1, NOD2, мезо-диаминопимелиновая кислота, N-ацетилмурамовая кислота, хемилюминесценция, CRISPR/Cas9

STRUCTURAL FEATURES OF SELECTIVE AND NON-SELECTIVE NOD RECEPTOR AGONISTS

Dagil Yu.A., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., Lvov V.L., Pashenkov M.V.

National Research Center "Institute of Immunology", Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. Muramyl peptides are fragments of bacterial peptidoglycan playing an important role in the activation of innate immune system. Core structure of muramyl peptides is composed of N-acetylmuramic acid residue (MurNAc) covalently bound to a peptide consisting of 2-5 amino acid residues. The first residue in the peptide chain is usually L-alanine, the 2nd is D-isoglutamine or D-isoglutamic acid, the 4th and 5th are D-alanines. The 3rd residue is most variable being represented by L-lysine or L-ornithine in Gram-positive bacteria, or by meso-diaminopimelic acid (meso-DAP) in Gram-negative bacteria. Muramyl peptides are potential immunostimulants and adjuvants. Two receptors, NOD1 and NOD2, are known to play a central role in muramyl peptide recognition. However, the data on NOD receptor specificity for several common muramyl peptides are not available or incomplete.

The goal of this study was to extend knowledge on possible relationships between structure of natural, or chemically modified muramyl peptides, and their selectivity towards NOD1 and NOD2 receptors.

We investigated ability of natural muramyl peptides and their derivatives to activate NOD1 and NOD2. To this end, we used a novel biological test system, which represents modified HEK293T cells with NF- κ B-driven reporter gene (luciferase) expression and knock-outs of endogenous NOD1 and/or NOD2 genes. As a result, we have shown that NOD2 has a broader spectrum of natural agonists than previously thought. In particular, NOD2 recognizes muramyl peptides from Gram-negative bacteria containing a meso-DAP residue, which have been considered inactive towards NOD2. NOD1 recognizes only muramyl peptides containing a meso-DAP residue; however, this molecule should not be exposed as a terminal residue, as thought earlier, but it may also be present within the peptide chain. This data imply that natural muramyl peptides containing meso-DAP have a dual receptor specificity (NOD1 and NOD2), i.e. they are non-selective NOD receptor agonists. Destruction of the MurNAc residue eliminates ability of these muramyl peptides to activate NOD2, but has no effect on their NOD1 agonism. Hence, modified muramyl peptides containing meso-DAP and a destroyed MurNAc residue are selective NOD1 agonists. Natural muramyl peptides featuring an intact MurNAc and no meso-DAP are selective NOD2 agonists.

Conclusions: 1) we have characterized key structural features of selective NOD1 and NOD2 agonists as well as non-selective NOD receptors agonists; 2) we show the importance of these new data for understanding innate immune response regulation, and for development of novel muramyl peptide immunostimulants.

Keywords: muramyl peptides, NOD1, NOD2, meso-diaminopimelic acid, N-acetylmuramic acid, chemiluminescence, CRISPR/Cas9

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (РНФ), грант № 16-15-10314.

Введение

Мурамилпептиды — это иммуностимулирующие гликопептиды, представляющие собой низкомолекулярные фрагменты пептидогликана

(ПГ) бактерий. Мурамилпептиды вызывают интерес и как естественные активаторы врожденного иммунитета, и как лекарственные средства [2]. В Российской Федерации из этой группы препаратов наиболее известен «Ликопид» [1]. Знания о взаимосвязях между структурой и активностью мурамилпептидов важны при разработке новых препаратов этой группы.

Строение мурамилпептидов обусловлено строением ПГ, фрагментами которого они являются. Как известно, основу бактериального ПГ составляют полисахаридные цепи, образованные чередующимися остатками N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и N-ацетилмурамовой кислоты (MurNAc), которые соединены между собой $\beta 1 \rightarrow 4$ -гликозидными связями [19]. С лактоильными группами остатков MurNAc ковалентно связаны короткие пептиды, состоящие, как правило, из 2-5 аминокислотных остатков. В 1-м положении в пептидах обычно находится L-аланин, во 2-м — D-изоглутамин или D-изоглутаминовая кислота, в 4-м и 5-м — D-аланин. Наиболее варибельным является 3-е положение, в котором у грамположительных бактерий чаще всего присутствует L-лизин или L-орнитин, а у грамотрицательных — мезо-диаминопимелиновая кислота (meso-DAP) [19]. Отходящие от соседних полисахаридных цепей пептиды могут образовывать между собой ковалентные сшивки, придающие жесткость молекуле ПГ. У грамположительных бактерий такие сшивки образуются, например, путем пентаглициновых мостиков между концевым D-аланином одного пептида и свободной ϵ -аминогруппой L-лизина другого пептида. У грамотрицательных бактерий сшивки чаще осуществляются путем прямой амидной связи между концевой COOH-группой одной пептидной цепи и свободной ω -аминогруппой остатка meso-DAP другой цепи [19].

Основной путь образования естественных мурамилпептидов — расщепление ПГ лизоцимом (мурамидазой) и некоторыми бактериальными аутолизинами [7, 13]. Эти ферменты разрывают связи MurNAc—GlcNAc, в результате чего образуются мурамилпептиды вида GlcNAc—MurNAc—пептид. Благодаря наличию межпептидных сшивок получают также димерные мурамилпептиды вида GlcNAc—MurNAc—пептид—пептид—MurNAc—GlcNAc. Кроме того, в ходе биосинтеза ПГ в бактериях образуются мурамилпептиды вида MurNAc—пептид [21]. Наличие остатка GlcNAc принципиально не влияет на биологическую активность мурамилпептидов [12, 13].

Основную роль в распознавании мурамилпептидов играют два рецептора врожденной иммунной системы — NOD1 и NOD2, находящиеся в цитозоле клеток [10, 12, 17]. Сигнальные пути от обоих рецепторов ведут к активации фактора транскрипции NF- κ B и далее к транскрипции генов иммунного ответа [4, 20]. По данным литературы, спектры агонистов NOD1 и NOD2 не перекрываются. NOD1 избирательно распознает

мурамилпептиды грамотрицательных бактерий, оканчивающиеся остатком meso-DAP или ее ближайших стерических аналогов [12]. NOD2 распознает мурамилпептиды грамположительных бактерий с концевым остатком L-лизина или L-орнитина, а также мурамилдипептид MurNAc — L-Ala — D-isoGln (МДП), который является структурным элементом ПГ всех бактерий [12]. Однако перечисленные агонисты NOD1 и NOD2, имеющие 2-3 аминокислотных остатка в пептидной цепи, составляют лишь небольшую часть естественного пула мурамилпептидов [8, 19]. Гораздо чаще встречаются мурамилпептиды с 4-5 аминокислотными остатками, а также димеры [19]. Считается, что эти виды мурамилпептидов не активируют NOD1 и NOD2 человека [10, 15]. Однако работы, в которых изучалась рецепторная специфичность мурамилпептидов, обладали рядом недостатков: 1) мурамилпептиды использовались в наномолярных концентрациях, тогда как микромолярный диапазон практически не был исследован; 2) использовались клеточные модели, в которых искусственно создавали нефизиологично высокую экспрессию NOD1 и NOD2, что затрудняет интерпретацию результатов [12].

Недавно нами была создана новая экспериментальная модель для оценки биологической активности мурамилпептидов *in vitro* [6]. Ее основу составляет клеточная линия 293Luc, полученная из широко известной линии HEK293T путем стабильной интеграции в ее геном репортерного гена (люциферазы) под контролем NF- κ B-зависимого промотера. Благодаря естественной экспрессии генов NOD1 и NOD2 линия 293Luc отвечает на стимуляцию мурамилпептидами, что выражается в повышении экспрессии люциферазы. С помощью технологии CRISPR-Cas9 на основе клеток 293Luc были получены три клеточных клона с нокаутами генов NOD1, NOD2 и с двойным нокаутом. Эти клоны позволяют оценить специфичность мурамилпептидов в отношении NOD1 и NOD2. **Целью настоящей работы** было изучение активности расширенной панели мурамилпептидов и их производных, взятых в микромолярных концентрациях, по отношению к рецепторам NOD1 и NOD2.

Материалы и методы

Реагенты

Упрощенные формулы мурамилпептидов и их производных, использованных в работе, приведены на рисунке 1. Нативные мурамилпептиды МтриДАП (MurNAc — L-Ala — D-isoGlu — meso-DAP), МДП (MurNAc — L-Ala — D-isoGln)

и МтриЛИЗ (MurNAc — L-Ala — D-isoGln — L-Lys), которые являются полными синтетическими аналогами природных мурамилпептидов, были закуплены у Invivogen (США). Нативные мурамилпептиды ГМтри (GlcNAc — MurNAc — L-Ala — D-isoGlu — meso-DAP), ГМтетра (GlcNAc — MurNAc — L-Ala — D-isoGlu — meso-DAP — D-Ala) и диГМтетра (димер ГМтетра, в котором мономеры связаны путем амидной связи между D-Ala одного мономера и meso-DAP другого) были получены из ПГ грамотрицательной бактерии *Salmonella typhi* путем гидролиза ПГ лизоцимом, как описано ранее [6, 16]. Восстановленные производные ГМтри и ГМтетра (ГМтри-в и ГМтетра-в) получали путем обработки нативных мурамилпептидов боргидридом натрия [3, 6]. Лактоильные производные ГМтри, ГМтетра и диГМтетра (ЛАКтри, ЛАКтетра и диЛАКтетра) получали в реакции бета-элиминации путем обработки нативных мурамилпептидов гидроксидом аммония [12, 16]. Молекулярные массы и чистота всех полученных соединений были подтверждены с помощью масс-спектрометрии ESI-TOF. Дипептид D-isoGlu — meso-DAP (iE-DAP) был куплен у Invivogen, рекомбинантный фактор некроза опухолей (TNF) человека — у Life Technologies (Великобритания).

Культивирование и стимуляция клеточной линии 293Luc и ее производных

Получение клеточной линии 293Luc и ее производных клонов 293Luc-ΔNOD1, 293Luc-ΔNOD2 и 293Luc-ΔNOD1/2 с нокаутами NOD1, NOD2 и с двойным нокаутом подробно описано ранее [6]. Все клетки вели в среде DMEM (Панэко, Россия) с добавлением 2 mM L-глутамина (Sigma, США), 10% фетальной телячьей сыворотки (GE Healthcare, США) и 200 мкг/мл гидромицина В (Life Technologies). Клетки пассировали каждые 3–4 дня. За 2 сут. до стимуляции клетки переносили в 96-луночные плоскодонные планшеты (SPL Life Sciences, Корея) в количестве 10 тыс. на 100 мкл культуральной среды. Стимуляцию клеток мурамилпептидами и их производными делали в дублях или триплетах. В лунки отрицательного контроля добавляли DMEM, в лунки положительного контроля — TNF до конечной концентрации 100 нг/мл. Через 24 ч. во все лунки добавляли лизирующий раствор с люцигенином (BrightGlo, Promega, США). Лизаты переносили в планшеты из белого пластика и анализировали на планшетном хемилюминиметре Lucy II (Anthos, Австрия). Первичные данные выражали в относительных световых единицах. Чтобы корректно сопоставить четыре типа клеток, использованных в работе, ответы каждого типа клеток

на исследуемые вещества пересчитывали по отношению к ответу этих же клеток на TNF (который принимали за 100%) и без стимуляции (0%). Каждое вещество тестировали минимум в 3 независимых опытах.

Статистика

Результаты представляли в виде $M \pm \sigma$. Статистический анализ проводили с помощью t-теста Стьюдента в программе GraphPad InStat (GraphPad Software, США).

Результаты

Контролями во всех опытах служили iE-DAP (наименьший по размеру агонист NOD1 [5]), МДП (наименьший по размеру агонист NOD2 [11]) и TNF (положительный контроль). Клеточная линия 293Luc отвечала все три агониста (рис. 2А, Б). Клетки 293Luc-ΔNOD1 не отвечали на iE-DAP при сохранном ответе на МДП и TNF. Клетки 293Luc-ΔNOD2 не отвечали на МДП при сохранном ответе на iE-DAP и TNF. Клетки 293Luc-ΔNOD1/2 отвечали только на TNF. Таким образом, в клетках 293Luc функционируют и NOD1, и NOD2, в клетках 293Luc-ΔNOD1 — только NOD2, в клетках 293Luc-ΔNOD2 — только NOD1, а в клетках 293Luc-ΔNOD1/2 — ни NOD1, ни NOD2.

Далее, используя линию 293Luc, исследовали активность 6 нативных мурамилпептидов: МтриДАП, ГМтри, ГМтетра, диГМтетра, МтриЛИЗ и МДП (рис. 1). Из них первые 4 характерны для грамотрицательных бактерий и содержат остаток meso-DAP; при этом МтриДАП и ГМтри, содержащие meso-DAP в концевом положении, рассматриваются как специфические агонисты NOD1, а ГМтетра и диГМтетра считаются неактивными по отношению к NOD1 и NOD2 человека [10, 12, 15]. МтриЛИЗ и МДП характерны, соответственно, для грамположительных бактерий и для всех бактерий; оба не содержат meso-DAP и считаются специфическими агонистами NOD2 [12]. Как видно из рисунка 3А, все перечисленные мурамилпептиды, взятые в микромолярных концентрациях, индуцировали экспрессию люциферазы в клетках 293Luc. Ни один из этих мурамилпептидов, взятых в наивысшей концентрации (50 мкМ), не индуцировал люциферазу в клетках 293Luc-ΔNOD1/2 (данные не показаны). Таким образом, все исследованные мурамилпептиды, в том числе ГМтетра и диГМтетра, активируют NOD1 и/или NOD2.

Активацию NOD2 изучали на клетках 293Luc-ΔNOD1. Активаторами NOD2 оказались все 6 нативных мурамилпептидов (рис. 3А), в том числе 4 мурамилпептида, содержащие остаток meso-

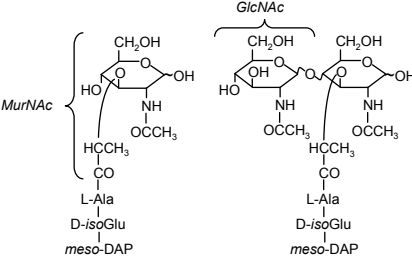
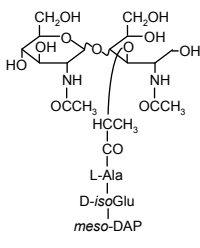
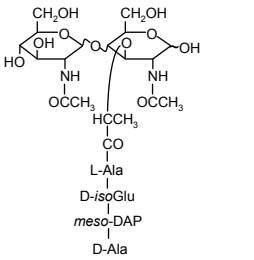
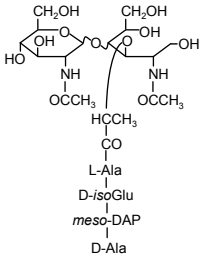
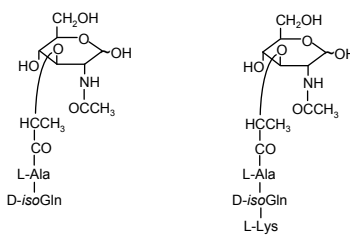
		Остаток MurNac (MurNac residue)		
		Нативный (пиранозное кольцо) Native (pyranose ring)	Линейный Linearized	Отсутствует Absent
Остаток мезо-ДАП (meso-DAP residue)	В конечном положении Terminal	 МтриДАП MtriDAP ГМтри GMtri	 ГМтри-в GMtri reduced	Лактри LACTri Д-изоГлу D-isoGlu meso-DAP иЕ-ДАП iE-DAP
	Не в конечном положении Non-terminal	 ГМтетра GMtetra диГМтетра diGMtetra	 ГМтетра-в GMtetra reduced	ЛАКтетра LACTetra диЛАКтетра diLACTetra
	Отсутствует Absent	 МДП MDP МтриЛИЗ MtriLYS		

Рисунок 1. Упрощенные формулы мурамилпептидов и их производных, использованных в работе

Примечание. GlcNAc – N-ацетил-D-глюкозамин, MurNac – N-ацетил-D-муравовая кислота, L-Ala и D-Ala – L- и D-аланин, D-isoGlu – D-изоглутаминовая кислота, D-isoGln – D-изоглутамин, L-Lys – L-лизин, meso-DAP – мезо-диаминопимелиновая кислота.

Figure 1. Simplified formulas of muramyl peptides and their derivatives used in this study

Note. GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine; MurNac, N-acetyl-D-muramic acid; L-Ala and D-Ala, L- and D-alanine; D-isoGlu, D-isoglutamic acid; D-isoGln, D-isoglutamine; L-Lys, L-Lysine; meso-DAP, Mesodiaminopimelic acid.

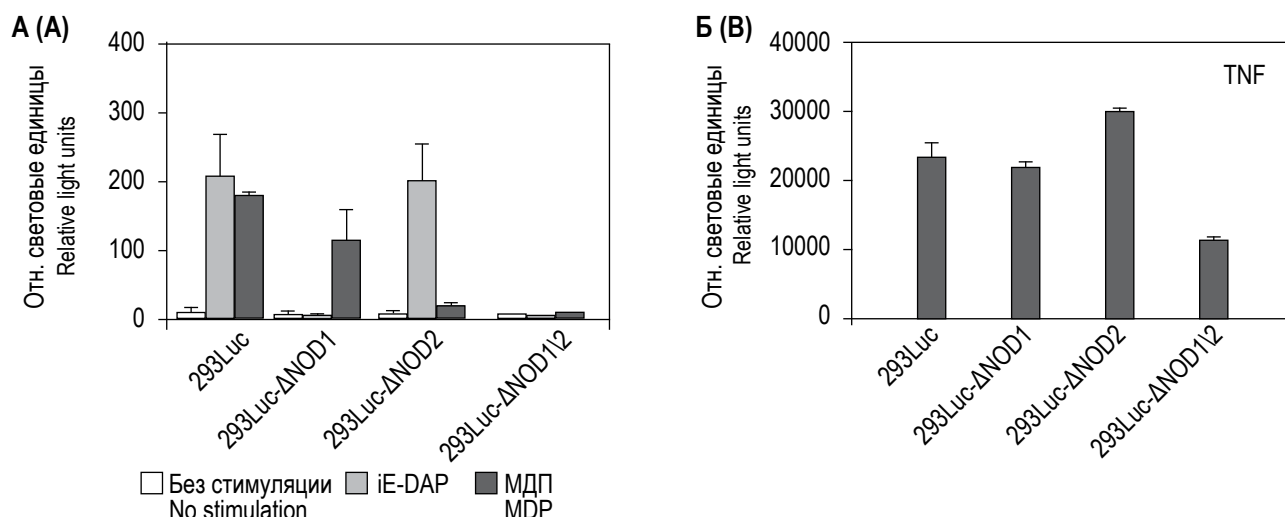


Рисунок 2. Типовой опыт, демонстрирующий индукцию люциферазы в клетках 293Luc, 293Luc-ΔNOD1, 293Luc-ΔNOD2 и 293Luc-ΔNOD1/2 при стимуляции специфическими агонистами NOD1 и NOD2 (А) и TNF (Б)

Примечание. iE-DAP использовали в концентрации 300 мкМ, МДП – 1 мкМ, TNF – 100 нг/мл. Показаны значения $M \pm \sigma$ триплетов.

Figure 2. Typical experiment showing luciferase activity in 293 Luc, 293Luc-ΔNOD1, 293Luc-ΔNOD2, or 293Luc-ΔNOD1/2 cells induced by specific NOD1 and NOD2 agonists (A), or by TNF (B)

Note. iE-DAP was used at a concentration of 300 μ M, MDP, at 1 μ M, TNF, at 100 ng/mL. $M \pm \sigma$ values are shown for the triplets.

DAP (МтриДАП, ГМтри, ГМтетра и диГМтетра). Однако мурамилпептиды с meso-DAP активировали NOD2 только при достаточно высоких концентрациях (10 мкМ и выше), тогда как мурамилпептиды, не содержащие meso-DAP (МДП, МтриЛИЗ), были активны уже в концентрации 1 мкМ (рис. 3Б) и ниже (данные не показаны). Длина пептидной цепи, очевидно, не накладывает существенных ограничений на активность в отношении NOD2, поскольку может варьировать по крайней мере от 2 до 8 аминокислотных остатков (у МДП и диГМтетра соответственно).

В полном соответствии с литературными данными [12], ключевой структурной особенностью агонистов NOD2 является нативная конформация остатка MurNAc (D-пираноза). Так, восстановленные производные ГМтри-в и ГМтетра-в отличаются от нативных аналогов тем, что у них свободная альдегидная группа (-СОН) в остатке MurNAc восстановлена до -CH₂ОН, что делает невозможным образование пиранозного кольца (рис. 1). У лактоильных производных (ЛАКтри, ЛАКтетра, диЛАКтетра) полностью отщеплена углеводная часть и сохранена только лактоильная группа остатка MurNAc (рис. 1). Как восстановленные, так и лактоильные производные мурамилпептидов в концентрациях 50 мкМ не активируют NOD2 (рис. 3В). Дипептид iE-DAP не активирует NOD2 даже в концентрации 300 мкМ (рис. 2А).

Активацию рецептора NOD1 изучали на клетках 293Luc-ΔNOD2. Как видно из рисунка 3Г, активаторами NOD1 являются только мурамилпеп-

тиды, содержащие остаток meso-DAP, поскольку мурамилпептиды без meso-DAP (МДП и МтриЛИЗ) не активируют NOD1 даже в концентрации 50 мкМ. Однако остаток meso-DAP не обязательно должен быть экспонирован на конце молекулы, как считалось ранее [12, 15], поскольку активностью в отношении NOD1 обладают также ГМтетра и диГМтетра (рис. 3Г). Тем не менее, видно, что ГМтетра и диГМтетра являются менее мощными агонистами NOD1, чем ГМтри и МтриДАП, в которых meso-DAP занимает концевое положение.

В отличие от NOD2, рецептор NOD1 распознает производные мурамилпептидов с разрушенной или полностью удаленной углеводной частью (рис. 3Д). Так, ГМтри-в активирует NOD1 даже несколько сильнее, чем ГМтри или МтриДАП. ЛАКтри, ЛАКтетра и диЛАКтетра тоже в целом сопоставимы, соответственно, с ГМтри, ГМтетра и диГМтетра по способности активировать NOD1 (рис. 3Д).

Для наглядности сравнительная активность всех исследованных соединений показана на двумерном графике (рис. 3Е), где можно выделить 3 группы веществ. Первую группу составляют производные мурамилпептидов с измененным/отсутствующим остатком MurNAc и с наличием остатка meso-DAP (ГМтри-в, ЛАКтри, ГМтетра-в, ЛАКтетра и диЛАКтетра). Это селективные агонисты NOD1. Вещества, в которых meso-DAP находится в концевом положении (ГМтри-в, ЛАКтри), более активны, чем остальные представители этой группы. Вторую

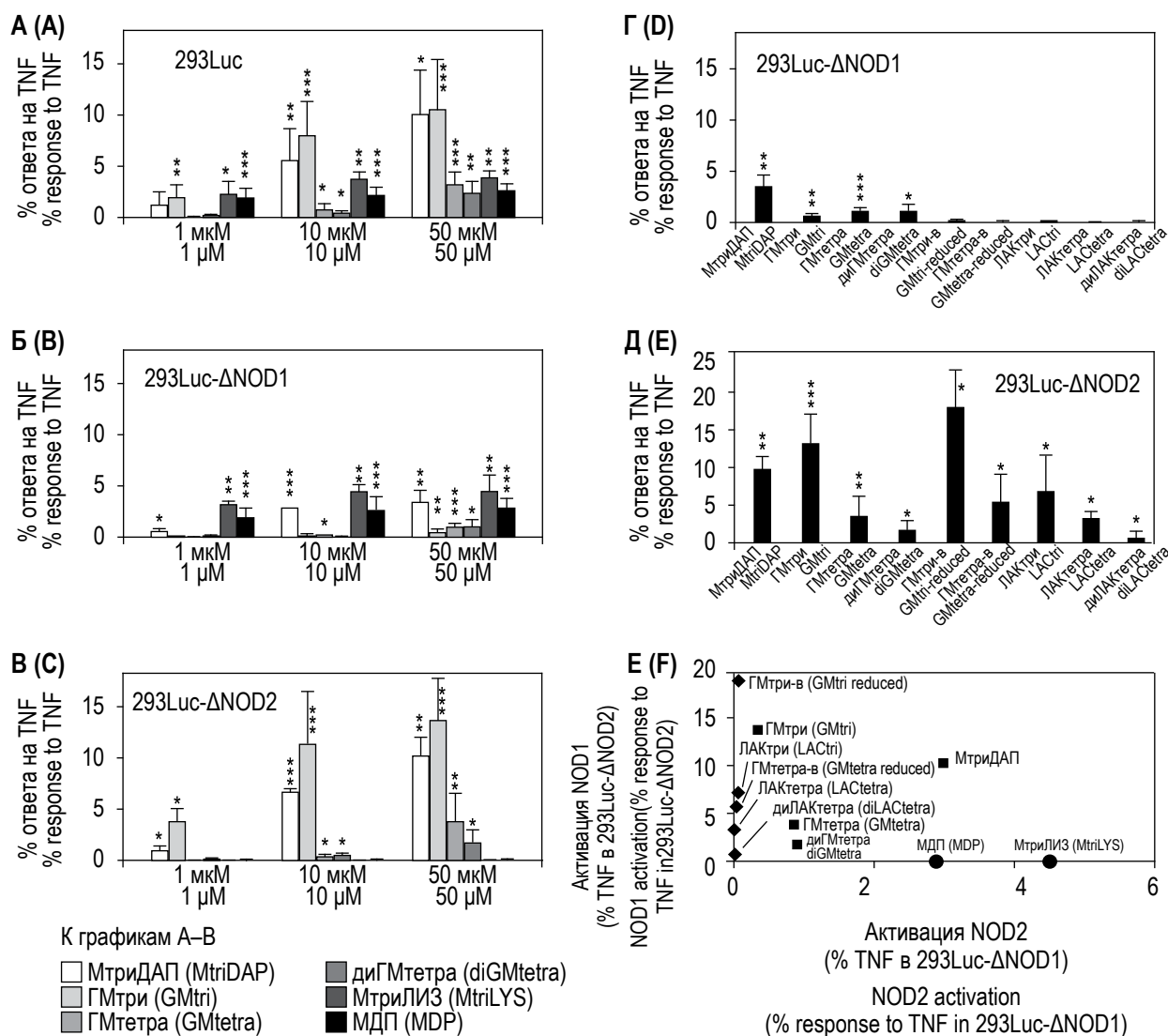


Рисунок 3. Активность нативных мурамилпептидов и их производных по отношению к рецепторам NOD1 и NOD2 человека

Примечание. А-В – клетки 293Luc, 293Luc-ΔNOD1 и 293Luc-ΔNOD2 стимулировали указанными нативными мурамилпептидами в 3 различных концентрациях в течение 24 ч., после чего измеряли активность люциферазы.

Г и Д – сопоставление активности нативных и модифицированных мурамилпептидов (все в концентрации 50 мкМ) по отношению к рецепторам NOD2 (Г) и NOD1 (Д).

На графиках А-Д показаны $M \pm \sigma$, от 3 до 10 экспериментов на точку.

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ при сравнении с нестимулированными клетками t-тестом Стьюдента для одного образца.

Согласно методике расчета, ответ нестимулированных клеток всегда составлял 0%, ответ на TNF – 100%.

Е – активность исследованных соединений по отношению к NOD1 и NOD2 показана на двумерном графике (пояснения – см. в тексте), использованы средние значения из рисунка 3Г и 3Д, все агонисты в концентрации 50 мкМ.

Селективные агонисты NOD1 обозначены ромбами, селективные агонисты NOD2 – кружками, двойные агонисты – квадратами.

Figure 3. Activity of native muramyl peptides and their derivatives for human NOD1 and NOD2 receptors

Note. Plots A to C, 293 Luc cells, 293Luc-ΔNOD1 or 293Luc-ΔNOD2 cells stimulated by native muramyl peptides at 3 different concentrations for 24 hours, followed by measuring luciferase activity.

D and E, comparative activity for native and modified muramyl peptides (at a concentration of 50 μM) for NOD2 (D) and NOD1 (E). At the graphs A to E, $M \pm \sigma$ values are shown (3 to 10 independent experiments per data point).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, compared with non-stimulated cells by Student t test for a single sample.

According to the calculation approach, response of non-stimulated cells was taken as 0%, TNF-induced response was 100%.

F, activity for NOD1 and NOD2 of the compounds studied is shown at the 2-dimensional graph (for explanations, see text). Mean values from the 3D and 3E are used, all agonists are applied at the concentration of 50 μM.

Selective NOD1 agonists are indicated as rhombi; selective NOD2 agonists, circles; double agonists are shown by squares.

группу составляют мурамилпептиды с нативным остатком MurNAc и без meso-DAP (МДП, МтриЛИЗ). Это селективные агонисты NOD2. Третью группу составляют мурамилпептиды с нативным остатком MurNAc и с наличием остатка meso-DAP. Это вещества с двойным агонизмом (NOD1+NOD2). При этом, как и в первой группе, активность в отношении NOD1 выше у мурамилпептидов с концевым положением meso-DAP (ГМтри, МтриДАП).

Обсуждение

В отличие от предшествующих работ по рецепторной специфичности мурамилпептидов, в настоящей работе использована клеточная модель с естественной экспрессией NOD1 и NOD2, а также исследованы микромолярные концентрации мурамилпептидов. Важно, что Kd-связывание рецептора NOD1 с агонистами лежит именно в микромолярном диапазоне [14] (для NOD2 данные о Kd пока отсутствуют).

Полученные данные несколько видоизменяют существующие представления о рецепторной специфичности мурамилпептидов. Так, активаторами NOD2 являются различные нативные мурамилпептиды, независимо от наличия/отсутствия остатка meso-DAP и от длины пептидной цепи. Ключевым условием для активации NOD2 является наличие пиранозного кольца в остатке MurNAc. Таким образом, NOD2 является универсальным сенсором ПГ не только потому, что узнает МДП — общий структурный мотив всех ПГ [11], но и потому, что способен распознавать разнообразные — возможно, любые — нативные мурамилпептиды грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Активаторами рецептора NOD1 являются только мурамилпептиды с остатком meso-DAP. Однако, по нашим данным, активностью в отношении NOD1 обладают все meso-DAP-содержащие мурамилпептиды, а не только те, у которых meso-DAP экспонирован на конце молекулы (хотя последние более активны). Наличие остатка MurNAc и нативность его структуры не являются обязательными свойствами агонистов NOD1, что согласуется с данными литературы [5, 12].

Полученные данные показывают, что рецептор NOD2 играет незаменимую роль в распознавании мурамилпептидов, тогда как NOD1 в известной степени избыточен. NOD2 абсолютно необходим для распознавания мурамилпептидов грамположительных бактерий, таких как МтриЛИЗ, поскольку такие мурамилпептиды даже в высоких концентрациях не активируют NOD1. С другой стороны, meso-DAP-содержащие мура-

милпептиды грамотрицательных бактерий, являющиеся агонистами NOD1, могут активировать и NOD2, хотя и с меньшей эффективностью. Возможно, именно поэтому инактивирующие мутации NOD2 проявляются фенотипически в виде воспалительных заболеваний кишечника [17], тогда как мутации NOD1 не имеют четких клинических проявлений.

Продемонстрированная в работе связь между ключевыми химическими особенностями мурамилпептидов и их активностью (рис. 3Е) имеет значение и для разработки иммуностимуляторов мурамилпептидной природы. Хотя сигнальные пути NOD1 и NOD2 весьма схожи [4], распределение этих двух рецепторов в клетках и тканях существенно различается, что следует учитывать при прогнозировании биологических эффектов. NOD2 высоко экспрессируется в клетках Панета подвздошной кишки и в моноцитах крови, где значительно преобладает над NOD1 [6, 9]. NOD1 широко представлен в различных эпителиальных и мезенхимальных клетках, где NOD2 практически отсутствует [22]. Ряд клеток врожденной иммунной системы, в частности макрофаги и дендритные клетки, экспрессируют в равной степени и NOD1, и NOD2 [6, 9]. Таким образом, клетки-мишени NOD1-агонистов находятся в основном на тканевом уровне, тогда как мишени NOD2-агонистов — как в тканях, так и в системной циркуляции. Нативные meso-DAP-содержащие мурамилпептиды грамотрицательных бактерий, являясь веществами с двойной рецепторной специфичностью (NOD1+NOD2), вероятно, будут оказывать более мощное и генерализованное действие на иммунную систему, чем другие мурамилпептидные препараты. Однако, учитывая возможные побочные эффекты активации NOD1, в частности индукцию резистентности к инсулину [18], следует отдавать предпочтение местному применению таких мурамилпептидов с целью повышения антимикробных свойств эпителиальных клеток. При необходимости meso-DAP-содержащие мурамилпептиды могут быть конвертированы в специфические агонисты NOD1 путем восстановления или элиминации остатка MurNAc. Для системного применения, вероятно, более безопасны специфические агонисты NOD2, действие которых сфокусировано на «профессиональных» клетках врожденного иммунитета — моноцитах, макрофагах, дендритных клетках.

Таким образом, в работе получены новые данные о рецепторной специфичности мурамилпептидов, которые имеют значение для понимания роли NOD1 и NOD2 во врожденном иммунитете, а также механизмов действия мурамилпептидных иммуностимуляторов.

Список литературы / References

1. Винницкий Л.И., Бунятян К.А., Пинегин Б.В., Миронова Е.В., Шве́ц Л.И., Волков А.А., Инвьяева Е.В., Андропова Т.М., Хаитов Р.М. Отечественный иммуномодулятор нового поколения Ликопид в комплексном лечении и профилактике инфекционных осложнений в хирургической клинике // Вестник Российской академии медицинских наук, 1997. № 11. С. 46-49. [Vinnitsky L.I., Buniatian K.A., Pinegin B.V., Mironova E.V., Shvets L.I., Volkov A.A., Inviyaeva E.V., Andronova T.M., Khaitov R.M. Domestic immunomodulator of a new generation, Licopid, in the comprehensive therapy and prevention of infectious complications in surgery. *Vestnik rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 1997, no. 11, pp. 46-49. (In Russ).]
2. Ando K., Mori K., Corradini N., Redini F., Heymann D. Mifamurtide for the treatment of nonmetastatic osteosarcoma. *Expert Opin. Pharmacother.*, 2011, Vol. 12, pp. 285-292.
3. Beranova-Giorgianni S., Desiderio D.M., Pabst M.J. Structures of biologically active muramyl peptides from peptidoglycan of *Streptococcus sanguis*. *J. Mass Spectrom.*, 1998, Vol. 33, pp. 1182-1191.
4. Boyle J.P., Parkhouse R., Monie T.P. Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway. *Open Biol.*, 2014, Vol. 4, 140178. doi: 10.1098/rsob.140178.
5. Chamaillard M., Hashimoto M., Horie Y., Masumoto J., Qiu S., Saab L., Ogura Y., Kawasaki A., Fukase K., Kusumoto S., Valvano M.A., Foster S.J., Mak T.W., Nunez G., Inohara N. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.*, 2003, Vol. 4, pp. 702-707.
6. Dagil Y.A., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Mazurov D.V., Pashenkov M.V. The Dual NOD1/NOD2 Agonism of Muropeptides Containing a Meso-Diaminopimelic Acid Residue. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, e0160784. doi: 10.1371/journal.pone.0160784.
7. Davis K.M., Nakamura S., Weiser J.N. Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *J. Clin. Invest.*, 2011, Vol. 121, pp. 3666-3676.
8. Ellouz F., Adam A., Ciorbaru R., Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, Vol. 59, pp. 1317-1325.
9. Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreulx D., Caroff M., Cavaillon J.M., Philpott D.J., Adib-Conquy M. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.*, 2005, Vol. 35, pp. 2459-2470.
10. Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jehanno M., Viala J., Tedin K., Taha M.K., Labigne A., Zahringer U., Coyle A.J., DiStefano P.S., Bertin J., Sansonetti P.J., Philpott D.J. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, 2003, Vol. 300, pp. 1584-1587.
11. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., Philpott D.J., Sansonetti P.J. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, pp. 8869-8872.
12. Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M., Blanot D., Boneca I.G., Philpott D.J., Sansonetti P.J., Mengin-Lecreulx D. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, pp. 41702-41708.
13. Inohara N., Ogura Y., Fontalba A., Gutierrez O., Pons F., Crespo J., Fukase K., Inamura S., Kusumoto S., Hashimoto M., Foster S.J., Moran A.P., Fernandez-Luna J.L., Nunez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, pp. 5509-5512.
14. Laroui H., Yan Y., Narui Y., Ingersoll S.A., Ayyadurai S., Charania M.A., Zhou F., Wang B., Salaita K., Sitaraman S.V., Merlin D. L-Ala-gamma-D-Glu-meso-diaminopimelic acid (DAP) interacts directly with leucine-rich region domain of nucleotide-binding oligomerization domain 1, increasing phosphorylation activity of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 and its interaction with nucleotide-binding oligomerization domain 1. *J. Biol. Chem.*, 2011, Vol. 286, pp. 31003-31013.
15. Magalhaes J.G., Philpott D.J., Nahori M.A., Jehanno M., Fritz J., Le Bourhis L., Viala J., Hugot J.P., Giovannini M., Bertin J., Lepoivre M., Mengin-Lecreulx D., Sansonetti P.J., Girardin S.E. Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO Rep.*, 2005, Vol. 6, pp. 1201-1207.
16. Pashenkov M.V., Popilyuk S.F., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Murugin V.V., Fedenko E.S., Khaitov R.M., Pinegin B.V. Muropeptides trigger distinct activation profiles in macrophages and dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.*, 2010, Vol. 10, pp. 875-882.
17. Philpott D.J., Sorbara M.T., Robertson S.J., Croitoru K., Girardin S.E. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2013, Vol. 14, pp. 9-23.
18. Schertzer J.D., Tamrakar A.K., Magalhaes J.G., Pereira S., Bilan P.J., Fullerton M.D., Liu Z., Steinberg G.R., Giacca A., Philpott D.J., Klip A. NOD1 activators link innate immunity to insulin resistance. *Diabetes*, 2011, Vol. 60, pp. 2206-2215.
19. Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, 1972, Vol. 36, pp. 407-477.

20. Tukhvatulin A.I., Logunov D.Y., Gitlin I.I., Shmarov M.M., Kudan P.V., Adzhieva C.A., Moroz A.F., Kostyukova N.N., Burdelya L.G., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L., Gudkov A.V. A *In Vitro* and *In Vivo* Study of the Ability of NOD1 Ligands to Activate the Transcriptional Factor NF- κ B. *Acta Naturae*, 2011, Vol. 3, pp. 77-84.
21. Vollmer W., Bertsche U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, Vol. 1778, pp. 1714-1734.
22. Watanabe T., Asano N., Fichtner-Feigl S., Gorelick P.L., Tsuji Y., Matsumoto Y., Chiba T., Fuss I.J., Kitani A., Strober W. NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *J. Clin. Invest.*, 2010, Vol. 120, pp. 1645-1662.

Авторы:

Дагиль Ю.А. — аспирант, лаборатория клинической иммунологии ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» ФМБА России, Москва, Россия

Арбатский Н.П. — к.х.н., научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» ФМБА России, Москва, Россия

Алхазова Б.И. — младший научный сотрудник, лаборатория препаративной биохимии ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» ФМБА России, Москва, Россия

Львов В.Л. — к.х.н., заведующий лабораторией препаративной биохимии ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» ФМБА России, Москва, Россия

Пащенко М.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» ФМБА России, Москва, Россия

Authors:

Dagil Yu.A., Postgraduate Student, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

Arbatsky N.P., PhD (Chemistry), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

Alkhazova B.I., Junior Research Associate, Laboratory of Preparative Biochemistry, National Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

Lyov V.L., PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Preparative Biochemistry, National Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

Pashenkov M.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

Поступила 07.04.2017
Принята к печати 02.05.2017

Received 07.04.2017
Accepted 02.05.2017

СРАВНИТЕЛЬНО МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ СООТНОШЕНИЙ ЛИМФОЦИТОВ РАЗНЫХ СТАДИЙ ЗРЕЛОСТИ В ТИМУСЕ НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Юрчинский В.Я., Морева Л.А.

ФГБОУ ВО «Смоленский государственный университет», г. Смоленск, Россия

Резюме. Основная задача тимуса, как центрального органа лимфоидной системы, заключается в формировании пула иммунокомпетентных аутоотолерантных тимоцитов. Процесс дифференцировки лимфоцитов в тимусе во многом зависит от уровня организации животного и особенностей среды его обитания. Однако, к настоящему моменту, по причине дефицита сравнительно морфологических работ, малоизученным оказывается вопрос изменчивости морфологических показателей лимфоидного компонента тимуса у представителей различных классов наземных позвоночных животных. Поэтому основная цель нашей работы заключалась в выявлении подобных зависимостей. В рамках данного исследования всего изучено 212 препаратов тимуса позвоночных животных, относящихся к классам: Земноводные (*Amphibia*), Пресмыкающиеся (*Reptilia*), Птицы (*Aves*), Млекопитающие (*Mammalia*), включая человека. Обнаружено, что морфологические показатели, отражающие характеристики процессов дифференцировки и созревания лимфоцитов в тимусе, в значительной степени определяются теми адаптивными изменениями, которые возникали в эволюции позвоночных во время формирования истинной наземности и теплокровности. По этой причине, при сравнении земноводных и пресмыкающихся, а также пойкилотермных позвоночных с гомойотермными, были обнаружены существенные, по мнению авторов, отличия в количестве тимоцитов разных стадий зрелости, наполняющих корковое и мозговое вещество тимуса, а также отличия в интенсивности деления тимоцитов. В свою очередь, сопоставление митотического индекса тимоцитов всех позвоночных, представленного сравнительно морфологического ряда, показало, что интенсивность пролиферации данных клеток в первую очередь зависит от энергетической емкости организма. Однако специфические адаптации, связанные с формированием определенной жизненной формы (например адаптации птиц к полету), также оказывают значительное влияние на интенсивность деления тимоцитов в тимусе. Определены морфологические особенности, характерные для тимуса человека, а также выявлены возможные причины подобных отличий. Обнаружено, что по морфологическим показателям лимфоидного компонента, тимус человека в большей степени схож с тимусом холоднокровных позвоночных, что проявляется уже на ранних стадиях онтогенеза. По мнению авторов статьи, такая ситуация связана с тем, что человек находится под воздействием пресса неблагоприятных антропогенных факторов, которые и приводят к некоторому отклонению морфологии тимуса человека от нормы, характерной для млекопитающих естественной среды обитания.

Ключевые слова: тимус, Т-лимфоциты, позвоночные животные, сравнительная морфология

Адрес для переписки:

Юрчинский Владислав Янович
ФГБОУ ВО «Смоленский государственный университет»
214000, Россия, г. Смоленск, ул. Пржевальского, 4.
Тел.: 8 (4812) 70-02-01.
Факс: 8 (4812) 38-31-57.
E-mail: zool72@mail.ru

Address for correspondence:

Yurchinsky Vladislav Ya.
Smolensk State University
214000, Russian Federation, Smolensk, Przhevalsky str., 4.
Phone: 7 (4812) 70-02-01.
Fax: 7 (4812) 38-31-57.
E-mail: zool72@mail.ru

Образец цитирования:

В.Я. Юрчинский, Л.А. Морева «Сравнительно морфологическое изучение количественных соотношений лимфоцитов разных стадий зрелости в тимусе неполовозрелых позвоночных» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 715–720.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-715-720

© Юрчинский В.Я., Морева Л.А., 2017

For citation:

V.Ya. Yurchinsky, L.A. Moreva “Comparative morphological study of quantitative ratios of lymphocytes at different maturity stages in thymus of immature vertebrates”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 715–720.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-715-720

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-715-720

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL STUDY OF QUANTITATIVE RATIOS OF LYMPHOCYTES AT DIFFERENT MATURITY STAGES IN THYMUS OF IMMATURE VERTEBRATES

Yurchinsky V.Ya., Moreva L.A.

Smolensk State University, Smolensk, Russian Federation

Abstract. The main function of thymus, a central organ of lymphoid system, is to form a pool of immunocompetent autotolerant thymocytes. The process of lymphocyte differentiation within thymus largely depends on organization level of the vertebral animal and its environment (habitat). So far, variability of morphological parameters of lymphoid component in thymus have been poorly studied for distinct representatives of various terrestrial vertebrate, due to the lack of comparative morphological studies. Therefore, the main purpose of our work was to identify this kind of dependences. In this study, on the example of prepubertal representatives belonging to four classes of vertebrate animals (*Chordata*, *Vertebrata*) including humans, we conducted a comparative morphological study of variability for main micromorphological parameters of lymphoid components in thymus gland. We have studied 212 preparations of thymus glands from 4 classes of vertebrate animals: *Amphibia*, *Reptilia*, *Aves*, *Mammalia*. The changes in total amount of thymocytes were studied for cortical and medullary substance of thymus gland. Percentage of thymocytes at different maturity stages, and mitotic thymocyte indexes were also studied.

On the basis of these data, a conclusion was made about differences in intensity of processes, connected with maturation and proliferation of lymphoid cells in thymus gland of distinct animals which are different in organization level and habitat could be determined by with different influence of adaptive changes which occurred in the course of evolution of vertebrates during. It was found that the morphological parameters reflecting the characteristics of the differentiation processes and maturation of lymphocytes in thymus are largely determined by adaptive changes that arose in the vertebrate evolution during the formation of true terrestrial and warm-bloodedness. Comparison of amphibians and reptiles, as well as cold-blooded beings with warm-blooded animals revealed differences in the number of thymocytes at different maturity levels in cortical and medullary zones, as well as differences in thymocyte division rates. In turn, comparison of mitotic index for the thymocytes of all vertebrates, within this morphological range, showed that intensity of thymocyte proliferation primarily depends on the energy capacity of the given organism. However, specific adaptations associated with evolution to a distinct certain living form (for example, adaptation of birds to flight) also exerts a significant effect upon rates of thymocyte division. Morphological features characteristic to the human thymus were determined, and possible causes of such differences were identified. It was found, that morphological parameters of the lymphoid component in human thymus are more similar to those of thymus from cold-blooded vertebrates which is already evident from early stages of ontogeny. We guess that this finding may be explained by exposure of humans to numerous unfavorable anthropogenic factors, which lead to some deviation of thymic morphology from the values, which are observed in mammals from the natural habitat. The obtained data are of interest for theoretical and practical biology and medicine.

Keywords: thymus gland, T lymphocytes, vertebrates, comparative morphology

Введение

В филогенезе позвоночных происходило поступательное совершенствование иммунной системы [13]. В результате чего морфология тимуса может значительно отличаться у представителей разных классов [16]. Изменчивость показателей иммунной системы у животных экологически целесообразна и сочетается с индивидуальными особенностями биологии группы [18, 19]. Однако нарастание отличий строения и функций тимуса между примитивными и развитыми группами позвоночных не может быть бесконечным, поскольку данный орган выполняет вполне определенные, сходные у всех животных функции, связанные с обеспечением организма пулом аутоотолерантных, иммунокомпетентных Т-лимфоцитов [1, 3, 4, 9, 12, 14]. В настоящее время в доступной литературе недостаточно данных, на основе которых можно судить о том,

какие сходства и отличия лимфоидной составляющей тимуса сформировались у позвоночных. Глубинные причины и механизмы данных отличий неизвестны, что сужает наши представления не только о морфологии тимуса, но и ограничивает понимание адаптивных возможностей иммунитета в целом [8].

Поэтому основная цель данной работы заключалась в сравнительно-морфологическом изучении количественных соотношений тимоцитов разных стадий зрелости в тимусе наземных позвоночных естественной среды обитания, включая человека.

Материалы и методы

Исследование тимуса проводили на примере 14-ти видов неполовозрелых позвоночных, относящихся к четырем классам: класс Земноводные (*Amphibia*): Лягушка прудовая (*Rana esculenta*,

п 18), Лягушка травяная (*R. temporaria*, п 14), Лягушка остромордая (*R. terrestris*, п 18); класс Пресмыкающиеся (*Reptilia*): Ящерица прыткая (*Lacerta agilis*, п 18), Гадюка обыкновенная (*Vipera berus*, п 12), Уж обыкновенный (*Natrix natrix*, п 18); класс Птицы (*Aves*): Голубь сизый (*Columba livia*, п 18), Галка обыкновенная (*Corvus monedula*, п 6), Мухоловка серая (*Muscicapa striata*, п 8); класс Млекопитающие (*Mammalia*): Бурозубка обыкновенная (*Sorex araneus*, п 18), Бурозубка средняя (*S. caecutiens*, п 12), Рыжая полевка (*Clethrionomys glareolus*, п 18), Мышь лесная (*Apodemus uralensis*, п 16), Человек (*Homo sapiens*, п 18).

Возраст животных определялся по общепринятым методикам [2, 20, 21]. Исследование проводили на примере неполовозрелых особей: земноводные и пресмыкающиеся 1–2 года, птицы 1–3 года, насекомоядные млекопитающие 2–5 месяцев, грызуны 1–1,5 месяца. Отлов животных осуществляли в экосистемах, не нарушенных антропогенным воздействием. Возраст человека определяли согласно классификации, принятой на 7-й Всесоюзной конференции по возрастной морфологии, физиологии и биохимии в 1965 году. Для исследования тимуса человека использовали материал, набранный на базе отделения клинической патологии при Смоленском областном институте патологии. Исследовали новорожденных обоего пола, погибших вследствие родовой травмы или насильственных причин. Весь секционный материал тщательно отбирали по анамнезу с целью исключения причин смерти, которые могли бы существенно изменить структуру тимуса. Всего изучено 212 препаратов неполовозрелых позвоночных. Эвтаназию животных осуществляли передозировкой эфирным наркозом (ЗАО «Вектон») в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения Российской Федерации к работе экспериментально-биологических клиник, а также «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях» (Страсбург, 1986). Тимус, изъятый сразу после эвтаназии, взвешивали и измеряли. Доли тимуса фиксировали 10% нейтральным формалином, обезживали и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы тимуса (5 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином, а также азур-эозином по Романовскому–Гимзе. Съемку препаратов проводили с использованием системы визуализации Sony Tour Cam 5.1. ("Touptek", Китай), установленной на микроскопе Микромед 3 Professional («Микромед», Китай). Морфометрические исследования препаратов тимуса проводили с помощью компьютерной программы на базе цифровой камеры Tourcam 5.0. При изучении цитоконструкции тимуса подсчет количества больших, средних и малых тимоцитов в корковом и мозговом веществе тимуса, а также общего количества тимоцитов проводили на условной единице площади в 0,1 мм² (ок. × 10, об. × 60 под масляной иммерсией) на цифровых

фотографиях. Для каждого препарата оценивали 10 полей зрения. Количество митозов в корковой зоне и мозговом веществе (митотический индекс — МИ) определяли на 1000 зарегистрированных клеток (ок. × 15, об. × 90 под масляной иммерсией). Результаты обрабатывали статистически с вычислением среднего арифметического, стандартной ошибки, дисперсии. Значимость различий между сравниваемыми группами оценивали методами параметрической и непараметрической статистики (t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна–Уитни и тест Краскела–Уоллиса). Анализ распределения признаков на нормальность проводили с использованием критериев Лиллиефорса и Шапиро–Уилка, а условие равенства дисперсий выборок проверяли по критерию Левена.

Результаты

У всех позвоночных, независимо от уровня организации и среды обитания, в корковом и мозговом веществе тимуса наблюдается количественное преобладание клеток более поздних стадий зрелости над менее дифференцированными элементами лимфоидного ряда (табл. 1).

Эта закономерность усиливается при переходе от коркового вещества к мозговому, а также при переходе от примитивных представителей ряда (земноводные) к более развитым (теплокровные позвоночные). Так, в коре тимуса у холоднокровных позвоночных количество больших, средних и малых тимоцитов соотносится как 1:1,5:2, тогда как в мозговом веществе тимуса увеличивается количество средних и особенно малых тимоцитов, и соотношение становится равным 1:2:5. В корковом веществе тимуса мелких млекопитающих и птиц по сравнению с примитивными позвоночными количество зрелых тимоцитов увеличивается. Соотношение клеток оказывается равным 1:2:5, что совпадает с показателями мозгового вещества тимуса холоднокровных позвоночных. В свою очередь, в мозговом веществе тимуса теплокровных животных, соотношение клеток существенно изменяется в сторону увеличения зрелых тимоцитов: 1:5:11. По сравнению с другими теплокровными позвоночными, обитателями природной среды, в коре и мозговом веществе тимуса человека количество больших и средних тимоцитов оказывается наиболее высоким, тогда как по численности малых тимоцитов коркового вещества тимуса человек уступает птицам и млекопитающим животным (табл. 1). В результате соотношение клеток разных стадий зрелости в тимусе человека в большей степени напоминает таковое у холоднокровных позвоночных: 1:1,5:2,5 в коре и 1:2:5 в мозговом веществе (табл. 1).

Наиболее значительным количественное преобладание малых тимоцитов над большими наблюдается в корковом веществе тимуса мелких млекопитающих и особенно птиц, соответственно, в 4 и 6 раз (табл. 1). Однако у человека, а так-

же холоднокровных позвоночных при сопоставлении данных групп клеток такое преобладание хоть и сохраняется, но оказывается не столь выраженным (в 2-2,5 раза). Напротив, в мозговом веществе тимуса наиболее значительно по своему количеству малые тимоциты преобладают над большими у земноводных и человека (соответственно, в 4,5 и 5,4 раза), тогда как у птиц, млекопитающих животных, а также пресмыкающихся

такое преобладание оказывается только двукратным (табл. 1).

Тимус всех теплокровных позвоночных, включая человека, отличается от данного органа земноводных и пресмыкающихся повышенным содержанием общего количества тимоцитов и более высокими темпами их деления как в коре, так и в мозговом веществе (табл. 2). По общему количеству лимфоцитов коркового и мозгового вещества тимуса птицы не уступают млекопитающим, тогда

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СООТНОШЕНИЕ ЛИМФОЦИТОВ РАЗНЫХ СТАДИЙ ЗРЕЛОСТИ В ТИМУСЕ ПОЗВОНОЧНЫХ ($\bar{x} \pm S_x$)

TABLE 1. QUANTITATIVE RATIO OF THYMIC LYMPHOCYTES AT DIFFERENT MATURITY STAGES IN DIFFERENT CLASSES OF VERTEBRATES ($\bar{x} \pm S_x$)

	Кора (S = 0,1мм ²) Cortex			Мозговое вещество (S = 0,1 мм ²) Medullary substance		
	большие тимоциты large thymocytes	средние тимоциты medium-sized thymocytes	малые тимоциты small thymocytes	большие тимоциты large thymocytes	средние тимоциты medium-sized thymocytes	малые тимоциты medium thymocytes
<i>Amphibia</i>	67,73±5,4 ^{b, d, e} 21,98%	93,08±8,8 ^{b, c, d, e} 30,21%	147,31±10,2 ^{b, c, d, e} 47,81%	17,9±2,2 ^{b, e} 12,83%	40,89±3,3 ^{b, c, d, e} 29,31%	80,74±6,9 ^{b, c, d, e} 57,86%
<i>Reptilia</i>	98,43±7,6 ^{a, c, e} 21,09%	143,32±11,6 ^{a, d, e} 30,71%	224,95±19,8 ^{a, c, d, e} 48,20%	33,85±4,1 ^{a, c, d, e} 12,66%	72,93±6,9 ^{a, c, d, e} 27,28%	160,57±11,4 ^{a, c, d, e} 60,06%
<i>Aves</i>	69,53±5,1 ^{b, d, e} 10,65%	148,86±10,5 ^{a, d, e} 22,80%	434,49±32,9 ^{a, b, e} 66,55%	19,83±1,8 ^{b, e} 5,85%	93,71±8,2 ^{a, b} 27,65%	225,38±15,9 ^{a, b} 66,50%
<i>Mammalia</i>	95,16±8,4 ^{a, c, e} 13,55%	194,19±15,7 ^{a, b, c} 27,65%	412,96±33,7 ^{a, b, e} 58,80%	19,56±1,8 ^{b, e} 5,80%	97,65±8,5 ^{a, b} 28,95%	220,10±18,8 ^{a, b} 65,25%
<i>H. sapiens</i>	138,03±8,9 ^{a, b, c, d} 20,30%	201,88±19,4 ^{a, b, c} 29,69%	340,04±29,4 ^{a, b, c, d} 50,01%	46,21±4,2 ^{a, b, c, d} 11,45%	109,78±8,3 ^{a, b} 27,20%	247,62±17,3 ^{a, b} 61,35%

Примечание. Достоверность отличий ($p \leq 0,05$) по сравнению: ^a – с земноводными, ^b – с рептилиями, ^c – с птицами, ^d – с млекопитающими (животные), ^e – с человеком.

Note. Significance of differences ($p \leq 0,05$) as compared with: ^a – amphibians, ^b – reptiles, ^c – birds, ^d – mammals, ^e – humans.

ТАБЛИЦА 2. МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КОРКОВОГО И МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА ТИМУСА ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА ($\bar{x} \pm S_x$)

TABLE 2. MORPHOMETRIC INDICES OF THE CORTICAL AND MEDULLARY SUBSTANCE IN THE THYMUS OF VERTEBRATES AND HUMANS ($\bar{x} \pm S_x$)

Группа Evolutionary class	Количество тимоцитов (S = 0,1мм ²) Number of thymocytes		Митотический индекс (% на 1000 тимоцитов) Mitotic index (% per 1000 thymocytes)	
	Кора Cortex	Мозговое вещество Medullary substance	Кора Cortex	Мозговое вещество Medullary substance
<i>Amphibia</i>	308,12±29,9 ^{c, d, e}	139,54±21,6 ^{b, c, d, e}	1,74±0,34 ^{c, d, e}	1,83±0,32 ^{d, e, f}
<i>Reptilia</i>	466,69±34,8 ^{c, d, e}	267,35±27,6 ^{a, c, d, e}	2,19±0,29 ^{c, d, e}	1,45±0,31 ^{c, d, e}
<i>Aves</i>	652,88±48,24 ^{a, b}	338,91±38,27 ^{a, b, e}	2,79±0,42 ^{a, b, d}	1,86±0,22 ^{b, d, e}
<i>Mammalia</i>	702,32±58,1 ^{a, b}	337,31±32,35 ^{a, b, e}	3,78±0,50 ^{a, b, c, e}	3,07±0,45 ^{a, b, c, e}
<i>H. sapiens</i>	679,95±46,9 ^{a, b}	403,61±18,9 ^{a, b, c, d}	2,69±0,36 ^{a, b, d}	2,55±0,41 ^{a, b, c, d}

Примечание. Достоверность отличий ($p \leq 0,05$) по сравнению: ^a – с земноводными, ^b – с рептилиями, ^c – с птицами, ^d – с млекопитающими (животные), ^e – с человеком.

Note. Significance of differences ($p \leq 0,05$), as compared with: ^a – amphibians, ^b – reptiles, ^c – birds, ^d – mammals, ^e – humans.

как митотическая активность этих клеток мозгового вещества тимуса птиц понижена (табл. 2).

В свою очередь для земноводных, по сравнению с остальными позвоночными, характерно не только пониженное содержание общего количества клеток лимфоидного ряда, но и сниженные показатели их митотического индекса (табл. 1, 2). По количеству тимоцитов разных стадий зрелости пресмыкающиеся занимают промежуточное положение между земноводными и птицами. По численности больших тимоцитов пресмыкающиеся превосходят теплокровных позвоночных (за исключением человека), а по численности малых тимоцитов уступают им (табл. 1).

Все это дополняется пониженным показателями их митотического индекса (табл. 2). Примечательно, что у пресмыкающихся, птиц и млекопитающих животных величина митотического индекса коркового вещества превышает соответствующий показатель мозгового вещества, тогда как у человека и земноводных темпы пролиферации тимоцитов в коре и мозговом веществе одинаковы. При этом тимус человека по интенсивности деления лимфоцитов уступает только мелким млекопитающим (табл. 2).

Обсуждение

По мере усложнения морфофункциональной организации наземных позвоночных происходило закономерное совершенствование иммунной системы. Это выражалось в интенсификации процессов, связанных с формированием предшественников лимфоцитов, их притоке в тимус, а также скорости созревания лимфоидных элементов в нем. Особенно масштабные изменения процессов, связанных с транспортом и созреванием лимфоцитов, происходят при развитии истинной наземности и появлении теплокровности. Это становится очевидным при сравнительном анализе полученных результатов состояния лимфоидного компонента тимуса теплокровных и холоднокровных позвоночных, а также пресмыкающихся и земноводных. Полученные данные подтверждают предположения других авторов о том, что эффективность иммунных реакций у позвоночных находится в зависимости от общего объема крови, скорости кровотока и интенсивности обмена веществ [15, 22].

Скорость созревания предшественников лимфоцитов в тимусе напрямую зависит от функциональной активности клеток ретикулярного эпителия [7]. Очевидно, наблюдаемое нами увеличение темпов созревания тимоцитов при переходе от примитивных наземных позвоночных к более развитым, связано с более интенсивной выработкой эпителиальными клетками тимуса целого ряда тимических факторов или гормонов, регулирующих этот процесс [10, 11]. Несомненно, совершенствующаяся в ряду позвоночных нервная система оказывает все более сильное регуляторное влияние на явления, происходящие в тимусе [5]. У теплокровных позвоночных про-

цессы созревания лимфоцитов в тимусе не только высокоинтенсивны, но и очень уязвимы по отношению к воздействию внешних неблагоприятных факторов [17]. Примером тому служит снижение скорости обсуждаемых явлений в тимусе человека, организм которого, по сравнению с млекопитающими естественной среды обитания, подвержен давлению целого комплекса факторов антропогенной среды. Неслучайно по многим показателям лимфоидной составляющей тимуса человек уже на ранних стадиях постнатального онтогенеза более сходен с холоднокровными позвоночными. Все это является причиной ослабления иммунитета человека, а также, судя по всему, вносит свой вклад в развитие аллергических реакций.

Имеющийся у всех позвоночных количественный перевес на стороне зрелых форм тимоцитов над менее дифференцированными клетками, свидетельствует о преобладании темпов созревания тимоцитов над скоростью поступления незрелых форм клеток в тимус. Нарастание масштабов количественных отличий между зрелыми и незрелыми тимоцитами при переходе от примитивных позвоночных к более развитым указывает также на усиление пролиферативных явлений в тимусе позвоночных, что связано с усиливающимся влиянием тимического эпителиального микроокружения. Пул клеток, готовых в любой момент выполнять свои иммунные функции, очень важен для позвоночных животных и позволяет сохранять иммунный статус в случае массивного проникновения антигенов или какого-либо другого стрессового воздействия [3, 4]. С повышением уровня организации общее количество зрелых тимоцитов, одномоментно находящихся в тимусе, неуклонно возрастает, что свидетельствует о развитии возможностей иммунитета у теплокровных по сравнению с холоднокровными и у амниот по сравнению с анамниями.

У всех позвоночных обнаружено количественное преобладание зрелых тимоцитов в коре тимуса, что указывает на значительную роль клеток микроокружения этой зоны в процессах созревания лимфоцитов на самых последних стадиях их формирования. Это указывает на то, что корковая зона играет значительную роль в процессах специализации тимоцитов и их негативной селекции. Вероятно, данная характеристика коры может расцениваться в качестве базового свойства тимуса [6]. Однако, судя по характеру полученных результатов, именно у птиц функциональная активность коры, связанная с обеспечением окончательного формирования тимоцитов, оказывается наиболее высокой. При этом отличительной чертой тимуса млекопитающих является их способность инициировать более активную пролиферацию созревающих тимоцитов. Вероятно, две независимо развивающиеся в эволюции ветви теплокровных (птицы и млекопитающие) опираются на несколько отличающиеся функциональные механизмы формирования

иммунных качеств Т-лимфоцитов в тимусе. Очевидно, определенное влияние на формирование таких отличий оказывают наличие бursy у птиц и акцент на количественную составляющую В-лимфоцитов.

Таким образом, в тимусе неполовозрелых позвоночных имеет место определенный баланс в соотношении тимоцитов разных стадий зрелости, что является отражением стабильности функций иммунитета, характеризует процессы кинетики лимфоидных клеток, позволяет делать выводы относительно совершенствования функций ретикулярного эпителия тимуса.

Благодарности

Авторы статьи выражают благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований. Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-97530 р-центр-а.

Авторы статьи выражают благодарность д.б.н., профессору Ерофеевой Людмиле Михайловне за консультативную помощь по тематике научной работы.

Авторы статьи выражают благодарность Смоленскому институту патологии при Смоленском государственном медицинском университете за помощь в изготовлении гистологических препаратов.

Список литературы / References

1. Кветной И.М., Ярилин А.А., Полякова В.О., Князькин И.В. Нейроиммуноэндокринология тимуса. СПб.: ДЕАН, 2005. 160 с. [Kvetnoy I.M., Yarilin A.A., Polyakova V.O., Knazkin I.V. Neuroimmunoendocrinology of thymus]. St. Petersburg: DEAN, 2005. 160 p.
2. Клевезаль Г.А. Принципы и методы определения возраста млекопитающих. М.: КМК, 2007. 282 с. [Klevezal G.A. Principles and methods of determinations of mammals]. Moscow: KMK, 2007. 282 p.
3. Anderson M.S., Venanzi E.S., Chen Z., Berzins S.P., Benoist C., Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*, 2005, Vol. 23, no. 2, pp. 227-239.
4. Anderson G., Lane P.J. Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 2008, Vol. 7, no. 12, pp. 954-963.
5. Andersson U., Tracey K.J. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 30, no. 1, pp. 313-335.
6. Bai M., Doukas M., Papoudou-Bai A., Kanavaros P. Immunohistological analysis of cell cycle and apoptosis regulators in thymus. *Anat. Anat. Anatomischer Anzeiger*, 2013, Vol. 195, no. 2, pp. 159-165.
7. Benz C., Heinzel K., Bleul C.C. Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. *Eur. J. Immunol.*, 2004, Vol. 34, no. 12, pp. 3652-3663.
8. Davis S. Environment modulation of the immune system via the endocrine system. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 1998, Vol. 15, no. 5, pp. 283-289.
9. Gordon J., Manley N.R. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development*, 2011, Vol. 138, no. 18, pp. 3865-3878.
10. Koch U., Radtke U.F. Mechanisms of T cell Development and Transformation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2011, Vol. 27, pp. 539-562.
11. Laurent J., Bosco N., Marche P.N., Ce R. New insights into the proliferation and differentiation of early mouse thymocytes redig. *Int. Immunol.*, 2004, Vol. 16, no. 8, pp. 1069-1080.
12. Misslitz A., Pabst O., Hintzen G., Ohl L., Kremmer E., Petrie H.T., Forster R. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J. Exp. Med.*, 2004, Vol. 200, no. 4, pp. 481-491.
13. Ohta Y., Flajnik M. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 28, pp. 10723-10728.
14. Petrie H.T. Cell migration and the control of the post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nature Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, no. 11, pp. 859-866.
15. Reverberi R., Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus.*, 2007, Vol. 5, no. 4, pp. 227-240.
16. Rodewald H.R. Thymus organogenesis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 26, pp. 355-388.
17. Shaffer M.H., Huang Y., Corbo E., Wu G.F., Veles M., Choi J.K., Saotome I., Cannon J.L., McClatchey A. I., Sperling A.I., Maltzman J.S., Oliver P.M., Bhandoora A., Laufer T.M., Burkhardt J.K. Ezrin Is Highly Expressed in Early Thymocytes, but Dispensable for T Cell Development in Mice. *PLoS ONE*, 2010, Vol. 5, no. 8, pp. 124-137. doi: 10.1371/journal.pone.0012404.
18. Schmid-Hempel P. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc Biol Sci.*, 2003, Vol. 270, no. 1513, pp. 357-366.
19. Schmid-Hempel P., Ebert D. On the evolutionary ecology of specific immune defence. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 2003, Vol. 18, no. 1, pp. 27-32.
20. Smirina E.M. Age determination and longevity in amphibians. *Gerontology*, 1994, Vol. 40, no. 2-4, pp. 133-146.
21. Smirina E.M., Tselariy Yu. Aging, longevity, and growth of the desert monitor (*Varanus griseus*). *Rus. J. Herpetology*, 1996, Vol. 3, no. 2, pp. 130-142.
22. van Niekerk G., Davis T., Engelbrecht A.M. Was the evolutionary road towards adaptive immunity paved with endothelium? *Biol Direct.*, 2015, Vol. 4, no. 10, p. 47.

Авторы:

Юрчинский В.Я. — к.б.н., доцент кафедры биологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный университет», г. Смоленск, Россия

Морева Л.А. — студентка четвертого курса естественно-географического факультета ФГБОУ ВО «Смоленский государственный университет», г. Смоленск, Россия

Authors:

Yurchinsky V. Ya., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Biology, Smolensk State University, Smolensk, Russian Federation

Moreva L. A., Student, Faculty of Natural Geography, Smolensk State University, Smolensk, Russian Federation

Поступила 30.03.2017

Принята к печати 02.05.2017

Received 30.03.2017

Accepted 02.05.2017

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВИРУСА ГРИППА А(Н1N1)pdm09 С МОНОЦИТАРНЫМИ МАКРОФАГАМИ *IN VITRO*: ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ГЕНОВ TLR7 И RIG1 РЕЦЕПТОРОВ

**Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Руднева И.А.,
Тимофеева Т.А.**

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Дифференцировка моноцитов крови доноров в макрофаги (Мф) под действием GM-CSF сопровождается значительным увеличением уровней транскрипции генов сигнальных рецепторов TLR7 или RIG1. В динамике инфекции Мф вирусом гриппа А H1N1pdm (Москва, 2009) уровни внутриклеточных вирусных РНК (ген M1) сохраняются на высоком уровне. Вызываемые вирусом гриппа А реакции генов рецепторов врожденного иммунитета имеют индивидуальный характер: в Мф донора 1 с исходно высокими уровнями эндосомального гена TLR7 активность снижается, а в Мф донора 2 с исходно низкими уровнями активность гена TLR7 возрастает. Вирус H1N1pdm слабо стимулирует экспрессию гена RIG1 и продукцию воспалительных цитокинов в Мф донора 1. Различия могут быть связаны с индивидуальной чувствительностью 2-х доноров к гриппозной инфекции.

Ключевые слова: вирус гриппа А (H1N1)pdm09, моноцитарные макрофаги, экспрессия генов TLR7, RIG1 рецепторы

***IN VITRO* INTERACTION OF INFLUENZA VIRUS A(H1N1)pdm09 WITH MONOCYTIC MACROPHAGES: INDIVIDUAL RESPONSES OF TLR7 AND RIG1 RECEPTOR GENES**

**Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A.,
Timofeeva T.A.**

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

Abstract. *In vitro* differentiation of donor blood monocytes to macrophages (Mph) following GM-CSF treatment was accompanied by a significant increase in the levels of gene transcription signaling receptors TLR7 or RIG1. The levels of intracellular viral RNA (M1 gene) in Mph remained high upon infection by influenza virus A H1N1pdm (Moscow 2009) for 24–96 hours. The innate immunity reactions caused by influenza virus show individual features: they are decreased in Mph from donor 1 which had initially high level of endosomal TLR7 gene activity, and it increased by influenza virus in MPh from donor 2 who had a very low level of TLR7 gene expression. The influenza H1N1pdm virus weakly stimulated expression of gene RIG1 and production of inflammatory cytokines in Mf in donor 1. The differences may be connected with individual sensitivity of the donors to influenza infection.

Keywords: influenza virus A (H1N1)pdm09, monocytic macrophages, gene expression TLR7, RIG1 receptors

Адрес для переписки:

Соколова Татьяна Михайловна
ФГБУ «Национальный исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика
Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.
Тел.: 8 (499) 190-30-49.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Address for correspondence:

Sokolova Tatiana M.
N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and
Microbiology
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18.
Phone: 7 (499) 190-30-49.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Образец цитирования:

Т.М. Соколова, В.В. Полосков, А.Н. Шувалов,
И.А. Руднева, Т.А. Тимофеева «Взаимодействие вируса
гриппа А(H1N1)pdm09 с моноцитарными макрофагами
in vitro: индивидуальные реакции генов TLR7 и RIG1
рецепторов» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19,
№ 6. С. 721–730.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-721-730

© Соколова Т.М. и соавт., 2017

For citation:

T.M. Sokolova, V.V. Poloskov, A.N. Shuvalov, I.A. Rudneva,
T.A. Timofeeva “In vitro interaction of influenza virus A
(H1N1) pdm09 with monocytic macrophages: individual
responses of TLR7 and RIG1 receptor genes”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017,
Vol. 19, no. 6, pp. 721–730.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-721-730

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-721-730

Введение

Вирус гриппа А (H1N1)pdm09, вызвавший пандемию 2009 г., возник в результате реассортации двух свиных генотипов вируса гриппа А(H1N1) на территории Мексики и быстро распространился в человеческую популяцию [1, 3, 17]. Макрофаги (Мф) являются важнейшими составляющими врожденной иммунной системы [16]. Благодаря Мф в организме поддерживается тканевой гомеостаз и баланс взаимодействия с клетками микроокружения. Популяции Мф, образованные из дифференцированных моноцитов, гетерогенны по составу и являются долгоживущими клетками.

На Мф представлены рецепторы PRRs (pattern-recognition receptors), узнающие вирусные структуры. Защитные реакции Мф во многом зависят от способности этих рецепторов распознавать вирусные структуры и инициировать внутриклеточные сигнальные процессы индукции синтеза воспалительных цитокинов и интерферонов типа 1 [25].

Вирусы гриппа А на ранних стадиях инфекции стимулируют реакции TLR/RLR-врожденного и адаптивного иммунитета [19, 21]. На клеточной мембране рецептор TLR4 и С-тип лектиновых рецепторов (MMR-манозный и MGL-галактозный) взаимодействуют с гликопротеинами оболочки — гемагглютинином (ГА) и нейраминидазой (НА) [22]. Внутри клеток эндосомальные рецепторы TLR3, TLR7, TLR10 и цитоплазматический RIG1 реагируют на вирусные РНК и РНП [18, 29, 32].

Исследования на нескольких моделях Мф показывают, что результат взаимодействия с вирусами гриппа А зависит от многих факторов. Имеет значение источник получения и способ активации Мф, достигаемый Мф уровень дифференцировки. Со стороны вируса влияют особенности углеводной структуры гликопротеинов вирусной оболочки, прежде всего ГА и НА, и степень патогенности штаммов и изолятов вирусов гриппа А [14, 27]. На поверхности Мф присутствуют α -2,3- и α -2,6-связанные сиаловые кислоты, с которыми взаимодействуют ГА вирусов гриппа [31].

С пандемическим свиным H1N1, высокопатогенным птичьим H5N1 и сезонными вирусами гриппа А H1N1и H3N2 на моделях Мф проведен ряд исследований [13, 27, 28, 30]. Альвеолярные Мф играют центральную роль в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета при респираторных инфекциях. В большинстве экспериментов А-Мф оказались резистентными к вирусам H1N1, но чувствительными к птичьим вирусам H5N1. Для получения А-Мф *in vitro* используется классический способ дифференцировки моноцитов периферической крови добавлением

GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный-колониестимулирующий фактор) на 7-14 дней, имитируя условия образования А-Мф с фенотипом M1 в легких человека [9, 15].

В настоящей работе для выяснения влияния пандемического вируса H1N1 на систему рецепторов врожденного иммунитета Мф мы применили GM-CSF-способ. В GM-Мф оценили экспрессию 2-х генов сигнальных рецепторов TLR7 и RIG1 и фермента гликолиза GAPDH. Активность рецепторных генов сопоставили с уровнями вирусной РНК в GM-Мф и секрецией группы воспалительных цитокинов (IFN α , IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-10). Эксперименты проводили в динамике вирусной инфекции, моделируя длительный контакт моноцитарных GM-Мф с вирусом гриппа АH1N1pdm. Известно, что TLRs являются IFN-стимулированными генами в клетках крови человека, и, по нашим данным, вирус гриппа А (H1N1)pdm09 чувствителен к рекомбинантному альфа2-IFN [6].

Материалы и методы

Вирус гриппа А/HIV-Moscow/01/09 (H1N1)sw1 [2, Патент RU № 2412244] получен из лаборатории физиологии вирусов Подразделения «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Вирус размножен в 10-дневных куриных эмбрионах и ранее исследован на антигенную и рецепторную специфичность гемагглютинина [8]. Приготовленные образцы аллантоисных вирусов с титром 64-128 ГА/мл и ЭИД₅₀ = 7,2 хранили при -80 °С в аликвотах по 0,5 мл. ГА активность вирусов определяли микрометодом в реакции с 1% куриными эритроцитами, приготовленными на физиологическом растворе NaCl с рН 7,2.

Моноцитарные макрофаги получали из 20 мл периферической крови 2-х доноров (мужчины 25 и 27 лет). В градиенте фикола выделяли фракцию лимфоцитов, которую отмывали, разводили в питательной среде RPMI-1640 с глутамином и 10% эмбриональной сывороткой телят до концентрации 4×10^6 кл/мл и разливали в пластиковые матрацы 25 см². Прикрепленные к пластику моноциты культивировали в питательной среде с человеческим рекомбинантным GM-CSF 40 нг/мл (SRP 3050 Sigma-Aldrich) в течение 7 дней при 37 °С. Микроскопическое исследование GM-Мф проводили в инвертированном световом микроскопе DMIL (Leica Microsystems, Германия) при увеличении в 200 раз (рис. 1).

Заражение GM-Мф вирусом гриппа А (H1N1)pdm09. Аллантоисный вирус 64-128 ГА ед/мл разводили в 10 раз питательной средой RPMI-1640 добавляли в количестве 1 мл к монослойным культурам Мф для адсорбции вируса на 1 ч при

37 °С. Контрольные клетки (моноциты без GM-CSF и моноциты с GM-CSF) не заражали вирусом. Несвязанный с клетками вирус дважды отмывали и зараженные клетки инкубировали в питательной среде RPMI-1640 без сыворотки. Для получения многоциклового инфицирования зараженные GM-Мф культивировали в присутствии ТРСК-трипсина 1 мкг/мл в течение 24, 48, 72 и 96 ч при 37 °С. В динамике инфекции оценивали развитие цитопатогенного эффекта (ЦПЭ) и собирали пробы культуральной жидкости для определения ГА активности вирусов и секретируемых цитокинов. В клетках тестировали уровни экспрессии клеточных и вирусных РНК. Собранные пробы хранили при -70 °С.

Метод ОТ-ПЦР в реальном времени

Суммарную РНК выделяли из клеток по методике, рекомендованной производителем реагента PureZol (Cat#732-6890 Bio-Rad, США). ДНК удаляли с помощью набора "RNA-free" (Ambion, США). На матрице РНК получали кДНК в реакции обратной транскрипции (ОТ) с random (случайные) праймерами. Использовали фермент MMuLV и 5 × буфер ОТ, ингибитор RNAsin и 4 вида dNTP (Promega, USA).

С полученной кДНК, разведенной в 3 и 6 раз, парами специфических олигонуклеотидных праймеров ставили ПЦР, добавляя 2-кратную смесь SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США).

ПЦР проводили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) в режиме реального времени. Протокол ПЦР: 96 °С 2 мин, далее 55 циклов 94 °С 10 с, 50-54 °С 20 с, 72 °С 30 с. Пороговые циклы (Cq) регистрировали в логарифмической фазе нарастания сигнала флуоресценции красителя EvaGreen. Относительная оценка кратности экспрессии генов (дельтаCq) сделана в программе CFX Manager "Gene expression analysis" в автоматическом режиме с оценкой средних стандартных ошибок в повторных образцах. Показатели контролей принимали равными 1. Относительные уровни экспрессии генов нормализовали на ген «домашнего хозяйства» GAPDH, используя 2delta-СТ метод. В конечной точке ПЦР по температурным пикам плавления устанавливали специфичность ДНК-амплификатов. ДНК-амплификаты анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием.

ПЦР-праймеры

Праймеры к консервативному 7 сегменту РНК (ген М1) вирусов гриппа описаны в литературе [12]. Их нуклеотидная последовательность F5-cttctaaccgaggtcgaaacsg и R5'-agggcattttggacaaagcgctcta является гомологичной участку гена М1вируса гриппа А/Moscow/ПВ01/2009 (H1N1) (Генбанк NCBI accession GQ219584.1 L'vov D.K., Prilipov A.G., Sadykova G.K., Usachev E.V.). На ма-

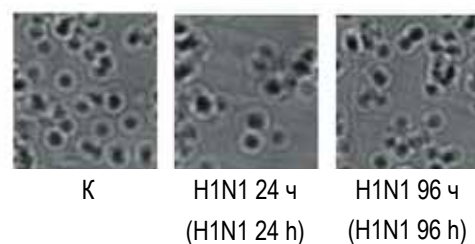


Рисунок 1. Моноциты крови, культивированные с GM-CSF в течение 7 дней

Примечание. Клетки, зараженные вирусом гриппа А H1N1pdm09, через 24 ч и 96 ч.

К – незараженные моноцитарные макрофаги. Увеличение 200×.

Figure 1. Blood monocytes cultured with GM-CSF for 7 days

Note. Cells infected with influenza virus H1N1pdm09 for 24 h or 96 h.

K, non-infected monocytic macrophages. 200× magnification.

трице вирусной мРНК специфический ДНК-продукт имеет размер 245 н.п. [6].

ПЦР-праймеры к клеточным мРНК TLR7, RIG1 и GAPDH опубликованы ранее [4, 5, 7, 20]. Синтез праймеров выполнен фирмой «Синтол» (Россия).

Иммуноферментный анализ

Секретируемые клетками цитокины IL-1β, TNFα, IL-10, IFNα и IFNγ тестированы с помощью ИФА-наборов фирмы «Вектор-Бест» (Россия) согласно прилагаемой инструкции. Измерение оптической плотности и расчет средних концентраций повторных образцов в пг/мл выполнен на Микропланшетном фотометре модель «Anthos 2010» в программе ADAP+ (Биохим-Мак, Россия).

Статистическая обработка

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

Результаты

Дифференцировка моноцитов периферической крови доноров в макрофаги

Культивирование моноцитов крови доноров с GM-CSF воспроизводит условия образования альвеолярных макрофагов в легких человека [9]. Согласно стандартной методике, из периферической крови доноров выделена фракция очищенных лимфоцитов и получены прикрепившиеся к пластику моноциты. К ним добавлена питательная среда RPMI-1640, содержащая 40 нг/мл GM-CSF, на 7 дней. Не обнаружено существенных изменений в морфологии моноцитов 2-х доноров,

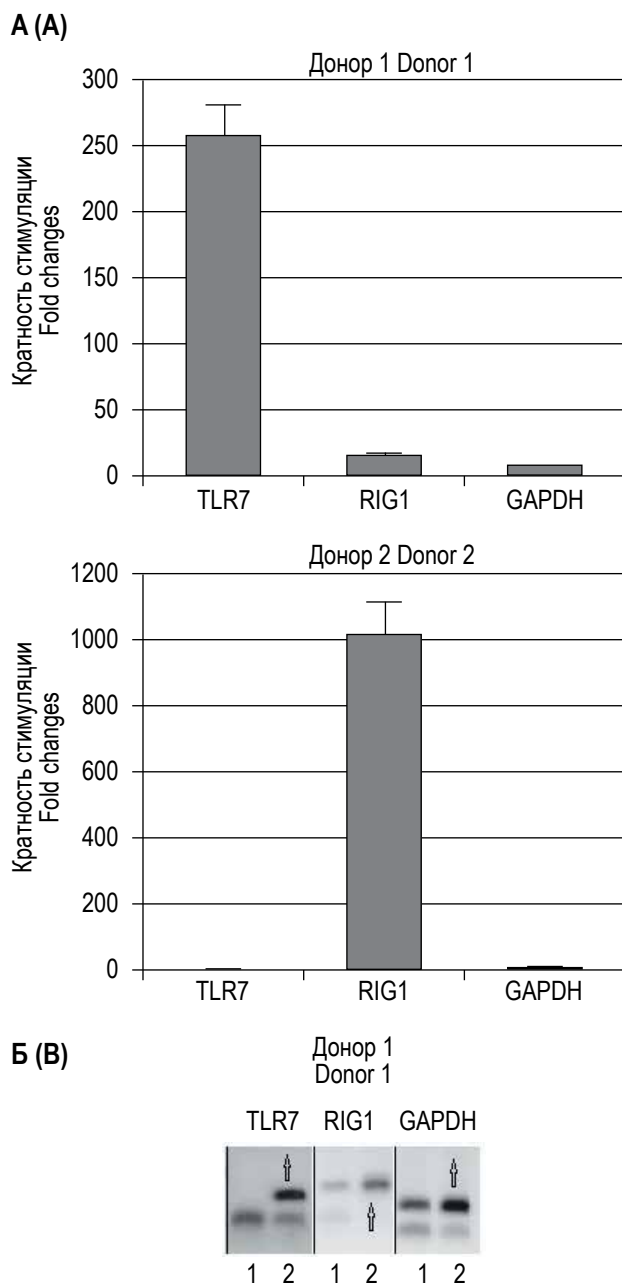


Рисунок 2. Действие GM-CSF на экспрессию генов TLR7, RIG1 и GAPDH в моноцитах крови

Примечание. (А) Моноциты культивировали с GM-CSF 40 нг/мл 7 дней. Кратность стимуляции относительно контроля клеток = 1.

(Б) Электрофорез ПЦР-продуктов в 1,5% агарозном геле. 1 – моноциты крови, 2 – моноциты крови + GM-CSF (донор 1). Стрелки показывают ПЦР-продукты TLR7 150 н.п., RIG1 163 н.п. и GAPDH 127 н.п.

Figure 2. Effect of GM-CSF on expression of TLR7, RIG1 and GAPDH genes in blood monocytes

Note. (A) Monocytes cultured with GM-CSF (40 ng/ml) for 7 days. Fold changes compared to control cell values taken as 1.

(B) Electrophoretic patterns of PCR-products in 1.5% agarose gel. 1, blood monocytes; 2, blood monocytes + GM-CSF (donor 1). Arrows show specific PCR-products (TLR7, 150 bp; RIG1, 163 bp, and GAPDH, 127 bp.)

культивированных с GM-CSF 40 нг/мл и зараженных вирусом гриппа А (H1N1)pdm через 24 и 96 ч (рис. 1). Представленные на рисунке 1 GM-Мф имеют характерную округлую форму. Цитопатогенное действие вируса (ЦПД) H1N1pdm09 в GM-Мф, как видно из рисунка 1, не развивалось. ГА-активность вируса H1N1 в культуральной жидкости не была выявлена на всех сроках гриппозной инфекции (данные не приводятся). Полученный результат подтверждает резистентность альвеолярных макрофагов с фенотипом M1 к пандемическому и сезонным вирусам гриппа А H1N1 [27].

Влияние GM-CSF на экспрессию генов сигнальных иммунных рецепторов TLR7 и RIG1 в моноцитах

GM-CSF является членом семейства цитокинов, которые регулируют рост, дифференциацию, миграцию и эффекторные функции гемопоэтических клеток и иммунцитов [10].

Сравнили действие GM-CSF на уровни экспрессии клеточных генов TLR7, RIG1 и GAPDH в контрольных моноцитах (рис. 2А, Б). Моноциты 2-х доноров имеют низкие конститутивные уровни транскрипции генов TLR7 и RIG1 (Cq43-44). Транскрипционная активность гена фермента GAPDH довольно высокая (Cq29-31), что характерно для гена «домашнего хозяйства». Этот ген часто используется в качестве показателя клеточного метаболизма и референс-нормализатора генной экспрессии.

Реакции рецепторных генов на гемопоэтический фактор имеют у 2-х доноров индивидуальный характер.

В моноцитах донора 1 под действием GM-CSF активность TLR7 возрастает в 256 раз, а в моноцитах донора 2 активность гена TLR7 остается на первоначальном низком уровне. В моноцитах донора 2, с очень низким конститутивным уровнем экспрессии гена RIG1, фактор GM-CSF стимулирует транскрипцию гена RIG1 в 1024 раза, а в моноцитах донора 1 только в 16 раз. Гемопоэтический фактор GM-CSF повышает экспрессию гена «домашнего хозяйства» GAPDH в 8 раз, по-видимому, стимулируя пролиферацию клеток.

Присутствие РНК вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 в GM-макрофагах

Уровни внутриклеточной мРНК вируса гриппа А (H1N1)pdm09 определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени, используя праймеры к консервативному гену M1 [12].

На рисунке 3 (А) показаны кривые накопления вирусного генетического материала в GM-Мф 2-х доноров в динамике инфекции. В контролях незараженных клеток (К) вирусный материал отсутствует.

В динамике инфекции (24-96 ч) уровни внутриклеточной вирусной РНК M1 поддерживаются на высоком уровне (Cq26-29). Нормализация

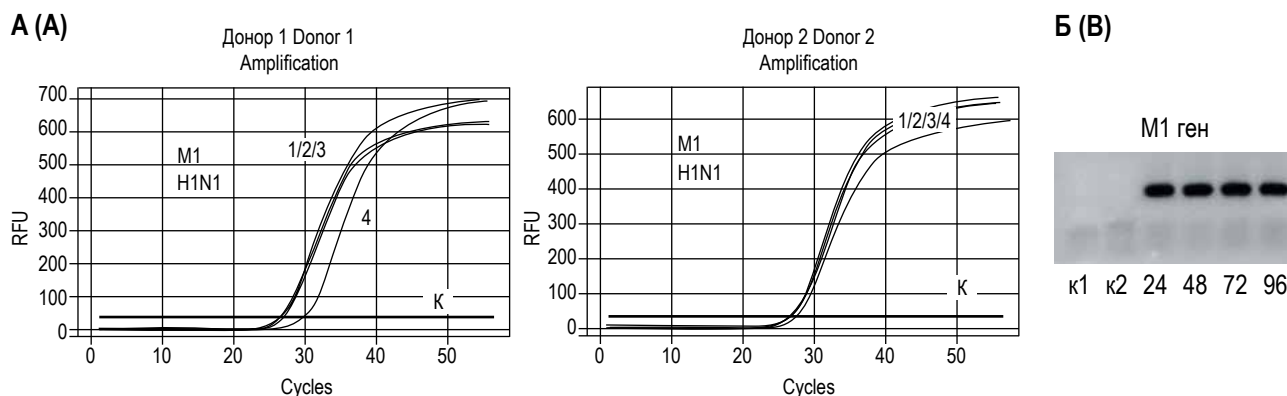


Рисунок 3. Уровни РНК М1 вируса гриппа А (H1N1)pdm09 в GM-макрофагах

Примечание. (А) накопление специфических ДНК-амплификатов гена М1 вируса гриппа. По оси абсцисс Cq – циклы амплификации ОТ-ПЦР в реальном времени, по оси ординат – уровни флюоресценции ПЦР-продуктов.

(Б) электрофорез ПЦР-продуктов гена М1 вируса гриппа А в 1,5% агарозном геле (донор 1). Специфический ДНК-продукт 245 н.п. К – контроль клеток.

Figure 3. Levels of RNA M1 influenza virus A (H1N1)pdm09 in GM-macrophages

Note. (A) Accumulation of specific DNA amplicons of M1 gene of influenza virus. Abscissa, number of cycles in real-time (RT-) PCR; ordinate, levels of fluorescent PCR-products. Numbers 1 to 4 correspond to 24, 48, 72, 96 h after virus infection; K, control cells.

(B) electrophoretic patterns of PCR-products of M1 influenza virus gene separated in 1,5% agarose gel (donor 1). Specific DNA-product 245 bp. K- control cells.

уровней вирусной РНК (2deltaCq) на референс-ген GAPDH подтверждает сделанный вывод. Поэтому есть основания считать, что GM-Мф становятся надежным депо вирусных РНК структур.

Действие вируса гриппа А (H1N1)pdm09 на экспрессию генов сигнальных иммунных рецепторов и гена GAPDH в GM-макрофагах

В GM-Мф, зараженных вирусом гриппа А (H1N1)pdm09, исследовали уровни экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета: эндосомального TLR7 и цитоплазматического RIG1 (рис. 4А, Б, В, Г). Оба вида рецепторов участвуют в узнавании РНК и РНП вируса гриппа А и индуцируют сигнальные реакции противовирусного ответа [18, 21, 32].

Параллельно в динамике гриппозной инфекции у 2-х доноров оценивали активность гена фермента GAPDH (рис. 4Д, Е). Активность клеточного гена GAPDH незначительно меняется в динамике инфекции и это согласуется с данными об отсутствии выраженного ЦПД вируса гриппа pdmH1N1 в GM-Мф с 24 до 96 ч (см. рис. 1). Изменения генной активности рецепторов TLR7, RIG1 и фермента GAPDH у 2-х доноров имеют индивидуальный характер.

У донора 1 на всех сроках гриппозной инфекции уровни экспрессии 3-х исследованных генов в GM-Мф были ниже контрольных (рис. 4А, Б, В). В динамике инфекции сила ингибирующего эффекта вируса на гены иммунных рецепторов у донора 1 варьирует (рис. 4А, Б). В GM-Мф донора 2 действие вируса гриппа А H1N1pdm на экспрессию генов иммунных рецепторов отличается от донора 1. В исследованные сроки вирус стимулирует низкую транскрипционную активность

гена TLR7 относительно контроля. Уровни экспрессии гена RIG1 в GM-Мф донора 2 не меняются в динамике инфекции, оставаясь на уровне контроля (рис. 4Д). Вирус гриппа А pdmH1N1 в GM-Мф 2-х доноров незначительно снижает экспрессию гена митохондриального фермента GAPDH в динамике инфекции, оставаясь на достаточно высоких уровнях (рис. 4В, Е).

В таблице 1 приведены уровни относительной экспрессии генов TLR7 и RIG1 в Мф 2-х доноров, нормализованные на референс-ген GAPDH (2дельтаCq). Из данных следует, что вызываемые вирусом H1N1pdm09 изменения генной активности рецепторов врожденного иммунитета носят в Мф доноров индивидуальный характер. Так, в Мф донора 1, с высоким исходным уровнем активности рецепторного гена TLR7 (Cq35), пандемический вирус гриппа А подавляет генную экспрессию, а в Мф донора 2, с низким базовым уровнем гена TLR7 (Cq44), наоборот, стимулирует активность. Имеются отличия и в реакции гена RIG1 на вирус H1N1pdm в Мф 2-х доноров. Известно, что активность рецепторных генов TLR7 и RIG1 является причиной разной восприимчивости человека к гриппозной инфекции [21].

Продукция цитокинов GM-макрофагами, зараженными вирусом гриппа А H1N1pdm09

По данным литературы, пандемический вирус гриппа А H1N1 – слабый индуктор воспалительного ответа в Мф, по сравнению с птичьими вирусами [6, 7, 24]. В наших опытах также наблюдалась очень низкая продукция цитокинов контрольными моноцитами и зараженными макрофагами донора 1 (табл. 2). Небольшие количества IFNα2 выявлены только через 72 ч

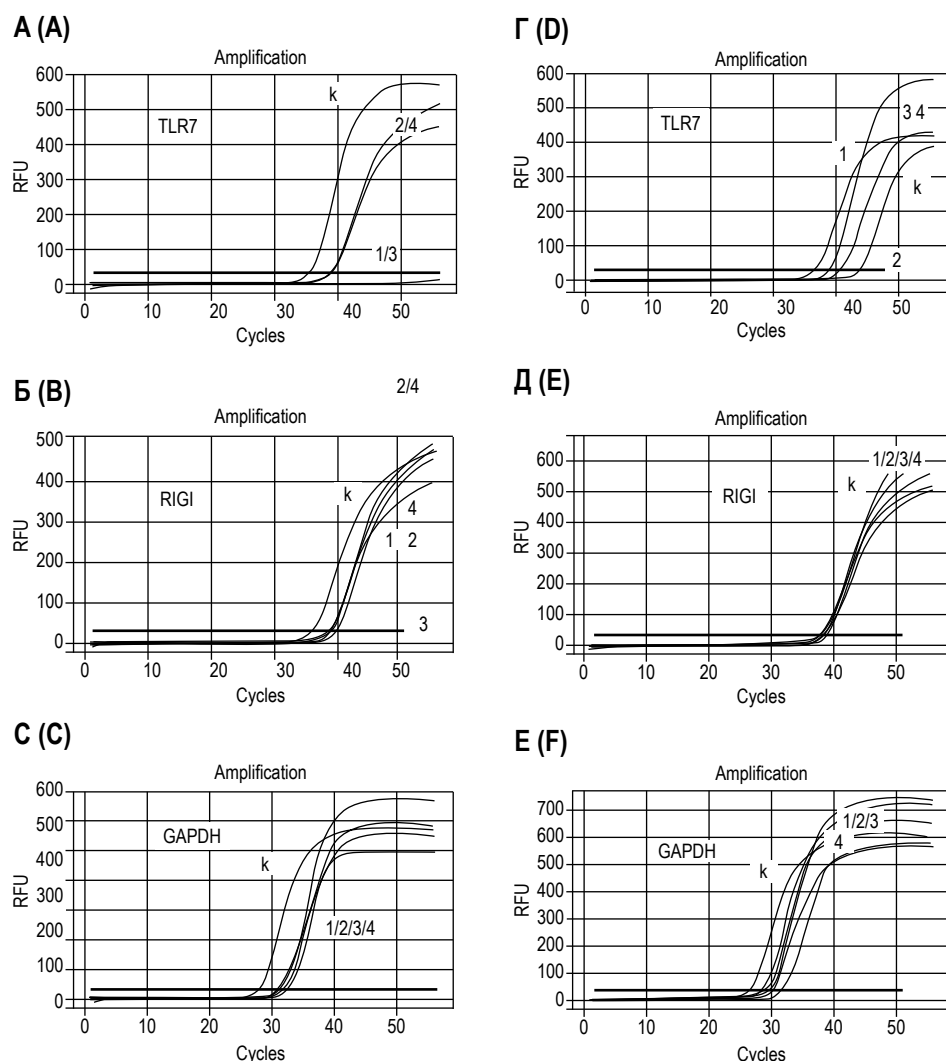


Рисунок 4. Действие вируса гриппа А (H1N1)pdm09 на экспрессию генов сигнальных иммунных рецепторов TLR7 и RIG1 и фермента GAPDH в GM-макрофагах донора 1 (А, Б, В) и донора 2 (Г, Д, Е)

Примечание. По оси абсцисс Cq – циклы амплификации ОТ-ПЦР в реальном времени, по оси ординат – уровни флюоресценции ПЦР-продуктов. Номера 1,2,3,4 (24, 48, 72, 96 часы после заражения вирусом). К – контроль клеток.

Figure 4. Effect of influenza virus A (H1N1)pdm09 upon expression of signal immune receptors TLR7 and RIG1 genes, and reference GAPDH enzyme in GM-induced macrophages from donor 1 (A, B, C) and donor 2 (D, E, F)

Note. Abscissa, number of PCR cycles in real time RT; ordinate, levels of fluorescent PCR products. Numbers 1 to 4 correspond to 24, 48, 72, 96 h after virus infection; K, control cells.

инфекции. Секретция других видов воспалительных цитокинов была на уровне чувствительности ИФА-тест систем (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). По данным ряда исследователей и представленных нами, это связано с отсутствием продуктивной инфекции в GM-Мф, зараженных пандемическим вирусом H1N1 [28].

Обсуждение

Анализ взаимодействия структур вируса гриппа А с иммунокомпетентными клетками дает понимание их ключевой роли в развитии инфекционного процесса [25]. Известно, что вирус гриппа А активно взаимодействует с клеточными струк-

турами на этапах проникновения и синтеза вирусных компонентов. Вирусы гриппа проникают в клетки рецепторным эндоцитозом. В этом процессе участвуют белки оболочки гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА), являющиеся главными вирусными антигенами.

В экспериментальных исследованиях с разными подтипами вирусов гриппа А на нескольких моделях Мф, отличающихся способами дифференциации, получены неоднозначные результаты [28]. В чувствительных эпителиальных клетках вирусы гриппа А вызывают высокопродуктивную инфекцию с освобождением инфекционного вируса. В клетках иммунной системы, макрофагах

ТАБЛИЦА 1. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ГЕНОВ TLR7 И RIG1 МАКРОФАГОВ В ДИНАМИКЕ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ГРИППА А(H1N1)pdm09

TABLE 1. INDIVIDUAL REACTION OF TLR7 AND RIG1 GENES IN MACROPHAGES UPON INFECTION WITH INFLUENZA A VIRUS H1N1pdm09

Гены/мРНК Genes/ mRNA	Контроль Control	H1N1 24 ч H1N1 24 h	H1N1 48 ч H1N1 48 h	H1N1 72 ч H1N1 72 h	Эффект Effect
	Cq* /2dCq**	Cq*/2dCq**	Cq*/dCq**	Cq*/2dCq**	
TLR7 донор 1 donor 1	35/1	> 45/0	38/0,1	39/0,1	↓
донор 2 donor 2	44/1	36/256	39/32	40/16	↑
RIG1 донор 1 donor 1	37/1	39/0,3	39/0,3	39/0,3	↓
донор 2 donor 2	38/1	37/2	35/8	34/16	↑

Примечание. Cq* – пороговые циклы амплификации ПЦР-продуктов;
2dCq** – относительные уровни нормализованной экспрессии генов.

Note. Cq*, threshold cycle number for amplification of PCR products;
2dCq**, relative levels of normalized gene expression.

ТАБЛИЦА 2. ДЕЙСТВИЕ ВИРУСА ГРИППА А(H1N1)pdm09 НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В GM-МАКРОФАГАХ

TABLE 2. EFFECT OF INFLUENZA A VIRUS (H1N1)pdm09 UPON PRODUCTION OF CYTOKINES IN GM-MACROPHAGES

Цитокины пг/мл* Cytokines pg/ml*	Варианты Variants				
	Контроль моноциты Control monocytes	GM-макрофаги GM-macrophages	H1N1 24 ч 24 h	H1N1 48 ч 48 h	H1N1 72 ч 72 h
IFN γ	2-6	4-4	3-5	4-6	3-6
IFN α	0,7-1	1-1	3-7	1-2	10-12
TNF α	1-1	1-2	1-1	1-1	1-2
IL-1 β	1-4	2-4	1-2	1-2	2-2
IL-10	1-0	0,7-1	0,4-2	2-2	1-2

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

Note. *, ranges for repeated measurements in two separate experiments.

(Мф) и дендритных клетках (Дк) эффективность развития гриппозной инфекции может быть как продуктивной, так и abortивной. Это зависит от субтипа НА, патогенности вируса и уровня клеточной дифференцировки.

В настоящем исследовании гриппозная инфекция была вызвана вирусом H1N1pdm в Мф, полученных культивированием с GM-CSF моноцитов 2-х случайных доноров [9, 15]. Свойства GM-Мф похожи на альвеолярные Мф (А-Мф), которые играют главную роль в респираторных инфекциях. Известно, что GM-Мф, подобно клеткам MDCK, содержат на своей поверхности $\alpha 2,6$ - и $\alpha 2,3$ -сиаловые кислоты, взаимодействующие с ГА человеческих и птичьих вирусов [31]. По-

этому рецепторная специфичность ГА ($\alpha 2,6$ -gal) исследованного штамма вируса H1N1/Moscow/IV01/2009 позволяет ему взаимодействовать с GM-Мф и вызывать индукцию воспалительных сенсоров TLR/RLRs/NLPR3 [27, 28].

Инфекция вирусом H1N1pdm развивалась GM-Мф по abortивному типу без клеточной деструкции и секреции гемагглютининов. В зараженных GM-Мф длительно присутствовали вирусные РНК – агонисты эндоплазматического TLR7 и цитоплазматического RIG1 рецепторов [18, 32]. От активности этих рецепторов во многом зависят антивирусные функции Мф и степень воспалительного ответа [25]. По-видимому, баланс между этими функциями Мф существенен

для патогенеза. Пока остается неясным, является ли длительное присутствие РНК-лигандов в макрофагах защитной клеточной реакцией (абортная инфекция) или, наоборот, абортная инфекция — результат антагонизма пандемического вируса гриппа А с TLR/RLR/NLRP3 сигнальными путями и процессами апоптоза [23].

Функциональная гетерогенность Мф, получаемых с помощью разных стимулирующих факторов, во многом определяет их свойства [15].

По данным литературы, GM-Мф относятся к воспалительному фенотипу М1 и отличаются от макрофагов, полученных с M-CSF (макрофаг-колониестимулирующим фактором) с фенотипом М2 [15]. Разные виды моноцитарных Мф отличаются по морфологии и спектрам экспрессируемых генов. Реакции TLR/RLR-генов в дифференцированных типах Мф остаются малоизученными. В тучных клетках GM-CSF стимулировал активность генов TLR3 и TLR7 с участием сигнальных протеинкиназ MAPK и PI3K/Akt [33]. Напротив, в человеческих моноцитах GM-CSF снижал экспрессию генов других видов TLR1, TLR2 и TLR4 и транскрипционного фактора Мф PU.1 [26].

В работе получена новая информация о влиянии GM-CSF на гены TLR/RLR-рецепторов в GM-Мф. По нашим данным, дифференцировка моноцитов в Мф под действием GM-CSF сопровождается увеличением транскрипционной активности генов рецепторов врожденного иммунитета TLR7 или RIG1, а также фермента клеточного метаболизма GAPDH. Выбор стимули-

руемого GM-CSF рецепторного гена может быть индивидуален. Различная индивидуальная чувствительность клеток крови доноров к вирусам гриппа А и препаратам интерферонов отмечается в ряде сообщений [4, 5, 6, 19].

По данным литературы, в моноцитах крови больных гриппом А наблюдается повышение уровней экспрессии рецепторов TLR3 и TLR7 и подавление экспрессии рецепторов TLR2 и TLR4 [19]. Видимо, стимуляция рецепторов TLR7 и RIG1 — сенсоров вирусных РНК характерна для активно протекающей гриппозной инфекции. Параллельно на фоне вирусной инфекции падает активность TLRs — сенсоров бактериальных патогенов. Необходимо установить корреляцию наблюдаемых *in vitro* индивидуальных реакций рецепторов врожденного иммунитета с состоянием иммунных ответов в организме.

Заключение

Впервые изучено взаимодействие пандемического штамма вируса гриппа А H1N1/Moscow/IV01/2009 с дифференцированным GM-CSF макрофагами. В модельной клеточной системе Мф 2-х доноров охарактеризованы индивидуальные реакции генов рецепторов врожденного иммунитета TLR7 и RIG1 на дифференцирующий фактор и внутриклеточные вирусные РНК в динамике абортной инфекции.

Список литературы / References

1. Киселев О.И. Геном пандемического вируса гриппа A/H1N1v-2009. СПб. – М.: Димитрейд График групп, 2011. [Kiselev O.I. Genome of pandemic influenza A/H1N1v-2009virus]. St. Petersburg – Moscow: Dimitreid Graphic group, 2011.
2. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Базарова М.В., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Малышев Н.А., Дерябин П.Г., Федякина И.Т., Садыкова Г.К., Усачев Е.В., Щелканов М.Ю., Шевченко Е.С., Трушакова С.В., Иванова В.Т., Белякова Н.В., Осерко Т.А., Алипер Т.И. Изоляция 24.05.09 и депонирование в государственную коллекцию вирусов (ГКВ 2452 от 24.05.09) первого штамма A/IV-Moscow/01/09 (H1N1) sw1, подобного свиному вирусу A(H1N1) от первого выявленного 24.05.09 больного в Москве // Вопросы вирусологии, 2009. Т. 54, № 5. С.10-14. [Lvov D.K., Burtseva E.I., Prilipov A.G., Bazarova M.V., Kolobukhina L.V., Malyshev N.A. et al. The 24 May, 2009 isolation of the first A/IV-Moscow/01/2009(H1N1)sw1 strain similar to swine A(H1N1) influenza virus from the first Moscow case detected on May 21, 2009, and its deposit in the State Collection of Viruses (SCV No.2452 dated May 24, 2009. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2009, Vol. 54, no. 5, pp. 10-14. (In Russ.)]
3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Колобухина Л.В., Малышев Н.А. и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа A(H1N1)v в России // Вопросы вирусологии, 2010. Т. 55, № 3. С. 4-9. [Lvov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Prilipov A.G., Kolobukhina L.V., Malyshev N.A. et al. Spread of new pandemic influenza A (H1N1)v virus in Russia. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2010, Vol. 55, no. 3, pp. 4-9. (In Russ.)]
4. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Шаповал И.М., Соколова З.А., Ершов Ф.И. Активация генов сигнальных путей иммунитета: различная индивидуальная чувствительность клеток крови человека к препаратам интерферонов и индукторов IFN // Медицинская иммунология, 2015. № 1. С. 7-18. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Shapoval I.M., Sokolova Z.A., Ershov F.I. Activation of genes controlling the immune signaling pathways: differential individual sensitivity of human blood cells for interferon preparations and IFN inducers. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-7-18.
5. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Ершов Ф.И. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами «Ридостин», «Циклоферон» и «Ингавирин» // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 2.

C. 26-34. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Ershov F.I. Stimulation of signaling transduction gene expression with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, no. 2, pp. 26-34. (In Russ.)]

6. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В. Действие рекомбинантного альфа-2 интерферона на вирус гриппа H1N1 (Москва 2009): активность генов врожденного и адаптивного иммунитета и воспалительных цитокинов // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ) 2015. № 17, Ч. 2. С. 49-52. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V. Action of recombinant alpha-2 interferon the influenza virus H1N1 (Moscow 2009): activity of genes innate and adaptive immunity and inflammatory cytokines. *Evrasiyskiy Soyuz Uchenykh (ESU) = Eurasian Union of Scientists (EUS)*, 2015, no. 17, Pt 2, pp. 49-52. (In Russ.)]

7. Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Руднева И.А., Ершов Ф.И. Рекомбинантный птичий вирус гриппа H5N1(A/Vietnam/1203/04) и его «эскейп» мутант m13(13) индуцируют в лимфоцитах человека ранние сигнальные реакции иммунитета // Вопросы вирусологии, 2016. Т. 61, № 1. С. 22-26. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A., Ershov F.I. Avian recombinant virus H5N1 influenza A/Vietnam/1203/04 and its "escape" mutant m13(13) induce early signaling reactions of immunity in human lymphocytes. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2016, Vol. 61, no. 1, pp. 22-26. (In Russ.)]

8. Тимофеева Т.А., Игнатьева А.В., Руднева И.А., Мочалова Л.В., Бовин И.В., Каверин Р.В. Влияние мутаций, меняющих антигенную специфичность, на рецептор связывающую активность гемагглютинаина вирусов гриппа А подтипов H1 и H5 // Вопросы вирусологии, 2013. Т. 58, № 1. С. 24-27. [Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Rudneva I.A., Mochlova L.V., Bovin N.V., Kaverin N.V. Effect of mutations changing the antigenic specificity on the receptor-binding activity of the influenza virus hemagglutinin of H1 and H5. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, Vol. 58, no. 1, pp. 24-27. (In Russ.)]

9. Akagawa K.S., Komuro I., Kanazawa H., Yamazaki T., Mochida K., Kishi F. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology*, Vol. 2006, no. 11, S32-S36.

10. Broughton S.E., Dhagat U., Hercus T.R., Nero T.L., Grimaldeston M.A., Bonder C.S., Lopez A.F., Parker M.W. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunological Reviews*, 2012, Vol. 250, pp. 277-202.

11. Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K.B., Dockrell D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE*, 2010, Vol. 9, no.1, e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668.

12. Fouchier R.A.M., Bestebroer T.M., Herst S., van der Kemp L., Rimmerlzwaaan G.F., Osterhaus A.D.M.E. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clinical Microbiology*, 2000, Vol. 38, no. 11, pp. 4096-4101.

13. Geiler J., Michaelis M., Sthisarn P., Cinatl Jr. Comparison of pro-inflammatory cytokine expression and cellular signal transduction in human macrophages infected with different influenza A viruses. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2011, Vol. 200, pp. 53-60.

14. Hoeve M.A., Nash A.A., Jackson D., Randall R.E., Dransfield I. Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 1, e29443. doi: 10.1371/journal.pone.0029443

15. Janguin M., Houlbert N., Fardel O., Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol.*, 2013, Vol. 281, pp. 51-61.

16. Juhas U., Ryba-Stanislawowska M., Szargiej P., Mysliwska J. Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postery Hig Med Dosw. (online)*, 2015, Vol. 69, pp. 496-502.

17. Khan K., Arino J., Hu W., Raposo P., Sears J., Calderon F., Heidebrecht C., Macdonald M., Liauw J., Chan A., Gardam M. Spread of a novel influenza A (H1N1) virus via global airline transportation. *N. Engl. J. Med.*, 2009, Vol. 361, no. 2, pp. 212-214.

18. Koyama S., Ishii K.J., Kumar H., Tanimoto T., Coban C., Uematsu S., Kawai T., Akira S. Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 7, pp. 4711-4720.

19. Lee N., Wong C.K., Hui D.S., Lee S.K., Wong R.Y., Ngai K.L., Chan M.C., Chu Y.J., Ho A.W., Lui G.C., Wong B.C., Wong S.H., Yip S.P., Chan P.K. Role of human Toll-like receptors in naturally occurring influenza A infections. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2013, Vol. 7, no. 5, pp. 666-675.

20. Li J. Hu S., Zhou L., Ye L., Wang X., Ho J., Ho W. Interferon lambda inhibits herpes simplex virus type 1 infection of human astrocytes and neurons. *Glia*, 2011, Vol. 59, no. 1, pp. 58-67.

21. Liu Y., Chen H., Sun Y., Chen F. Antiviral role of Toll-like receptors and cytokines against the new 2009 H1N1 virus infection. *Mol. Biol. Rep.*, 2012, Vol. 39, no. 2, pp. 1162-1172.

22. Londrigan S.L., Tate M.D., Brooks A.G., Reading P.C. Cell – surface receptors on macrophages and dendritic cells for attachment and entry of influenza virus. *J. Leukocyte Biology*, 2012, Vol. 92, pp. 97-106.

23. Loregian A., Mercorelli B., Nannetti G., Compagnin G., Palu G. Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2014, Vol. 71, no. 19, pp. 3659-3683.

24. Osterlund P., Pirhonen J., Ikonen N., Rönkkö E., Strengell M., Mäkelä S.M., Broman M., Hamming O.J., Hartmann R., Ziegler T., Julkunen I. Pandemic H1N1 2009 influenza A virus induces weak cytokine responses in human macrophages and dendritic cells and is highly sensitive to the antiviral actions of interferons. *J. Virology*, 2010, Vol. 84, no. 3, pp. 1414-1422.

25. Pulendran B., Maddur M.S. Innate Immune Sensing and Response to Influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2015, Vol. 386, pp. 23-71.

26. Sadeghi K., Wisgrill L., Wessely I., Diesner S.C., Schuller S., Durr C., Heinle A., Sachet M., Pollak A., Forster-Waldl E., Spittler A. GM-CSF Down-Regulates TLR Expression via the Transcription Factor PU.1 in Human Monocytes. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 10, e0162667. doi: 10.1371/journal.pone.0162667.

27. Sakabe S., Iwatsuki-Horimoto K., Takano R., Nidom C.A., Le M., Nagamura-Inoue T., Horimoto T., Yamashita N., Kawaoka Y. Cytokine production by primary human macrophages infected with highly pathogenic H5N1 or pandemic H1N1 2009 influenza viruses. *J. General Virology*, 2011, Vol. 92, pp. 1428-1434.
28. Short K.R., Brooks A.G., Reading P.C., Londrigan S.L. The fate of influenza A virus infection of human macrophages and dendritic cells. *J. General Virology*, 2012, Vol. 93, pp. 2315-2325.
29. Suki M.Y. Lee, Kokc K.-H., Jaumea M., Cheung T.K.W., Yip T.-F., Laia J.C.C., Guanb Y., Webster R.G. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *PNAS*, 2014, Vol. 111, no. 10, pp. 3793-3798.
30. van Riel D., Leijten L.M., van der Eerden M., Hoogsteden H.C., Boven L.A., Lambrecht B.N., Osterhaus A.D., Kuiken T. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infects alveolar macrophages without virus production or excessive TNF-alpha induction. *PLoS Pathog.*, 2011, Vol. 7, e1002099. doi: 10.1371/journal.ppat.1002099.
31. Viswanathan K., Chandrasekaran A., Srinivasan A., Raman R., Sasisekharan V., Sasisekharan R. Glycans as receptors for influenza pathogenesis. *Glycoconj J.*, 2010, Vol. 27, pp. 561-570.
32. Weber M., Gawanbacht A., Habjan M., Rang A., Borner C., Schmidt A.M., Veitinger S., Jacob R., Devignot S., Kochs G., Garcia-Sastre A., Weber F. Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling. *Cell Host Microbe*, 2013, Vol. 13, pp. 336-346.
33. Yang H., We J., Zhang H., Lin L., Zhang W., He S. Upregulation of Toll-like receptor (TLR) expression and release of cytokines from P815 mast cells by GM-CSF. *BMC Cell Biology*, 2009, Vol. 10, pp. 1-10.

Авторы:

Соколова Т.М. — д.б.н., академик РАН, ведущий научный сотрудник, лаборатория клеточной инженерии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Полосков В.В. — младший научный сотрудник, лаборатория цитокинов, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Шувалов А.Н. — к.м.н., младший научный сотрудник, лаборатория онтогенеза и коррекции системы интерферона, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Руднева И.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория физиологии вирусов, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Тимофеева Т.А. — к.б.н., руководитель лаборатории физиологии вирусов, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Sokolova T.M., PhD, MD (Biology), Full Member, Academy of Natural Sciences, Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Engineering, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

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

Shuvalov A.N., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Laboratory of Ontogenesis and Correction of the Interferon System, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Rudneva I.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Viral Physiology, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Timofeeva T.A., PhD (Biology), Head, Laboratory of Viral Physiology, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 06.03.2017

Отправлена на доработку 14.03.2017

Принята к печати 17.03.2017

Received 06.03.2017

Revision received 14.03.2017

Accepted 17.03.2017

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНУСИТОМ

Савлевич Е.Л.¹, Хайдуков С.В.², Курбачева О.М.³, Бондарева Г.П.³,
Шачнев К.Н.⁴, Симбирцев А.С.^{5, 6}

¹ ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

² ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия

³ ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» ФМБА России, Москва, Россия

⁴ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

⁵ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

⁶ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Хронический полипозный риносинусит (ПРС) — гетерогенное воспалительное заболевание полости носа и околоносовых пазух, характеризующееся воспалительной инфильтрацией слизистой оболочки с дальнейшим повреждением коллагенового каркаса, что приводит к ремоделированию слизистой и образованию полипов. Механизмы его развития до сих пор остаются невыясненными. Для исследования направления патогенетических механизмов проведен анализ показателей клеточного иммунитета у 20 пациентов с ПРС. Наличие двустороннего полипозного риносинусита было подтверждено эндоскопическим исследованием полости носа и данными компьютерной томографии околоносовых пазух. Для определения фенотипа заболевания было проведено аллергологическое обследование и анкетирование пациентов, на основании которых пациенты с ПРС были разделены на подгруппы: ПРС + бронхиальная астма; ПРС + непереносимость НПВП; ПРС + атопия. В качестве показателей контрольной группы были использованы результаты 356 практически здоровых лиц. Методом проточной цитометрии в периферической крови определены CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺, CD25⁺, CD27⁺, CD45⁺, CD45R0⁺, CD45RA⁺, CD56⁺ и CD127⁺ субпопуляции лимфоцитов. У пациентов с ПРС выявлено повышение числа Т-регуляторных (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{low/none}) (Treg) лимфоцитов, повышение абсолютного и относительного количества NK (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) одновременно с резким повышением числа активированных NK (CD8⁺CD3⁺) в 100% случаев, повышение абсолютного числа В-клеток памяти (CD19⁺CD5⁺CD27⁺). При проведении сравнительного анализа иммунологических показателей периферической крови между подгруппами (ПРС + БА; ПРС + непереносимость НПВП; ПРС + атопия) с пациентами ПРС, у которых эта патология отсутствовала, мы констатировали достоверно значимое повышение абсолютного числа NKT-лимфоцитов (0,22±0,04) и снижение показателя активации Т-клеточного звена, Т-хелперы активированные к Т-клеткам па-

Адрес для переписки:

Савлевич Елена Леонидовна
ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации
121359, Россия, Москва, ул. Маршала Тимошенко, 21.
Тел.: 8 (985) 145-27-45.
Факс: 8 (499) 140-20-78.
E-mail: savllena@gmail.com

Address for correspondence:

Savlevich Elena L.
Central State Medical Academy, Department for Presidential Affairs
121359, Russian Federation, Moscow,
Marshala Timoshenko str., 21.
Phone: 7 (985) 145-27-45.
Fax: 7 (499) 140-20-78.
E-mail: savllena@gmail.com

Образец цитирования:

Е.Л. Савлевич, С.В. Хайдуков, О.М. Курбачева, Г.П. Бондарева, К.Н. Шачнев, А.С. Симбирцев
«Показатели клеточного иммунитета пациентов с хроническим полипозным риносинуситом»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 731–738.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-731-738

© Савлевич Е.Л. и соавт., 2017

For citation:

E.L. Savlevich, S.V. Khaidukov, O.M. Kurbacheva, G.P. Bondareva, K.N. Shachnev, A.S. Simbirtsev
“Characteristics of cellular immune status in the patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 731–738. doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-731-738

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-731-738

мяти ($CD4^+CD45R0^+$) ($24,4 \pm 1,72$) у пациентов с ПРС с одновременной непереносимостью НПВП. При сравнении иммунологических показателей группы пациентов с сопутствующей бронхиальной астмой и с остальными больными ПРС и пациентов с атопией и без нее статистически значимой разницы, кроме повышения количества эозинофилов, выявлено не было.

Ключевые слова: полипозный риносинусит, лимфоциты, системный иммунитет, проточная цитометрия, бронхиальная астма, непереносимость НПВП, атопия

CHARACTERISTICS OF CELLULAR IMMUNE STATUS IN THE PATIENTS WITH CHRONIC RHINOSINUSITIS WITH NASAL POLYPS

Savlevich E.L.^a, Khaidukov S.V.^b, Kurbacheva O.M.^c, Bondareva G.P.^c, Shachnev K.N.^d, Simbirtsev A.S.^{e, f}

^a Central State Medical Academy, Department for Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

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

^c National Research Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

^d Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

^e State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency of Russia, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is a heterogeneous inflammatory disease of nasal cavity and paranasal sinuses characterized by inflammatory infiltration of nasal mucosa followed by damage to collagen framework, leading to tissue remodeling and polyp formation. Its pathogenetic mechanisms still remain obscure. To study appropriate trends, an evaluation of cellular immunity indices was carried out in twenty patients with the CRSwNP. Bilateral CRSwNP was clinically confirmed by endoscopic examination of nasal cavity and computed tomography scan of paranasal sinuses. In order to define the clinical phenotype of CRSwNP, allergy skin testing and a specific questioning were performed. As based on results of this study, the patients with CRSwNP were divided into following subgroups: CRSwNP + Asthma; CRSwNP + intolerance to non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs); CRSwNP + atopy. Common subpopulations of lymphocytes, such as $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, $CD19^+$, $CD25^+$, $CD27^+$, $CD45^+$, $CD45R0^+$, $CD45RA^+$, $CD56^+$ and $CD127^+$ were detected in peripheral blood using flow cytometry techniques. Immunological data from 356 apparently healthy individuals were used as reference parameters for the control group.

The study has revealed an increase in T regulatory (Treg) cells ($CD4^+CD25^{bright}CD127^{lowtoneg}$), elevated absolute or relative amounts of NK cell numbers ($CD3-CD16^+CD56^+$) in parallel to sharply increased numbers of activated NKs ($CD8^+CD3^-$) in 100% of the patients, and higher absolute contents of memory B-cells ($CD19^+CD5-CD27^+$) in CRSwNP patients. When performing comparative analysis of immunological characteristics in peripheral blood between different subgroups (CRSwNP + Asthma; CRSwNP + intolerance to NSAIDs; CRSwNP + atopy), and patients with uncomplicated CRSwNP (who didn't have such pathology), we have proven significantly increased numbers of NKT lymphocytes (0.22 ± 0.04), and decreased T lymphocyte activation index, i.e., a ratio of activated T helpers to memory T cells ($CD4^+CD45R0^+$) (24.4 ± 1.72) among CRSwNP patients complicated by intolerance to NSAIDs. When comparing immunological characteristics of the patients with concomitant bronchial asthma to other subgroups, which have CRSwNP, or the patients with/without atopy, we have not detected any statistical differences for immune indexes studied (except elevation of blood eosinophils).

Keywords: chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP), systemic immunity, flow cytometry, asthma, NSAIDs-intolerance, atopy

Введение

Хронический полипозный риносинусит (ПРС) — гетерогенное воспалительное заболевание полости носа и околоносовых пазух, характеризующееся воспалительной инфильтрацией слизистой оболочки с дальнейшим повреждением коллагенового каркаса, что приводит к ремоделированию слизистой и образованию полипов. В зависимости от формы воспалительного про-

цесса в полипозной ткани доминируют или эозинофилы, или нейтрофилы, реже встречается смешанная микс-форма, где присутствует одинаковое количество этих клеток [10]. Несмотря на то что одновременно во многих странах мира проводятся исследования этого заболевания, создаются регистры и ведутся базы данных пациентов с отслеживанием динамики их клинических симптомов и различных лабораторных показателей,

этиология ПРС и механизмы его развития до сих пор остаются невыясненными. В настоящий момент проходит собирательный этап изучения ПРС, появляется все больше данных, свидетельствующих о неоднородности ПРС [3]. Наиболее популярная классификация разделения эндотипов ПРС в зависимости от поляризации иммунного ответа в сторону Th1- или Th2-лимфоцитов не охватывает все разнообразие развития патологического процесса [11]. Колебания иммунологических параметров в динамике хронического воспаления отражают степень адекватности реакции иммунной системы на патологический процесс, в связи с чем они имеют большое диагностическое и прогностическое значение.

В России проводились немногочисленные исследования клеточного иммунитета у больных ПРС. Выявлено снижение содержания Т-лимфоцитов $CD3^+HLA-DR^+$ и $CD4^+$ и повышение процентного уровня В-лимфоцитов $CD19^+$ [5]. По данным ученых из Челябинска, в группе ПРС также обнаружено снижение Т-лимфоцитов $CD3^+HLA-DR^+$, $CD4^+CD25^+CD127^+$ и абсолютного и относительного количества Т-регуляторных клеток (Treg) $CD4^+CD25^+CD127^-$ с одновременным повышением количества Т-НК-лимфоцитов ($CD3^+CD16^+CD56^+$) [7]. Другая группа авторов указывает на уменьшение уровня абсолютного количества Т-хелперов ($CD4^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+$ клеток). В группе больных с рецидивирующим ПРС с сопутствующей бронхиальной астмой (БА) отмечали достоверное уменьшение содержания $CD20^+$ В-клеток по сравнению с группой пациентов с ПРС без БА и без рецидивов [6]. В работе исследователей из Казахстана описано повышение цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови при ПРС [4].

Также, по разным отечественным и зарубежным литературным источникам, обнаружена неоднозначная картина изменения количества Т-регуляторных (Treg) $CD4^+CD25^{bright}CD127^{low/none}$ лимфоцитов при ПРС в периферической крови. В работах ряда авторов отмечалось снижение этой популяции Т-лимфоцитов [7, 16]. В другой статье 2016 года не найдено различий уровня Treg между пациентами с ПРС и здоровыми людьми, но отмечено увеличение этих клеток в ткани полипов [14]. Это подтверждает еще одно исследование, где в полипозном материале обнаружено повышение $CD4^+$ Treg и активированных Т-лимфоцитов [15], при этом другие авторы указывают на снижение этих клеток в ткани [13, 17].

Неправильное функционирование системы врожденного иммунитета слизистой оболочки носа и околоносовых пазух приводит к тому, что не осуществляется иммунная эксклюзия инфекционных агентов, формируется повышенная восприимчивость к вирусным и бактериальным

инфекциям верхних дыхательных путей, что приводит к хронизации воспалительного процесса [1]. Одними из важнейших компонентов клеточного врожденного иммунного ответа являются мультифункциональные лимфоциты натуральные киллеры (NK) $CD3^+CD16^+CD56^+$. При их активации посредством экзоцитоза цитотоксических гранул осуществляется лизис пораженных клеток. Одновременно они синтезируют провоспалительные цитокины: интерферон- γ ($IFN\gamma$) и фактор некроза опухоли. В исследовании, проведенном в Южной Корее, у больных с хроническим риносинуситом выявлены дефекты функционирования NK и выявлены сильные обратные корреляционные связи между эозинофилией периферической крови и дисфункцией NK в объеме нарушения экзоцитоза гранул и экспрессии $IFN\gamma$ [12]. Кроме того, при хроническом риносинусите нарушен NK-индуцируемый апоптоз эозинофилов, что увеличивает продолжительность их жизни и способствует персистенции эозинофильного воспаления слизистой околоносовых пазух [11].

Исходя из вышеизложенного, изучение клеточного иммунитета при полипозном риносинусите остается актуальным и интересным с точки зрения исследования направления патогенетических механизмов этого непонятного на данный момент заболевания.

Цель исследования — оценить состояние показателей клеточного иммунитета у пациентов с ПРС, проживающих в Москве и Московской области.

Материалы и методы

Всего обследовано 20 пациентов, страдающих ПРС, средний возраст $46,7 \pm 16,06$ лет, из них 12 женщин и 8 мужчин. Наличие двустороннего полипозного риносинусита было подтверждено эндоскопическим исследованием полости носа и данными компьютерной томографии околоносовых пазух. Критериями исключения служили односторонний процесс, присутствие онкозаболеваний, аутоиммунной патологии, генетических синдромов (муковисцидоз, аллергический гранулематозный или эозинофильный ангиит, синдром Чарга—Стросса). Пациенты заполняли анкету, в которой отмечали сведения о национальности, поле, возрасте, продолжительности проживания в регионе, сведения о наследственности, аллергических реакциях, непереносимости нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), наличии коморбидных заболеваний, продолжительности течения ПРС, количество оперативных вмешательств по поводу ПРС, интервал между ними, эффективность консервативной терапии. Аллергологическое обследование, включающее скарификационные кожные пробы проводилось в отделении брон-

химальной астмы ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Кровь для исследования брали во время ремиссии. Сравнение показателей проводили в нескольких группах. В качестве показателей контрольной группы были использованы результаты, полученные в аналогичном по технике выполнения исследовании [8], где проанализированы клетки периферической крови 356 практически здоровых лиц в возрасте от 20 до 45 лет из различных регионов России. В связи с клинической неоднородностью пациентов с ПРС одновременно проводили сравнительный анализ внутри группы больных ПРС. Для этого пациенты дополнительно были разделены на группу с сопутствующей бронхиальной астмой (9 человек) и без нее, при наличии непереносимости НПВП (11 человек) и при ее отсутствии и с подтвержденной атопией (10 человек) и без нее.

Для иммунологического исследования использовали венозную кровь пациентов Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ). Цитометрическое исследование проводили в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Для окрашивания лимфоцитов в данном исследовании были использованы следующие моноклональные антитела (МАТ): CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺, CD25⁺, CD27⁺, CD45⁺, CD45R0⁺, CD45RA⁺, CD56⁺ и CD127⁺. МАТ фирмы Beckman Coulter (США) были мечены FITC (изотиоцианатфлуоресцеина), PE (фикоэритрин), PC5 (комплекс PE с цианином-5) и ECD (комплекс PE с техасским красным) [2]. Для удаления эритроцитов пробоподготовку проводили по безотмывочной технологии с использованием следующих лизирующих растворов: OptiLyse C и ImmunoPrep (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США).

Подготовку клеток периферической крови человека (ПКЧ) для многоцветного анализа проводили в соответствии с описанными ранее протоколами [9]. Для корректного исключения из зоны анализа всех частиц, которые не соответствовали по размерам и гранулярности живым лимфоцитам, вводили необходимые логические ограничения в гистограммы распределения частиц по малому, боковому светорассеянию и CD45. В каждой пробе анализировали не менее 10⁴ лимфоцитов. Абсолютное количество клеток определяли как в одноплатформенной (с помощью реагента Flow Count [Beckman Coulter, США]), так и в двухплатформенной (с использованием результатов гематологического анализатора LH500 [Beckman Coulter, США]) системах.

Математическая обработка данных проводилась с использованием программы IBM SPSS

Statistics 23.0 [2]. Все количественные признаки тестировали на соответствие их распределения нормальному критерию Колмогорова. Все показатели иммунограммы имели небольшую величину коэффициента эксцесса и асимметрии, в связи с чем для их анализа можно использовать методы параметрической статистики. Параметрические данные описаны в виде среднего значения и среднего квадратичного отклонения ($\pm$).

Результаты

В таблице 1 представлены данные показателей клеточного иммунитета периферической крови пациентов с хроническим полипозным риносинуситом и группы практически здоровых людей. Исследования показали статистически значимое повышение абсолютного и процентного количества Т-регуляторных (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{lowtoneg}), абсолютного и относительного числа активированных CD3⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов, абсолютного количества NKT-лимфоцитов (CD16⁺CD56⁺CD3⁺) и В-клеток памяти (CD19⁺CD25⁺CD27⁺) у больных, страдающих ПРС. Также обнаружен рост абсолютного (0,25 $\pm$ 0,14) и относительного (10,94 $\pm$ 5,12) количества активированных натуральных киллеров (CD3⁺CD8⁺) и натуральных киллеров (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) при назальном полипозе относительно здоровых людей. Статистически значимых различий показателей цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), общих В-лимфоцитов CD3⁺CD25⁺ и общих Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и общего и процентного содержания лимфоцитов между группами не найдено.

Обсуждение

В результате проведенного анализа различия иммунологических показателей между группой пациентов с ПРС и здоровыми людьми выявлено повышение числа Т-регуляторных (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{lowtoneg}) (Treg) лимфоцитов (табл. 1), которые оказывают супрессирующее воздействие на эффекторные клетки адаптивного иммунного ответа как непосредственно при прямом контакте между клетками, так и через секрецию трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) и интерлейкина-10 (IL-10). Доказано, что дефекты неправильного функционирования системы врожденного иммунитета слизистой оболочки носа и околоносовых пазух приводят к тому, что не осуществляется иммунная эксклюзия инфекционных агентов, формируется повышенная восприимчивость к вирусным и бактериальным инфекциям верхних дыхательных путей, что является предпосылками развития хронического риносинусита, в том числе полипозного [1]. Наряду с этим, при ПРС выявлено повышение абсолютного и относительного ко-

ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПРС И ГРУППЫ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ, СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ И СРЕДНЕЕ КВАДРАТИЧНОЕ ОТКЛОНЕНИЕ ($\pm$)
TABLE 1. CHARACTERISTICS OF CELLULAR IMMUNE STATUS IN PERIPHERAL BLOOD OF THE PATIENTS WITH CHRONIC RHINOSINUSITIS AND NASAL POLYPS, MEAN AND STANDARD DEVIATION ($\pm$)

Показатели	Пациенты с ПРС Patients with CRSwNP		Контрольная группа (практически здоровые люди) Control group (healthy people)	
	Относительное количество клеток The relative number of cells (%)	Абсолютное количество клеток The absolute number of cells ($\times 10^9/L$)	Относительное количество клеток The relative number of cells (%)	Абсолютное количество клеток The absolute number of cells ($\times 10^9/L$)
Лейкоциты White blood cells	–	7,32 $\pm$ 2,29	–	4,0-8,8
Лимфоциты Lymphocytes	33,65 $\pm$ 9,72	2,40 $\pm$ 0,78	19-37	1,0-4,8
Эозинофилы Eosinophils	4,53 $\pm$ 2,50	0,32 $\pm$ 0,2	0-5	0-0,2
В-клетки общие B-cells (CD3 $^+$ CD19 $^+$)	10,11 $\pm$ 2,79	0,25 $\pm$ 0,12	7-17	0,111-0,376
В-клетки памяти Memory B cells (CD19 $^+$ CD5 $^+$ CD27 $^+$)	2,95 $\pm$ 1,23	0,07 $\pm$ 0,04*	1,8-6,8	0,012-0,040
В-клетки памяти (CD19$^+$CD5$^+$CD27$^+$) от общих В-клеток Memory B-cells (CD19 $^+$ CD5 $^+$ CD27 $^+$) from total B cells	28,97 $\pm$ 10,31	0,07 $\pm$ 0,04*	30-40	0,012-0,040
NK (LGL) (CD3 $^+$ CD16 $^+$ CD56 $^+$)	19,70 $\pm$ 6,44*	0,47 $\pm$ 0,21*	8-17	0,123-0,369
NK активированные Activated NK cells (CD3 $^+$ CD8 $^+$)	10,94 $\pm$ 5,12	0,25 $\pm$ 0,14*	1-3	0,23-0,369
NKT-клетки NKT cells (CD16 $^+$ CD56 $^+$ CD3 $^+$)	9,28 $\pm$ 6,15	0,16 $\pm$ 0,13*	0,5-6	0,007-0,165
Регуляторные Т-клетки Regulatory T cells (CD4 $^+$ CD25 $^{\text{bright}}$ CD127 $^{\text{low to neg}}$)	8,76 $\pm$ 1,65*	0,14 $\pm$ 0,06*	2-6	0,009-0,078
Т-клетки активированные Activated T cells (CD3 $^+$ CD25 $^+$)	16,05 $\pm$ 4,55*	0,26 $\pm$ 0,13*	0,5-6	0,007-0,165
Т-клетки общие T cells (CD3 $^+$ CD19 $^-$)	68,43 $\pm$ 6,22	1,65 $\pm$ 0,57	61-85	0,946-2,079
Т-хелперы T helper cells (CD3 $^+$ CD4 $^+$)	41,26 $\pm$ 6,53	0,68 $\pm$ 0,31	35-55	0,576-1,336
Т-хелперы наивные Naive T-helper (CD4 $^+$ CD45RA $^+$)	16,58 $\pm$ 7,93	0,27 $\pm$ 0,13	20-40	0,272-1,123
Т-хелперы активированные и Т-памяти Activated T-helpers and memory T cells (CD4 $^+$ CD45RO $^+$)	26,77 $\pm$ 6,18	0,18 $\pm$ 0,09	5-25	0,068-0,702

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Показатели	Пациенты с ПРС Patients with CRSwNP		Контрольная группа (практически здоровые люди) Control group (healthy people)	
	Относительное количество клеток The relative number of cells (%)	Абсолютное количество клеток The absolute number of cells ($\times 10^9/L$)	Относительное количество клеток The relative number of cells (%)	Абсолютное количество клеток The absolute number of cells ($\times 10^9/L$)
Т цитотоксические Cytotoxic T lymphocytes (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	27,25 $\pm$ 7,53	0,45 $\pm$ 0,19	19-35	0,372-0,974
Индекс соотношения Th/T цитотоксические (относительные единицы) Ratio index (Th/Cytotoxic T cells)	1,69 $\pm$ 0,85		1,5-2,6	

Примечание. * – выборки достоверно отличаются ($p < 0,05$).

Note. *, the groups are significantly different at the level of $p < 0.05$.

личества NK (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) одновременно с резким повышением числа активированных NK (CD8⁺CD3⁻) в 100% случаев. Мы предположили, что увеличение количества NK можно объяснить дефектом их функционирования. В то же время обнаруженный нами рост относительного числа NKT-клеток (CD16⁺CD56⁺CD3⁺), вероятно, имеет место быть за счет включения компенсаторных механизмов при недостаточности функционирования NK. Все это также создает возможности персистирования воспалительного процесса и затруднение элиминации инфекционных агентов из верхних дыхательных путей. Кроме того, при анализе в 100% случаев было повышено количество активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺), которое можно объяснить постоянным напряжением иммунного ответа из-за перманентного триггерного раздражения инфекционными агентами слизистой околоносовых пазух. Также отмечено повышение абсолютного количества В-клеток памяти (CD19⁺CD5⁺CD27⁺).

Для понимания механизмов формирования разных фенотипов ПРС нами проведен сравнительный анализ между разными группами пациентов с ПРС. Были выделены подгруппы: ПРС + БА; ПРС + непереносимость НПВП; ПРС + атопия, показатели крови которых сравнивали с остальными пациентами ПРС. Мы констатировали достоверно значимое повышение абсолютного числа NKT-лимфоцитов (0,22 $\pm$ 0,04) и снижение показателя активации Т-клеточного звена Т-хелперы активированные к Т-клеткам памяти (CD4⁺CD45R0⁺) (24,4 $\pm$ 1,72) у пациентов с ПРС с одновременной непереносимостью НПВП по сравнению с больными ПРС, толерантными к противовоспалительным препаратам, у которых показатели NKT – 0,09 $\pm$ 0,01,

Т-хелперов, активированных к Т-клеткам памяти – 26,68 $\pm$ 1,91. При сравнении иммунологических показателей группы пациентов с сопутствующей бронхиальной астмой и с остальными больными ПРС и пациентов с атопией и без нее статистически значимой разницы, кроме повышения количества эозинофилов выявлено не было.

Выводы

1. У больных ПРС выявлено статистически значимое повышение числа Т-регуляторных (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{low}neg) (Treg) лимфоцитов, повышение абсолютного и относительного количества NK (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) одновременно с резким повышением числа активированных NK (CD8⁺CD3⁻) в 100% случаев и повышение абсолютного числа В-клеток памяти (CD19⁺CD5⁺CD27⁺).

2. Не выявлено существенного отличия показателей клеточного иммунитета в периферической крови между различными фенотипами больных ПРС (наличие БА, непереносимости НПВП и атопии), кроме значимого повышения абсолютного числа NKT-лимфоцитов и снижения показателя активации Т-клеточного звена Т-хелперы, активированные к Т-клеткам памяти (CD4⁺CD45R0⁺), у пациентов с ПРС с одновременной непереносимостью НПВП.

3. Полученные результаты свидетельствуют о нецелесообразности исследования показателей системного клеточного иммунитета у больных с хроническим полипозным риносинуситом при составлении персонализированной тактики ведения и лечения пациентов и определении долгосрочного прогноза течения заболевания.

Список литературы / References

1. Егоров В.И., Савлевич Е.Л. Место врожденного иммунитета в развитии хронического риносинусита и перспективы тактики консервативного лечения // Альманах клинической медицины, 2016. Т. 44, № 7. С. 850-856. [Egorov V.I., Savlevich E.L. The role of innate immunity in the development of chronic rhinosinusitis and perspectives of its conservative management. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2016, Vol. 44, no. 7, pp. 850-856. (In Russ.)]
2. Герасимов А.Н., Морозова Н.И. Параметрические и непараметрические методы в медицинской статистике // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2015. Т. 5, № 84. С. 6-12. [Gerasimov A.N., Morozova N.I. Parametric and nonparametric methods in medical statistics. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2015, Vol. 5, no. 84, pp. 6-12. (In Russ.)]
3. Козлов В.С., Савлевич Е.Л. Полипозный риносинусит. Современные подходы к изучению патогенеза, диагностике и лечению // Вестник оториноларингологии, 2015. Т. 80, № 4. С. 107-111. [Kozlov V.S., Savlevich E.L. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps. The recent trend in the studies of the pathogenesis, diagnosis and treatment of this disease. *Vestnik otorinolaringologii*, 2015, Vol. 80, no. 4, pp. 107-111. (In Russ.)]
4. Кудайбергенова С.Ф., Ногаев Н., Камалбеков А. Цитокиновый профиль при полипозном риносинусите // Вестник Казахского Национального медицинского университета, 2013. Т. 1, № 4. С. 154-155. [Kudaybergenova S.F., Nogaev N., Kamalbekov A. The cytokine profile in polypoid rhinosinusitis. *Vestnik Kazakhskogo Natsional'nogo meditsinskogo universiteta = Vestnik of the Kazakh National Medical University*, 2013, Vol. 1, no. 4, pp. 154-155. (In Russ.)]
5. Лаптева А.М., Коленчукова О.А., Смирнова С.В. Особенности иммунного статуса и назального микробиоценоза при полипозном риносинусите и астматической триаде // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 563-568. [Lapteva A.M., Kolenchukova O.A., Smirnova S.V. Immune parameters and nasal microflora in patients with polypoid rhinosinusitis and asthmatic triad. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 563-568. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-563-568.
6. Магомедова К.М., Саидов М.З., Давудов Х.Ш., Климова С.В., Будихина А.С., Нажмудинов И.И. Взаимосвязь состояния системного и местного адаптивного иммунитета с рецидивами при полипозном риносинусите // Российская оториноларингология, 2009. Т. 6, № 43. С. 60-66. [Magomedova K.M., Saidov M.Z., Davudov Kh.Sh., Klimova S.V., Budikhina A.S., Nazhmudinov I.I. Relation with condition of systemic and local adaptive immunity with relapses at polypous rhinosinusitis. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2009, Vol. 6, no. 43, pp. 60-66. (In Russ.)]
7. Семенов М.В., Зурочка А.В., Зурочка В.А. Изменение количества Т-регуляторных клеток у пациентов, страдающих полипозным риносинуситом на фоне лечения назальными топическими глюкокортикостероидами // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 233-238. [Semenov M.V., Zurochka A.V., Zurochka V.A. Quantitative changes of T-regulatory cells in patients with polypous rhinosinusitis treated by nasal glucocorticosteroids. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 233-238. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-233-238.
8. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 2-3. С. 227-238. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Totolian Areg A., Chereshev V.A. Major and lymphocyte populations of human peripheral blood lymphocytes and their reference values, as assayed by multi-colour cytometry. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 2-3, pp. 227-238. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-2-3-227-238.
9. Хайдуков С.В., Байдун Л.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 974-992. [Khaidukov S.V., Baydun L.V., Zurochka A.V., Totolian Areg A. The standardised technique: «Study subpopulations of peripheral blood lymphocytes by using flow cytometry». *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 974-992. (In Russ.)]
10. Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F., Cohen N., Cervin A., Douglas R., Gevaert P., Georgalas C., Goossens H., Harvey R., Hellings P., Hopkins C., Jones N., Joos G., Kalogjera L., Kern B., Kowalski M., Price D., Riechelmann H., Schlosser R., Senior B., Thomas M., Toskala E., Voegels R., Wangde Y., Wormald P.J. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*, 2012, Vol. 50, no. 1, pp. 1-12.
11. Kim J.H., Choi G.E., Lee B.J., Kwon S.W., Lee S.H., Kim H.S., Jang Y.J. Natural killer cells regulate eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *Sci Rep.*, 2016, Vol. 6, 27615. doi: 10.1038/srep27615.
12. Kim J.H., Kim G.E., Cho G.S., Kwon H.J., Joo C.H., Kim H.S., Jang Y.J. Natural killer cells have impaired effector functions. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 10, e77177. doi: 10.1371/journal.pone.0077177.
13. Kim Y.M., Munoz A., Hwang P.H., Nadeau K.C. Migration of regulatory T cells toward airway epithelial cells is impaired in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 137, no. 1, pp. 111-121.
14. Miljkovic D., Psaltis A., Wormald P.J., Vreugde S. T regulatory and Th17 cells in chronic rhinosinusitis with polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.*, 2016, Vol. 6, no. 8, pp. 826-834.

15. Pant H., Hughes A., Schembri M., Miljkovic D., Krumbiegel D. CD4(+) and CD8(+) regulatory T cells in chronic rhinosinusitis mucosa. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2014, Vol. 28, no. 2, pp. 83-89.
16. Sharma S., Watanabe S., Sivam A., Wang J., Neuwirth S.J., Perez R.I., de Tineo M., Baroody F.M., Naclerio R.M., Pinto J.M. Peripheral blood and tissue T regulatory cells in chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2012, Vol. 26, no. 5, pp. 371-379.
17. van Bruaene N., Perez-Novo C.A., Basinski T.M., van Zele T., Holtappels G., de Ruyck N., Schmidt-Weber C., Akdis C., van Cauwenberge P., Bachert C., Gevaert P. T-cell regulation in chronic paranasal sinus disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 121, no. 6, pp. 1435-1441.

Авторы:

Савлевич Е.Л. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

Хайдуков С.В. — д.б.н., старший научный сотрудник отдела «Научно-инновационный центр Технопарк» ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия

Курбачева О.М. — д.м.н., профессор, заведующая отделением «Бронхиальная астма» ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» ФМБА России, Москва, Россия

Бондарева Г.П. — д.м.н., ведущий научный сотрудник отделения «Бронхиальная астма» ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» ФМБА России, Москва, Россия

Шачнев К.Н. — аспирант кафедры оториноларингологии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по науке ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России; ГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, кафедра иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Savlevich E.L., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, Central State Medical Academy, Department for Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

Khaidukov S.V., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Division “Research and Innovation Center Technopark”, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kurbacheva O.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, The Bronchial Asthma Department, National Research Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

Bondareva G.P., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, The Bronchial Asthma Department, National Research Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

Shachnev K.N., Postgraduate Student, Department of Otorhinolaryngology, Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Deputy Director, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency of Russia; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Department of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 19.04.2017
Отправлена на доработку 02.05.2017
Принята к печати 21.06.2017

Received 19.04.2017
Revision received 02.05.2017
Accepted 21.06.2017

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ ОСЛОЖНЕНИЯХ ГОРМОНОТЕРАПИИ МИОМЫ МАТКИ

**Хворостухина Н.Ф., Островская А.Е., Новичков Д.А.,
Степанова Н.Н.**

*ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства
здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия*

Резюме. В структуре гинекологических заболеваний миома матки занимает «почетное» второе место после воспалительных процессов половых органов, а удельный вес ее достигает 40%.

Целью исследования явилось изучение особенностей цитокинового профиля и причин дисфункции иммунной системы у больных с миомой матки, осложненной геморрагическим синдромом на фоне гормонотерапии.

Представлен детальный сравнительный анализ результатов обследования 95 женщин с миомой матки, размеры которой не превышали 12-недельную беременность, преимущественно с интрамуральной и субсерозной локализацией узлов и имеющих показания для консервативного лечения. Основную группу составили 43 пациентки с миомой матки и клиникой геморрагического синдрома на фоне гормонотерапии (Бусерелин-депо по 3,75 мг). В группе сравнения (n = 52) лечение миомы матки гормональными препаратами не проводилось. Контрольная группа была представлена практически здоровыми женщинами (n = 27). Обследование включало комплексное ультразвуковое сканирование с доплерометрией на аппарате HITACHI-5500. Состояние иммунной системы оценивали по содержанию цитокинов (интерлейкинов IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-2, IFN γ , TNF α) и уровню маркера апоптоза Fas-лиганда в сыворотке крови методом твердофазного иммуноанализа. Для выявления возбудителей урогенитальных инфекций использовали методы ПЦР-диагностики и иммуноферментного анализа.

Установлено, что возникновение геморрагического синдрома на фоне гормонотерапии миомы матки ассоциируется с активизацией латентных форм урогенитальных инфекций, в результате потенцирующего иммуносупрессивного действия гормональных препаратов, способствующих нарушениям иммунного статуса, редукции функций Th1- и Th2-лимфоцитов, а также значительному угнетению апоптоза. В основной группе концентрации IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 и IFN γ уменьшались в 1,3–1,5 раза, а содержание TNF α и FasL — в 2 раза по отношению к контрольным данным. Кроме того, анализ качественных показателей маточной гемодинамики показал, что осложнения гормонотерапии миомы матки сопровождаются достоверным увеличением скорости систолического кровотока в маточных артериях (в 1,8 раза), на фоне снижения диастолического кровотока (в 2,5 раза) и повышения ИР сосудистой стенки (в 1,6 раза), в сравнении с параметрами здоровых женщин.

Адрес для переписки:

Хворостухина Наталья Федоровна
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского»
410012, Россия, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112.
Тел.: 8 (927) 277-79-35.
E-mail: Khvorostukhina-NF@yandex.ru

Address for correspondence:

Khvorostukhina Nataliya F.
Saratov State V.I. Razumovsky Medical University
410012, Russian Federation, Saratov,
Bolshaya Kazachya str., 112.
Phone: 7 (927) 277-79-35.
E-mail: Khvorostukhina-NF@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.Ф. Хворостухина, А.Е. Островская, Д.А. Новичков,
Н.Н. Степанова «Цитокиновый профиль при осложнениях
гормонотерапии миомы матки» // Медицинская
иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 739–748.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-740-748
© Хворостухина Н.Ф. и соавт., 2017

For citation:

N.F. Khvorostukhina, A.E. Ostrovskaya, D.A. Novichkov,
N.N. Stepanova "Cytokine profile in complications of hormone
therapy administered for uterine fibroids", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 6,
pp. 739–748. doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-740-748
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-740-748

Полученные данные диктуют необходимость более детального обследования женщин в плане выявления хронических форм урогенитальных инфекций, с целью совершенствования способов консервативного лечения миомы матки, снижения частоты осложнений и повышения эффективности гормонотерапии.

Ключевые слова: миома матки, цитокины, доплерометрия, урогенитальные инфекции, осложнения гормонотерапии

CYTOKINE PROFILE IN COMPLICATIONS OF HORMONE THERAPY ADMINISTERED FOR UTERINE FIBROIDS

Khvorostukhina N.F., Ostrovskaya A.E., Novichkov D.A.,
Stepanova N.N.

Saratov State V.I. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Abstract. Uterine fibroids take a second place in the structure of gynecological diseases, after inflammation of genital organs, with a share of 40%. The aim of the study was to investigate cytokine profile and factors of immune dysfunction in patients with uterine fibroids complicated by hemorrhagic syndrome during a course of hormone replacement therapy.

A detailed comparative analysis of a survey was performed in 95 women with uterine fibroids. Tumor size did not exceed 12 weeks of pregnancy, mainly with intramural and subserous localization of nodes, having indications for conservative treatment. The main group consisted of 43 patients with uterine fibroids and clinical signs of hemorrhagic syndrome observed in the course of hormone replacement therapy (Buserelin depot 3.75 mg). In a comparison group (n = 52), treatment of fibroids with hormonal therapy was not carried out. A control group comprised healthy women (n = 27). The survey consisted of a comprehensive ultrasound scan with Doppler ultrasound apparatus HITACHI 5500. The immune parameters were evaluated as contents of cytokines (interleukins IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-2, IFN γ , TNF α) and levels of the Fas-ligand apoptosis marker in blood serum using solid-phase immunoassay technique. For identification of urogenital infection pathogens, methods of diagnostic PCR and ELISA were used.

The results of the study were as follows: it is established that emergence of hemorrhagic syndrome on the during hormone therapy for uterine fibroids is associated with activation of latent forms of urogenital infections, being a probable result of potentiating immunosuppressive action of hormonal drugs that promote alterations of immune status, reduction of Th1 and Th2 lymphocyte functions, as well as significant inhibition of apoptosis. In the main group, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and IFN concentrations were decreased by 1.3 to 1.5 – fold, whereas TNF α and FasL contents were 2 times lower than the levels in control group. In addition, qualitative analysis of uterine hemodynamics has shown that the complications associated with hormone therapy of uterine fibroids are accompanied by a significant increase of the systolic blood flow velocity in the uterine arteries (1.8%), against decrease in diastolic blood flow (2.5 times) and increased resistance index of the vascular wall (1.6 times), as compared with appropriate parameters in healthy women. In conclusion, the received data suggest a need for more detailed examination of women, in order to detect chronic forms of urogenital infections, by means of improving conservative treatment strategies of uterine fibroids, reducing frequency of complications and effectiveness of hormone therapy.

Keywords: uterine fibroids, cytokines, Doppler sonography, urogenital infections, hormone therapy, complications

Введение

Сохранение и восстановление репродуктивного потенциала является одной из основных задач современной медицины, несмотря на прогрессирующее снижение индекса здоровья женского населения. В структуре гинекологических заболеваний миома матки (ММ) занимает «почетное» второе место после воспалительных процессов

половых органов. Удельный вес ММ достигает 40% и не имеет тенденции к снижению за последние десятилетия [11, 17, 21, 23]. При этом многими авторами отмечается омолаживание контингента больных ММ, что непосредственно отражается на реализации репродуктивной функции женщин. Известно, что возникновение опухоли ассоциируется с нарушениями эн-

докринного статуса и иммунного гомеостаза. По мнению некоторых ученых, возникновение маточных кровотечений при ММ связано с нарушениями регуляции в системе «гипоталамус—гипофиз—яичники» [1, 7, 16]. В то же время продолжаются дискуссии: является ли ММ истинно гормонально зависимым заболеванием или имеет воспалительный генез [9]. В работах последних лет доказана немаловажная роль дисфункции иммунной системы, дисбиотических нарушений и сексуально-трансмиссивных инфекций в патогенезе ММ [3, 9, 13].

В настоящее время предложено множество различных вариантов органосохраняющего лечения ММ, включающего химиотерапию, консервативную миомэктомию с помощью гистероскопии, лапароскопии и лапаротомии, эмболизацию маточных артерий, дистанционное разрушение опухоли фокусированным ультразвуком под контролем МРТ [6, 12, 14, 19, 22, 24]. Однако, несмотря на широкое внедрение высоких хирургических технологий при лечении ММ, вероятность рецидива заболевания в течение 5 лет составляет 45–55% [22, 24]. А удельный вес выполняемых гистерэктомий при ММ в структуре оперативных вмешательств достигает 60,9–95,3% [4]. В связи с этим приоритет при лечении ММ остается за гормональной терапией, используемой как в качестве нео- и адъювантной, так и самостоятельного варианта лечения [1, 4, 11, 16, 17, 20, 21, 23]. В арсенале специалиста на сегодняшний день имеется огромный выбор лекарственных средств для химиотерапии ММ (прогестагены, агонисты гонадолиберина (а-ГнРГ), антигестагены). Следует отметить, что при назначении любого из гормональных препаратов возможны побочные эффекты или осложнения (метроррагии, увеличение размеров опухоли). Появление этих осложнений зачастую расценивается как неэффективность гормонотерапии и сопровождается направлением на оперативное лечение.

Цель — изучить особенности цитокинового профиля и причины дисфункции иммунной системы у больных миомой матки, осложненной геморрагическим синдромом на фоне гормонотерапии.

Материалы и методы

Под нашим наблюдением находились женщины с ММ ($n = 95$), размеры которой не превышали 12-недельную беременность, преимущественно с интрамуральной и субсерозной локализацией узлов и имеющие показания для консервативного лечения. Основную группу составили 43 пациентки с ММ и клиникой геморрагического син-

дрома на фоне гормонотерапии (Бусерелин-депо по 3,75 мг каждые 4 недели). В группе сравнения ($n = 52$) лечение ММ гормональными препаратами не проводилось. Контрольная группа была представлена практически здоровыми женщинами ($n = 27$).

Всем пациенткам проводилось стандартное клиничко-лабораторное обследование и комплексное ультразвуковое исследование (УЗИ) с доплерометрией абдоминальным и вагинальным датчиком, на аппарате HITACHI-5500 с применением широкополосных, сверхвысокоплотных конвексных датчиков 3,5–5,0 МГц и полостных датчиков 5,0–7,5 МГц. Определяли размеры матки, локализацию и размеры узлов ММ, а также максимальную ($V_{\max}$) и минимальную ($V_{\min}$) скорости кровотока, с расчетом индекса резистентности (ИР) в каждой маточной артерии. Состояние иммунной системы оценивали по содержанию цитокинов в сыворотке крови женщин. Исследование проводили методом твердофазного иммуноанализа. Для определения интерлейкинов (IL-1 β , IL-4, IL-6), интерферона (IFN γ) и фактора некроза опухоли (TNF α) использовали наборы реактивов «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Для определения интерлейкина IL-2 использовали набор реактивов фирмы Biosource, США. Для определения Fas-лиганда (FasL) использовали набор реактивов фирмы Medsystems, Австрия. Дополнительно проведено обследование на ИППП методом ПЦР-диагностики и выявления антител IgG и IgM к возбудителям урогенитальных инфекций (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex*) с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) на тест-системах производства ЗАО «Вектор Бест» (г. Новосибирск).

Статистическая обработка результатов исследования выполнена с использованием пакета прикладных программ Statgraphics (Statistical Graphics System), разработанного фирмой STSC Inc., с выведением $M \pm m$, процентов, логарифмических средних (x) с 95% доверительным интервалом и достоверностью различий (P) по критерию Стьюдента-Фишера.

Результаты

Возраст обследованных женщин варьировал от 21 до 42 лет и в среднем составил в основной группе $30,5 \pm 4,3$ лет, в группе сравнения — $30,2 \pm 3,7$ года, в контрольной группе — $30,2 \pm 5,5$ лет, что не имело значимых межгрупповых различий. Общая характеристика групп обследованных женщин представлена в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП ОБСЛЕДОВАННЫХ ЖЕНЩИН

TABLE 1. GENERAL CHARACTERISTICS OF THE STUDIED GROUPS OF WOMEN

Исследуемый показатель Parameters under study	Основная группа Main group (n = 43)		Группа сравнения Comparison group (n = 52)		Контрольная группа Control group (n = 27)	
	n	%	n	%	n	%
Акушерско-гинекологический анамнез Obstetric anamnesis						
Роды Birth	21	48,8±1,8*	25	48,1±1,2*	22	81,5±2,1
Самопроизвольный аборт Spontaneous abortion	16	37,2±1,6*	19	36,5±1,3*	2	7,4±0,7
Нарушения овариально-менструального цикла Altered ovarian-menstrual cycle	33	76,7±2,4*	40	76,9±2,6*	1	3,7±0,5
Хронические воспалительные заболевания гениталий Chronic inflammatory diseases of the genitals	38	88,4±2,7*	46	88,5±2,4*	3	11,1±0,8
Эктопия шейки матки Cervical ectopia	28	65,1±2,2*	33	63,5±2,7*	1	3,7±0,5
Использование ВМС The intrauterine devices	2	4,7±0,4	2	3,8±0,5	0	0
Экстрагенитальные заболевания Extragenital diseases						
Ожирение Obesity	28	65,1±2,2*	33	63,5±2,7*	1	3,7±0,5
Заболевания сердечно-сосудистой системы Cardiovascular disease	15	34,9±1,5	19	36,5±1,3*	0	0
Заболевания желудочно-кишечного тракта Diseases of the gastrointestinal tract	6	13,9±0,8*	7	13,5±0,9*	2	7,4±0,7
Анемия Anemia	42	97,7±2,2	6	11,5±0,6*	0	0

Примечание. * p – достоверность различий с контрольной группой (p < 0,05).

Note. * p, significance of differences with the control group (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ДОППЛЕРОМЕТРИИ ПРИ МИОМЕ МАТКИ

TABLE 2. THE RESULTS OF DOPPLER IMAGING IN UTERINE FIBROIDS

Исследуемый показатель Parameters under study	Основная группа Main group (n = 43)	Группа сравнения Comparison group (n = 52)	Контрольная группа Control group (n = 27)
V max см/сек. V max cm/sec	83,29±3,10**	66,10±2,08*	45,16±1,23
V min см/сек. V min cm/sec	8,17±0,52**	11,56±0,39*	20,32±0,74
Индекс резистентности The resistance index	0,90±0,02*	0,79±0,02*	0,54±0,02

Примечание. * p – достоверность различий с контрольной группой (p < 0,05); # p – достоверность различий с группой сравнения (p < 0,05).

Notes. * p, significance of differences with the control group (p < 0.05); # p, significance of differences with the comparison group (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОКИНОВ ПРИ МИОМЕ МАТКИ

TABLE 3. THE RESULTS OF THE CYTOKINE STUDY IN UTERINE FIBROIDS

Исследуемый показатель (пг/мл) Parameter studied (pg/ml)	Основная группа Main group (n = 43)	Группа сравнения Comparison group (n = 52)	Контрольная группа Control group (n = 27)
IL-1 β	4,6 $\pm$ 0,19*	5,2 $\pm$ 0,22*	6,5 $\pm$ 0,08
IL-2	60,1 $\pm$ 0,65*	62,2 $\pm$ 1,04*	79,7 $\pm$ 1,41
IL-4	2,6 $\pm$ 0,32*	2,9 $\pm$ 0,15*	3,7 $\pm$ 0,09
IL-6	4,3 $\pm$ 0,22*	4,8 $\pm$ 0,32*	6,3 $\pm$ 0,14
TNF α	0,8 $\pm$ 0,02*#	1,2 $\pm$ 0,04*	1,6 $\pm$ 0,05
IFN γ	8,6 $\pm$ 1,16*	10,3 $\pm$ 1,05*	13,3 $\pm$ 0,27
FasL	0,15 $\pm$ 0,03*	0,17 $\pm$ 0,04*	0,3 $\pm$ 0,05

Примечание. * p – достоверность различий с контрольной группой (p < 0,05); # p – достоверность различий с группой сравнения (p < 0,05).

Note. * p, significance of differences against control group (p < 0.05); # p, significance of differences against comparison group (p < 0.05).

Обращает на себя внимание высокая частота хронических воспалительных процессов половых органов, нарушений менструального цикла и цервикальной патологии у больных с ММ в сравнении с параметрами контрольной группы. Кроме того, невынашивание беременности и заболевания сердечно-сосудистой системы в анамнезе прослежены у каждой 3-ей пациентки с ММ, а более чем у 60% установлено нарушение жирового обмена. Анемия легкой и средней степеней тяжести достоверно чаще (в 8,5 раз) диагностировалась в основной группе.

Результаты проведенного УЗИ показали, что размеры матки в группах обследуемых женщин колебались от 6-7 до 12 недель беременности. Средний объем матки в основной группе составил 394,2 $\pm$ 178,6 см³, в группе сравнения – 391,3 $\pm$ 159,6 см³, что имело значимые различия с контрольными данными (84,7 $\pm$ 5,2 см³; p < 0,05). По локализации миоматозных узлов в обеих группах наблюдались преимущественно интерстициальные, реже – субсерозные. Количество узлов варьировало от 3 до 6, а размеры – от 2,5 до 5 см.

При изучении маточной гемодинамики у больных ММ мы не выявили достоверных различий уголnezависимых параметров в правой и левой маточных артериях. Поэтому для дальнейших исследований использовали усредненные величины V max, V min и ИР между маточными артериями (табл. 2).

Анализ качественных показателей маточной гемодинамики показал, что у пациенток с ММ скорость систолического кровотока в маточных артериях (V max) достоверно увеличивалась по отношению к контрольным данным, на фоне снижения диастолического кровотока (V min)

и повышения ИР сосудистой стенки. Более выраженные изменения параметров доплерометрии мы констатировали в основной группе (табл. 2). При сочетании ММ с геморрагическим синдромом на фоне гормонотерапии выявлено повышение V max в 1,8 раза, ИР – в 1,6 раза, а V min снижалась в 2,5 раза в сравнении с параметрами у здоровых женщин (p < 0,05), при этом были получены значимые различия с группой сравнения.

Результаты исследования иммунной системы показали достоверное снижение всех изучаемых цитокинов у больных ММ, при этом более выраженное снижение показателей констатировано в группе пациенток с осложнениями гормонотерапии (табл. 3). В основной группе концентрации IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 и IFN γ уменьшались в 1,3-1,5 раза по отношению к контрольным данным, а содержание TNF α – в 2 раза (p < 0,05).

Соотношение IFN γ /IL-4 у пациенток с ММ несколько снижалось в сравнении с контрольной группой (с 3,6 до 3,5), а при сочетании ММ с геморрагическим синдромом – до 3,3, что свидетельствует о редукции преимущественно Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-клетками и подавлении в большей степени клеточного иммунного ответа при развитии геморрагического синдрома на фоне гормонотерапии ММ.

При изучении маркера апоптоза в клеточной популяции FasL мы констатировали достоверное уменьшение его уровня по отношению к нормативным значениям (в группе сравнения – в 1,8 раза), с прогрессирующим падением его содержания (в 2 раза) в сыворотке крови пациенток основной группы (табл. 3).

Учитывая высокую частоту хронических воспалительных заболеваний гениталий у больных

ММ, мы включили в план обследования женщин, помимо микроскопии мазков, инфекционный скрининг, с использованием ПЦР-диагностики и метода ИФА.

Анализ данных бактериоскопического исследования мазков позволил диагностировать бакте-

риальный вагиноз более чем у половины женщин с ММ без предшествующего лечения, кольпит – в каждом третьем случае (табл. 4). Развитие осложнений на фоне приема гормональных препаратов способствовало достоверному увеличению частоты обнаружения лабораторных признаков

ТАБЛИЦА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИНФЕКЦИОННОГО СКРИНИНГА ПРИ МИОМЕ МАТКИ

TABLE 4. RESULTS OF INFECTION SCREENING IN UTERINE FIBROIDS

Исследуемый показатель Parameter under study	Основная группа Main group (n = 43)		Группа сравнения Comparison group (n = 52)		Контрольная группа Control group (n = 27)	
	n	%	n	%	N	%
Бактериоскопическое исследование мазков Bacterioscopy of smears						
Нормоценоз Normocenosis	1	2,4±0,3*#	2	3,8±0,5*	26	96,3±2,7
Бактериальный вагиноз Bacterial vaginosis	9	20,9±1,1**	30	57,7±2,4*	1	3,7±0,5
Кольпит Colpitis	33	76,7±2,4#	20	38,5±1,5	0	0
ПЦР-диагностика на ИППП PCR diagnostics of sexually transmitted infections						
Хламидии Chlamydia	25	58,1±2,3#	12	23,1±1,3	0	0
Уреаплазмы Ureaplasma	18	41,9±1,4**	15	28,8±1,5*	1	3,7±0,5
Микоплазмы Mycoplasma	21	48,8±1,8**	19	36,5±1,7*	2	7,4±0,7
Трихомонады Trichomonas	23	53,5±1,9#	6	11,5±0,6	0	0
ИФА на ИППП ELISA of sexually transmitted infections						
Хламидии IgG Chlamydia IgG	43	100,0#	33	63,5±2,7	0	0
Хламидии IgM Chlamydia IgM	25	58,1±2,3#	12	23,1±1,3	0	0
Уреаплазмы IgG Ureaplasma IgG	42	97,7±2,2*	50	98,1±1,6*	4	14,8±0,9
Уреаплазмы IgM Ureaplasma IgM	18	41,9±1,4#	15	28,8±1,5	0	0
Трихомонады IgG Trichomonas IgG	42	97,7±2,2#	33	63,5±2,7	0	0
ВПГ IgG HSV IgG	43	100,0*	52	100,0*	7	25,9±1,2
ВПГ IgM HSV IgM	38	88,4±2,7#	31	59,6±2,6	0	0

Примечание. * p – достоверность различий с контрольной группой (p < 0,05); # p – достоверность различий с группой сравнения (p < 0,05).

Note. * p, significance of differences against control group (p < 0.05); # p, significance of differences against comparison group (p < 0.05).

кольпита (в 2 раза), при снижении удельного веса бактериального вагиноза (в 2,8 раза). Возбудители специфических инфекций при микроскопии не были выявлены ни в одном случае.

Проведение ПЦР-диагностики на ИППП положительные результаты были получены не у всех больных с ММ (табл. 4). В группе сравнения преобладали микоплазменная и уреоплазменная инфекции, хламидии были обнаружены почти у каждой 4-ой женщины, а трихомоназ выявлен в единичных наблюдениях. У пациенток основной группы установлено достоверное возрастание частоты диагностики урогенитальных инфекций при ПЦР-скрининге. Однако дополнительное исследование крови на обнаружение специфических антител IgG и IgM к возбудителям ИППП методом ИФА позволило установить в основной группе носительство уреоплазменной и трихомонадной инфекций уже более чем у 97% женщин; хронический хламидиоз и герпетическую инфекцию – в 100% наблюдений, а различные ассоциации возбудителей констатированы во всех случаях. В группе сравнения отмечено некоторое снижение удельного веса латентных форм ИППП в сравнении с показателями основной группы, но частота обнаружения возбудителей урогенитальных инфекций при ИФА в 2-3,5 раза превышала аналогичные результаты ПЦР-диагностики. А удельный вес определяемых IgM к хламидиям и уреоплазмам в группах совпадал с данными ПЦР-тестирования (табл. 4).

Необходимо также отметить, что выявление IgM к возбудителям урогенитальных инфекций у больных основной группы свидетельствовало об активизации хронического воспалительного процесса гениталий, проявлением которого, по нашему мнению, и являлся геморрагический синдром в виде маточного кровотечения различной степени выраженности.

Обсуждение

В настоящее время установлено, что одним из факторов риска возникновения ММ является хронический воспалительный процесс внутренних половых органов [5, 15]. Анализ анамнестических данных в нашей работе показал преобладание генитальной патологии у всех больных с ММ. В то же время возникновение осложнений гормонотерапии сопровождалось достоверным увеличением частоты выявления лабораторных признаков кольпита (до 77%), с обнаружением возбудителей урогенитальных инфекций даже при ПЦР-скрининге. Дополнительное обследование женщин методом ИФА позволило диагностировать латентные формы ИППП у боль-

шинства больных ММ, а признаки активизации хронических форм урогенитальных инфекций были более выражены при осложнениях гормонотерапии. По мнению А.Д. Макацария (2010), развитие системного воспаления является отправной точкой патогенеза тромбофилий, прогрессирование которых вызывает поражение эндотелия сосудов с нарушением его тромборезистентных свойств, что играет ключевую роль в регуляции гемостаза [8]. Кроме того, проведенными ранее исследованиями было доказано, что развитие геморрагического синдрома на фоне гормонотерапии ММ ассоциируется с нарушениями гемостатического потенциала крови, с явлениями гиперкоагуляции, снижением тромбоцитов и их агрегационной способности, угнетением фибринолиза, а также повышением продуктов паракоагуляции [18].

Прогрессирование опухолевого процесса некоторые ученые связывают с иммунодепрессией и неспособностью клеток подвергаться апоптозу [3, 13]. Изучение иммунного статуса при ММ в нашей работе свидетельствовало о подавлении продукции про- и противовоспалительных цитокинов на фоне угнетения апоптоза, с прогрессированием выявленных изменений в случае развития геморрагического синдрома при использовании гормональных препаратов. Снижение концентрации FasL у больных ММ относительно нормативных показателей, по нашему мнению, свидетельствует о снижении цитотоксического киллинга, осуществляемого Т- и НК-клетками, что способствует прогрессированию заболевания и согласуется с данными И.С. Сидоровой и соавт. (2012) [15].

Кроме того, результаты нашего исследования позволили установить, что назначение гормональных препаратов для консервативного лечения ММ на фоне хронического эндометрита специфической этиологии оказывает потенцирующее иммунодепрессивное воздействие на организм женщины, способствуя появлению системной воспалительной реакции организма, увеличивая тем самым частоту побочных эффектов и осложнений.

При комплексном УЗИ с доплерометрией у пациенток с осложнениями гормонотерапии ММ зафиксировано достоверное увеличение максимальной скорости кровотока (в 1,8 раза), индекса периферического сопротивления (в 1,6 раза), при снижении диастолического кровотока (в 2,5 раза). Аналогичные данные были представлены в публикации И.Е. Рогожиной и соавт. (2013). Авторы отметили выраженные изменения маточной гемодинамики и преобладание гипер-

васкулярного типа опухолей у больных с ММ, которым предстояло хирургическое лечение, в связи с маточным кровотечением [14]. В то же время И.А. Озерская и соавт. (2014) выявили у женщин старше 35 лет, страдающих ММ, повышение максимальной и конечно-диастолической скоростей, на фоне снижения ИР маточных артерий [10]. Однако результаты морфологических исследований миометрия и миоматозных узлов, опубликованные Д.В. Джакуповым и соавт. (2014), подтвердили роль гипертензии в крупных артериях матки в патогенезе кровотечений при миоме [2], что, по нашему мнению, является следствием повышенного ИР сосудистой стенки при развитии воспалительной реакции в миометрии.

Заключение

Осложнения при консервативном лечении ММ обусловлены активизацией латентных форм ИППП, в результате потенцирующего иммуносупрессивного действия гормональных препаратов и прогрессирования нарушений гемодинамики в маточных артериях. Полученные результаты диктуют необходимость более детального обследования женщин в плане выявления хронических урогенитальных инфекций, с целью оптимизации существующих подходов при проведении органосохраняющих методов терапии ММ, снижения частоты осложнений и повышения эффективности гормонотерапии.

Список литературы / References

1. Буянова С.Н., Мгелиашвили М.В., Петракова С.А. Современные представления об этиологии, патогенезе и морфогенезе миомы матки // Российский вестник акушера-гинеколога, 2008. Т. 8, № 6. С. 45-50. [Buianova S.N., Mgeliashvili M.V., Petrakova S.A. Current views of the etiology, pathogenesis, and morphogenesis of uterine myoma. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*, 2008, Vol. 8, no. 6, pp. 45-50. (In Russ.)]
2. Джакупов Д.В., Локшин В.Н., Хамко В.А. Патогенетические особенности изменения морфологической структуры при миоме матки, осложненной кровотечением // Вестник Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого, 2014. № 78. С. 122-124. [Dzhakupov D.V., Lokshin V.N., Khamko V.A. Pathogenetic characteristics of change in anatomical structure in hysteromyoma complicated by bleeding. *Vestnik Novgorodskogo gosudarstvennogo universiteta im. Yaroslava Mudrogo* = *Vestnik of Yaroslav the Wise Novgorod State University*, 2014, no. 78, pp. 122-124. (In Russ.)]
3. Дивакова Т.С., Бекиш В.Я. Роль апоптоза, индуцированного Лупридом Депо, в лечении женщин с интерстициальной миомой матки в репродуктивном возрасте // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа, 2014. № 1 (31). С. 123-128. [Divakova T.S., Bekish V.Ya. The role of apoptosis induced by Lupride depo in women with interstitial myoma treatment in reproductive age. *Reproduktivnoe zdorovye. Vostochnaya Evropa* = *Reproductive Health. Eastern Europe*, 2014, no. 1 (31), pp. 123-128. (In Russ.)]
4. Зацепин А.В., Новикова В.А., Васина И.Б. Сравнение эффективности фармакологических методов антирецидивного лечения миомы матки после консервативной миомэктомии // Кубанский научный медицинский вестник, 2012. № 2. С. 88-93. [Zatsepin A.V., Novikova V.A., Vasina I.B. Efficiency comparison of pharmaceutical antirecurrent methods of fibroids treatment after conservative myomectomy. *Kubanskij nauchnyy medicinskij vestnik*, 2012, no. 2, pp. 88-93. (In Russ.)]
5. Кичигин О.В., Арестова И.М., Занько Ю.В. Факторы риска развития миомы матки и качество жизни пациенток, оперированных по поводу миомы матки // Охрана материнства и детства, 2013. № 2 (22). С. 36-41. [Kichigin O.V., Arestova I.M., Zanko Yu.V. Risk factors of hysteromyoma development and quality of life of patients operated in connection with hysteromyoma. *Okhrana materinstva i detstva* = *Maternal and Child Health*, 2013, no. 2 (22), pp. 36-41. (In Russ.)]
6. Коренная В.В., Подзолкова Н.М., Пучков К.В. Органосохраняющие методы лечения миомы матки: есть ли повод для дискуссии? // Гинекология, 2015. Т. 17, № 1. С. 78-82. [Korennaya V.V., Podzolkova N.M., Puchkov K.V. Methods of organ-preservation of uterine fibroids. Is there a cause for debate? *Ginekologiya* = *Gynecology*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 78-82. (In Russ.)]
7. Липатова Н.А., Лабзина М.В., Лабзина Л.Я. Исследование содержания женских половых гормонов у больных миомой матки // Medicus, 2015. № 2 (2). С. 18-19. [Lipatova N.A., Labzina M.V., Labzina L.Ya. The research of the content of female sex hormones in patients with hysteromyoma. *Medicus* = *Medicus*, 2015, no. 2 (2), pp. 18-19. (In Russ.)]
8. Макацария А.Д. Системные синдромы в акушерско-гинекологической клинике: руководство для врачей. М.: МИА, 2010. 888 с. [Makatsaria A.D. System syndromes in obstetric-gynecological clinic: Guide for physicians]. Moscow: MIA, 2010. 888 p.

9. Никитина Е.С., Рымашевский А.Н., Набока Ю.Л. Особенности микробиоценоза влагалища у женщин позднего репродуктивного возраста при миоме матки // Медицинский вестник Юга России, 2013. № 3. 63-65. [Nikitina E.S., Rymashevskiy A.N., Naboka Yu.L. Features microbiocenosis sheath in women reproductive age with hysteromyoma. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii = Medical Herald of the South of Russia*, 2013, no. 3, pp. 63-65. (In Russ.)]
10. Озерская И.А., Девицкий А.А. Изменения гемодинамики матки, пораженной миомой, у женщин репродуктивного и перименопаузального возраста // Медицинская визуализация, 2014. № 1. С. 70-80. [Ozerskaya I.A., Devitskiy A.A. Hemodynamic changes in the myomas uterus in women of reproductive and premenopausal period. *Meditsinskaya vizualizatsiya = Medical Visualization*, 2014, no. 1, pp. 70-80. (In Russ.)]
11. Радзинский В.Е., Архипова М.П. Миома матки: проблемы и перспективы начала века // Медицинский совет, 2014. № 9. С. 30-33. [Radzinsky V.E., Arkhipova M.P. Uterine fibroids: problems and prospects at the turn of the century. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2014, no. 9, pp. 30-33. (In Russ.)]
12. Рогожина И.Е., Хворостухина Н.Ф. Малоинвазивные технологии и система гемостаза при миоме матки // Саратовский научно-медицинский журнал, 2011. Т. 7, № 3. С. 587-592. [Rogozhina I.E., Khvorostukhina N.F. Lowinvasive technologies and hemostasis system at a hysteromyoma. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2011, Vol. 7, no. 3, pp. 587-592. (In Russ.)]
13. Рогожина И.Е., Хворостухина Н.Ф., Столярова У.В., Нейфельд И.В. Влияние эмболизации маточных артерий на состояние иммунной системы у больных миомой матки // Фундаментальные исследования, 2011. № 9 (2). С. 290-294. [Rogozhina I.E., Khvorostukhina N.F., Stolyarova U.V., Neyfeld I.V. Influence of aa. uterinae embolization on the condition of immune system at patients of the hysteromyoma. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*, 2011, no. 9 (2), pp. 290-294. (In Russ.)]
14. Рогожина И.Е., Хворостухина Н.Ф., Нейфельд И.В., Проданова Е.В. Преимущества эмболизации маточных артерий в хирургическом лечении миомы матки // Лечение и профилактика, 2013. № 2 (6). С. 13-19. [Rogozhina I.E., Khvorostukhina N.F., Neyfeld I.V., Prodanova E.V. The embolization of uterine arteries in surgical treatment of hysteromyoma. *Lechenie i profilaktika = Disease Treatment and Prevention*, 2013, no. 2 (6), pp. 13-19. (In Russ.)]
15. Сидорова И.С., Унанян А.Л., Агеев М.Б., Ведерникова Н.В., Жолобова М.Н. Современное состояние вопроса о патогенезе, клинике, диагностике и лечении миомы матки у женщин репродуктивного возраста // Акушерство, гинекология и репродукция, 2012. Т. 6, № 4. С. 22-28. [Sidorova I.S., Unanyan A.L., Ageev M.B., Vedernikova N.V., Zholobova M.N. Current status of the pathogenesis, clinical features, diagnosis, and treatment. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduksiya = Obstetrics, Gynecology, and Reproduction*, 2012, Vol. 6, no. 4, pp. 22-28. (In Russ.)]
16. Тихомиров А.Л. Современные принципы терапевтического лечения миомы матки // Эффективная фармакотерапия, 2015. № 5. С. 56-60. [Tikhomirov A.L. Modern principles of therapeutic treatment of uterine fibroids. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2015, no. 5, pp. 56-60. (In Russ.)]
17. Тихомиров А.Л. Расширение возможностей органосохраняющего лечения миомы матки с использованием улипристала ацетата // Гинекология, 2016. Т. 18, № 1. С. 56-60. [Tikhomirov A.L. Empowering organ-preserving treatment of uterine fibroids using ulipristal acetate. *Ginekologiya = Gynecology*, 2016, Vol. 18, no. 1, pp. 56-60. (In Russ.)]
18. Хворостухина Н.Ф., Островская А.Е., Рогожина И.Е., Новичков Д.А., Степанова Н.Н. Особенности маточной гемодинамики и системы гемостаза при миоме, осложненной геморрагическим синдромом // Акушерство и гинекология, 2016. № 6. С. 87-93. [Khvorostukhina N.F., Ostrovskaya A.E., Rogozhina I.E., Novichkov D.A., Stepanova N.N. The specific features of uterine hemodynamics and hemostatic system in myoma complicated by hemorrhagic syndrome. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2016, no. 6, pp. 87-93. (In Russ.)]
19. Cain-Nielsen A.H., Moriarty J.P., Stewart E.A., Borah B.J. Cost-Effectiveness of Uterine-Preserving Procedures for the Treatment of Uterine Fibroid Symptoms in the United States. *J. Comp. Eff. Res.*, 2014, Vol. 3, no. 5, pp. 503-514.
20. Donnez J., Vázquez F., Tomaszewski J., Nouri K., Bouchard P., Fauser B.C., Barlow D.H., Palacios S., Donnez O., Bestel E., Osterloh I., Loumaye E. Long-term treatment of uterine fibroids with ulipristal acetate. *Fertil. Steril*, 2014, Vol. 101, no. 6, pp. 1565-1573.
21. Engman M., Granberg S., Williams A.R., Meng C.X., Lalitkumar P.G., Gemzell-Danielsson K. Mifepristone for treatment of uterine leiomyoma. A prospective randomized placebo controlled trial. *Human Reproduction*, 2009, Vol. 1, no. 1, pp. 1-10.
22. Jiang X., Thapa A., Lu J., Bhujohory V.S., Liu Y., Qiao S. Ultrasound-guided transvaginal radiofrequency myolysis for symptomatic uterine myomas. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2014, no. 177, pp. 38-43.

23. Khan A.T., Shehmar M., Gupta J.K. Uterine fibroids: current perspectives. *Int. J. Women's Health*, 2014, no. 6, pp. 95-114.
24. Yoo E.H., Lee P.I., Huh C.Y., Kim D.H., Lee B.S., Lee J.K., Kim D. Predictors of leiomyoma recurrence after laparoscopic myomectomy. *J. Minim. Invasive Gynecol.*, 2007, Vol. 14, no. 6, pp. 690-697.

Авторы:

Хворостухина Н.Ф. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Островская А.Е. — аспирант кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Новичков Д.А. — к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Степанова Н.Н. — ассистент кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Authors:

Khvorostukhina N.F., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, OBGYN Department, Saratov State V.I. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Ostrovskaya A.E., Postgraduate Student, OBGYN Department, Saratov State V.I. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Novichkov D.A., PhD (Medicine), Associate Professor, OBGYN Department, Saratov State V.I. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Stepanova N.N., Assistant Professor, OBGYN Department, Saratov State V.I. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Поступила 21.02.2017
Отправлена на доработку 14.03.2017
Принята к печати 02.05.2017

Received 21.02.2017
Revision received 14.03.2017
Accepted 02.05.2017

ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОКИНОВОЙ АКТИВНОСТИ И УРОВНЯ ПРОДУКЦИИ β -ЭНДОРФИНА ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ НА ФОНЕ АСТЕНО-НЕВРОТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, У МУЖЧИН МОЛОДОГО ВОЗРАСТА ИЗ ГРУППЫ НАПРЯЖЕННЫХ ПРОФЕССИЙ

Герцев А.В.^{1,2}, Ищук В.Н.^{1,2}, Закревский Ю.Н.³

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

² Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

³ Объединенное стратегическое командование «Север», Россия

Резюме. В настоящее время гипертоническая болезнь является наиболее распространенной соматической патологией среди лиц молодого и трудоспособного возраста. Особой проблемой является развитие и прогрессирование артериальной гипертензии у лиц молодого возраста напряженных специальностей. У таких больных, на фоне хронического стресса, как правило, часто возникают эмоциональные нарушения в виде тревоги и депрессии. Прямое патофизиологическое воздействие тревожно-депрессивных расстройств на сердечно-сосудистую систему способствует развитию нарушений со стороны основных регуляторных процессов и опасных для жизни клинических форм ишемической болезни сердца и гипертонической болезни. Однако, несмотря на наличие достаточного количества данных о влиянии тревожно-депрессивных нарушений на течение кардиологической патологии, тем не менее открытыми остаются вопросы степени изменений со стороны нейропептидно-цитокинового пула иммунной системы у лиц молодого возраста с артериальной гипертензией из группы напряженных специальностей. Кроме того, стоит проблема минимальной изученности вопросов взаимозависимости изменений в функционировании основных регуляторных систем (вегетативной нервной и иммунной) у таких больных.

В связи с чем целью данной работы явилось изучение цитокиновой активности иммунной системы и уровня продукции β -эндорфина при артериальной гипертензии, протекающей на фоне астено-невротических нарушений, у мужчин молодого возраста из группы напряженных профессий, а также исследование характера взаимовлияний между показателями функционирования надсегментарной области вегетативной нервной системы и иммунитетом у этих больных. Были сформированы группы: 1-я (n = 34) – больные с артериальной гипертензией и астено-невротическими нарушениями; 2-я (n = 20) – пациенты с артериальной гипертензией без психологических нарушений, острых и хронических стрессов в анамнезе (контроль). Нейропептидно-цитокиновый пул иммунной системы исследовали по уровню содержания в сыворотке крови цитокинов провоспалительного (TNF α , IL-1 β , IL-6) и противовоспалительного (IL-4, IL-10) спектра, а также β -эндорфина.

В ходе проведенного клинико-лабораторного обследования авторами установлено, что у пациентов с артериальной гипертензией и астено-невротическими нарушениями, имеет место активация уровня провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-6), подавление противовоспалительных ци-

Адрес для переписки:

Герцев Алексей Владимирович
Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова
195220, Россия, Санкт-Петербург, ул. Гжатская, 5,
корп. 3, кв. 177.
Тел.: 8 (904) 600-87-86.
E-mail: starcom50@mail.ru

Address for correspondence:

Gertsev Alexei V.
S. Kirov Military Medical Academy
195220, Russian Federation, St. Petersburg, Gzhatskaya str., 5,
bldg 3, apt 177.
Phone: 7 (904) 600-87-86.
E-mail: starcom50@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Герцев, В.Н. Ищук, Ю.Н. Закревский «Показатели цитокиновой активности и уровня продукции β -эндорфина при артериальной гипертензии, протекающей на фоне астено-невротических нарушений, у мужчин молодого возраста из группы напряженных профессий» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 749–754.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-749-754

© Герцев А.В. и соавт., 2017

For citation:

A.V. Gertsev, V.N. Ischuk, Yu.N. Zakrevsky "Indicators of cytokine activity and beta-endorphin production level in arterial hypertension associated with asthenic/neurotic disorders in young men employed in stressful professions", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 749–754.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-749-754

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-749-754

токинов (IL-4, IL-10), а также снижение β -эндорфина в крови. Кроме того, выявлены нарушения во взаимодействии между вегетативной нервной и иммунной системами у этих больных.

Ключевые слова: гипертензия, астения, β -эндорфин, цитокин, интерлейкин, воспаление

INDICATORS OF CYTOKINE ACTIVITY AND BETA-ENDORPHIN PRODUCTION LEVEL IN ARTERIAL HYPERTENSION ASSOCIATED WITH ASTHENIC/NEUROTIC DISORDERS IN YOUNG MEN EMPLOYED IN STRESSFUL PROFESSIONS

Gertsev A.V.^{a, b}, Ischuk V.N.^{a, b}, Zakrevsky Yu.N.^c

^a S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

^b A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c The Northern Joint Strategic Command, Russian Federation

Abstract. At the present time, arterial hypertension is the most common somatic pathology among young and able-bodied persons. Development and progression of hypertension in young people occupied with stressful jobs presents a particular problem. Anxiety and depression arise quite commonly in such persons subjected to chronic stress. Direct pathophysiological effects of anxiety and depressive disorders upon cardiovascular system leads to development of disturbances of basic regulatory processes and life-threatening clinical forms of ischemic heart disease and hypertension. However, despite sufficient data about the impact of anxiety and depressive disorders on the course of cardiac pathology, some open questions remain concerning the degree of changes in neuropeptide-cytokine pool of immune system in young, intensively working hypertensive patients. Moreover, there is lack of knowledge concerning interdependence in functioning of the major regulatory systems (autonomic nervous and immune) in such patients.

In this connection, the aim of this work was to study cytokines of the immune system, and the levels of beta-endorphin production in hypertension, proceeding with asthenic-neurotic disorders in young men of intensive specialties, as well as study of interactions between the indices of autonomic nervous system functioning, and immunity parameters in these patients. The following groups were under study: 1st (n = 34) included patients with hypertension and asthenic-neurotic problems; 2nd (n = 20), patients with hypertension without psychological disorders, with acute or chronic stress in previous history (controls). Neuropeptide-cytokine profile of the immune system was evaluated by levels of proinflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6), antiinflammatory cytokines (IL-4, IL-10), and β -endorphin.

In the course of clinical and laboratory examination, we have found that, in the patients with hypertension and asthenic-neurotic disorders, activation of proinflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6), suppression of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10), and reduced β -endorphin in the blood are registered. Moreover, the disturbances detected showed the mutual interactions between autonomic nervous and immune systems in these patients.

Keywords: hypertension, asthenia, β -endorphin, cytokine, interleukin, inflammation

Введение

В настоящее время гипертоническая болезнь (ГБ) является наиболее распространенной соматической патологией среди лиц молодого и трудоспособного возраста [2]. Особой проблемой является развитие и прогрессирование ГБ у лиц молодого возраста напряженных специальностей [1]. У таких пациентов основными факторами риска, участвующими в формировании артериальной гипертензии (АГ), являются психические и эмоциональные перенапряжения [3]. Психологический статус у пациентов молодого возраста с АГ, подвергающихся хроническому стрессу, характеризуется как смешанный тип реагирования, для которого характерно общее перенапряжение

и соматизация внутреннего конфликта (психосоматический вариант дезадаптации) [15]. У этих больных, как правило, часто возникают эмоциональные нарушения в виде тревоги и депрессии [12]. С усилением психических расстройств симптомы основного заболевания уходят на второй план, а ведущее место начинает занимать аффективная патология [11]. Депрессивные и тревожные расстройства являются неблагоприятным прогностическим фактором, утяжеляют течение сердечно-сосудистой патологии, способствуют прогрессированию атеросклеротических процессов и приводят к более раннему возникновению осложнений — острого инфаркта миокарда и инсульта [13]. Прямое патофизиологическое воздействие тревожно-депрессивных расстройств

на сердечно-сосудистую систему способствует развитию нарушений со стороны основных регуляторных процессов и опасных для жизни клинических форм ишемической болезни сердца (ИБС) и ГБ [4].

Несмотря на наличие достаточного количества данных о влиянии тревожно-депрессивных нарушений на течение кардиологической патологии, тем не менее открытыми остаются вопросы степени изменений со стороны нейропептидно-цитокинового пула иммунной системы, являющегося одним из важных эффекторных звеньев патогенеза при сердечно-сосудистых заболеваниях, у пациентов с АГ, подвергшихся хроническому стресс-индуцированному воздействию в период профессиональной деятельности. Кроме того, на сегодняшний день стоит также проблема минимальной изученности вопросов взаимозависимости изменений в функционировании основных регуляторных систем (вегетативной нервной [ВНС] и иммунной) у таких больных.

В связи с чем **целью данной работы** явилось изучение цитокиновой активности иммунной системы и уровня продукции β-эндорфина при АГ, протекающей на фоне астено-невротических нарушений, у мужчин молодого возраста из группы напряженных профессий, а также исследование характера взаимовлияний между показателями функционирования надсегментарной области ВНС и иммунитетом у этих больных.

Материалы и методы

Провели клинко-лабораторное обследование 54 больных (мужчин) в возрасте от 30 до 45 лет со средним возрастом ($34,0 \pm 8,4$) лет. У 34 обследуемых (основная группа) имелась впервые выявленная ГБ I и II стадии (I10 по МКБ – 10) и астено-невротическое расстройство с тревожными и депрессивными проявлениями (F48 по МКБ – 10). Контрольную группу (КГ) составили 20 пациентов с ГБ I и II стадии без психологических нарушений, острых и хронических стрессов в анамнезе.

Длительность наблюдения за больными была ($14 \pm 2,6$) сут.

Для решения цели исследования нами сформированы группы:

1-я ($n = 34$) – больные с АГ и астено-невротическими нарушениями.

2-я ($n = 20$) – контроль.

Критерием исключения являлись пациенты с активным воспалительным процессом, онкологическими заболеваниями и с заболеваниями иммунной системы.

В группах обследования цитокиновый профиль и уровень продукции β-эндорфина исследовали в лабораторных условиях *in vitro* методом иммуноферментного анализа с применением

тест-систем как отечественного, так и зарубежного производства. Применяли тест-системы фирмы BioSource International (Калифорния, США) для определения в сыворотке крови IL-1β, IL-4, и фирмы ProCon (Санкт-Петербург, Россия) – TNFα, IL-6, IL-10. Показатели продукции β-эндорфина определяли с использованием тест-систем фирмы BioSource International (Калифорния, США). Чувствительность тест-систем для определения цитокинов – 2 пг/мл, β-эндорфина – 0,04-0,06 пг/мл.

Исследования проводили в клинике военно-морской терапии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, углубленное лабораторное обследование – в научно-исследовательской лаборатории клеточного и гуморального иммунитета Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России (Санкт-Петербург).

Математическую обработку данных исследования осуществили на IBM-совместимом персональном компьютере. Электронная база данных создана в программной среде Microsoft Excel – 2003-2007, статистический анализ выполнен с помощью пакета прикладных программ Statistica for Windows v. 6.0 (StatSoft, США). Предварительно оценивали соответствие исследуемых выборок закону нормального распределения. Определяли среднее арифметическое и его стандартное отклонение ($M \pm SD$), 95%-доверительный интервал для среднего ($M \pm m$). Кроме того, провели оценку качественных и количественных парных корреляционных связей между показателями продукции β-эндорфина, провоспалительных (TNFα, IL-1β, IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов. Оценивались взаимосвязи при коэффициенте корреляции $r < 0,3$ как слабые, $0,3 < r < 0,4$ как средние, $0,4 < r < 0,7$ как умеренные и $r > 0,7$ как сильные.

Результаты

Состояние иммунной системы

После проведения клинко-лабораторных исследований выявлено изменение уровня содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у пациентов молодого возраста с АГ, протекающей с астено-невротическими нарушениями (табл. 1).

Установлено, что уровень продукции TNFα, IL-1β, IL-6 у пациентов 1-й группы значимо превышали аналогичные показатели группы 2 (контроль) ($p < 0,05$). Показатели продукции IL-4 и IL-10 ($p < 0,05$) в 1-й группе обследуемых были значимо ниже по отношению к контрольной группе, что свидетельствует о низкой противовоспалительной активности в этой группе больных.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значимых изменениях в цитокиновом пуле иммунной системы у пациентов мо-

ТАБЛИЦА 1. ВЕЛИЧИНА ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ, $M \pm SD$ (пг/мл)

TABLE 1. THE PRODUCTION OF CYTOKINES, $M \pm SD$ (pg/ml)

Показатель Index	Группы обследуемых Groups of subjects		P values
	1-я 1 st	2-я 2 nd	
TNF α	18,7 $\pm$ 6,1	10,4 $\pm$ 1,8	< 0,05
IL-1 β	2,8 $\pm$ 1,3	2,2 $\pm$ 1,1	< 0,05
IL-6	9,3 $\pm$ 1,7	4,3 $\pm$ 1,2	< 0,05
IL-4	4,3 $\pm$ 1,6	6,3 $\pm$ 1,2	< 0,05
IL-10	18,2 $\pm$ 7,1	27,2 $\pm$ 5,3	< 0,05

лодого возраста с АГ и астено-невротическими нарушениями, в виде увеличения уровня продукции провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6) и уменьшения противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов, по сравнению с группой контроля.

Состояние вегетативной регуляции

У пациентов с АГ и астено-невротическими нарушениями установили изменение активности надсегментарной области ВНС, что отражается низким уровнем содержания β -эндорфина (табл. 2).

Уровень β -эндорфина у больных с АГ и астено-невротическими нарушениями значительно отличался от таковых показателей группы контроля ($p < 0,001$) и по своим значениям был ниже в 2,5 раза в сравнении с контролем.

Взаимосвязи показателей функционирования надсегментарного аппарата ВНС и цитокинового пула иммунной системы

Выявлено следующее (табл. 3):

— в 1-й группе установлены прямые корреляционные связи умеренной силы между уровнем β -эндорфина и TNF α ($p < 0,01$), IL-1 β ($p < 0,01$), IL-6 ($p < 0,01$). Прямые корреляционные связи слабой силы между значениями уровня β -эндорфина и IL-4 ($p < 0,01$), а также IL-10 ($p < 0,01$);

— в группе контроля были определены прямые сильные корреляционные связи между уровнем β -эндорфина и TNF α ($p < 0,01$), IL-1 β ($p < 0,01$), IL-10 ($p < 0,01$). Прямые корреляционные связи умеренной силы между значениями уровня β -эндорфина и IL-6 ($p < 0,01$), а также IL-4 ($p < 0,01$).

Обсуждение

Анализ показателей, характеризующих состояние иммунной системы у больных с АГ и астено-невротическими нарушениями, позволил определить повышение показателей, отражающих активность воспаления — провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-6) и угнетение

ТАБЛИЦА 2. ВЕЛИЧИНА ПРОДУКЦИИ β -ЭНДОРФИНА, $M \pm SD$ (пг/мл)

TABLE 2. SERUM β -ENDORPHIN CONCENTRATIONS, $M \pm SD$ (pg/ml)

Показатель Index	Группы обследуемых Groups of subjects		P values
	1-я 1 st	2-я 2 nd	
β -эндорфин β -endorphin	1927,12 $\pm$ 624,84	4548,61 $\pm$ 1081,52	< 0,05

ТАБЛИЦА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРНЫХ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НАДСЕГМЕНТАРНОГО АППАРАТА ВНС И ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ГРУППАХ ОБСЛЕДУЕМЫХ

TABLE 3. CHARACTERISTIC OF PAIRED CORRELATIONS BETWEEN THE INDICES OF AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM AND IMMUNE SYSTEM FUNCTIONING IN THE GROUPS OF SUBJECTS

Цитокины Cytokines	Уровень продукции β -эндорфина Levels of β -endorphin production		
	Группы обследуемых Groups of subjects		P values
	1-я 1 st	2-я 2 nd	
TNF α	0,67	0,76	< 0,01
IL-1 β	0,58	0,74	< 0,01
IL-6	0,66	0,68	< 0,01
IL-4	0,28	0,66	< 0,01
IL-10	0,22	0,73	< 0,01

Примечание. В таблице представлены силы корреляционных связей в виде числовых величин между показателями продукции β -эндорфина, провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов у пациентов 1-й и 2-й групп, а также достоверность различий между этими связями ($p < 0,01$) в группах обследуемых.

Note. The table presents correlation forces as numerical values between the indices of β -endorphin production, pro-inflammatory (TNF α , IL-1 β , IL-6) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines in the patients from groups 1 and 2, as well as significance of the differences between these links ($p < 0.01$) in the groups under study.

продукции противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10).

Полученные нами данные в ходе проведенного исследования свидетельствуют о высокой иммуновоспалительной активности при АГ, протекающей на фоне астено-невротических нарушений, у мужчин молодого возраста из группы напряженных профессий

При исследовании функций надсегментарной области ВНС у больных с АГ и астено-невротическими нарушениями выявлено снижение уровня

продукции β -эндорфина. Эти результаты свидетельствуют о нарушении механизмов вегетативной регуляции у пациентов молодого возраста с АГ и астено-невротическими нарушениями.

Снижение продукции β -эндорфина приводит к формированию астенического синдрома, расстройствам вегетативной регуляции функций иммунной системы и снижению компенсаторно-приспособительных возможностей миокарда при острых повреждениях [9]. Уровень провоспалительных и противовоспалительных цитокинов находится под тесным контролем ВНС. Основными белками ВНС, регулирующими функции иммунной системы в норме, при соматической патологии и психических нарушениях, являются эндогенные нейропептиды опиоидного происхождения (эндорфины, энкефалины) [6]. Отмечена сильная способность β -эндорфина регулировать продукцию цитокинов при развитии воспалительных процессов на системном уровне при стрессе и депрессивных нарушениях [5, 8]. β -эндорфин участвует в формировании устойчивой противовоспалительной активности при прогрессировании иммунного воспаления и тем самым поддерживает компенсаторно-приспособительный характер иммунной системы при неблагоприятных внешних и внутренних условиях [7, 10]. Следовательно, снижение уровня продукции β -эндорфина в периферической крови приведет к повышению активности провоспалительных и подавлению противовоспалительных цитокинов, что будет способствовать неблагоприятному течению и прогрессированию основного патологического процесса при соматической патологии.

При сравнении парных корреляционных связей между показателями, характеризующими функционирование вегетативной нервной и иммунной систем, у больных с АГ и астено-невротическими нарушениями были установлены корреляционные связи умеренной и слабой силы между уровнем продукции β -эндорфина, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что позволяет объективизировать десинхронизацию в функционировании вегетативной нервной и иммунной систем в этой группе обследуемых. В группе контроля между показателями, характеризующими функционирование вегетативной нервной и иммунной систем, были выявлены только сильные и умеренные корреляционные связи, что свидетельствует о стойком взаимовлиянии и взаимодействии между этими регуляторными системами.

Таким образом, выявлены различия в регуляторном портрете, маркируемом корреляционными связями показателей, характеризующих состояние надсегментарной области вегетативной нервной и иммунной систем у больных с АГ и астено-невротическими нарушениями. Различия в регуляторном портрете обусловлены десинхронизацией в функционировании вегетативной нервной и иммунной систем, сопровождающейся перестройкой регуляторных взаимодействий на уровне нейропептидно-цитокинного звена иммунитета, что способствует прогрессированию основного патологического процесса и неблагоприятному течению ГБ у специалистов молодого возраста с АГ и астено-невротическими нарушениями, длительно подвергающихся воздействию стресса в период профессиональной деятельности.

Список литературы / References

1. Белевитин А.Б., Никитин А.Э., Шамрей В.К., Курасов Е.С. Психические нарушения при гипертонической болезни у военнослужащих молодого возраста // Военно-медицинский журнал, 2010. № 4. С. 7-13. [Belevitin A.B., Nikitin A.E., Shamrei V.K., Kurasov E.S. Mental disorders in hypertension in young military personnel. *Voenno-meditsinskiy zhurnal = Military Medical Journal*, 2010, no. 4, pp. 7-13. (In Russ.)]
2. Давидович И.М., Афонасков О.В. Артериальная гипертензия у мужчин молодого возраста, офицеров сухопутных войск: психофизиологические особенности // Вестник Росздравнадзора, 2012. № 5. С. 53-57. [Davidovich I.M., Afonaskov O.V. Arterial hypertension in young men, army officers: psychophysiology aspects. *Vestnik Roszdravnadzora = Journal Vestnik Roszdravnadzora*, 2012, no. 5, pp. 53-57. (In Russ.)]
3. Довженко Т.В. Взаимосвязь аффективных и сердечно-сосудистых расстройств // Социальная и клиническая психиатрия, 2005. Т. 15, № 3. С. 69-80. [Dovzhenko T.V. The relationship of mood and cardiovascular disorders. *Sotsialnaya i klinicheskaya psikiatriya = Russian Society of Psychiatrists*, 2005, Vol. 15, no. 3, pp. 69-90. (In Russ.)]
4. Васюк Ю.А., Довженко Т.В. Особенности патогенетической взаимосвязи депрессии и сердечно-сосудистых заболеваний // Психические расстройства в общей медицине, 2007. Т. 2, № 1. С. 1-11. [Vasyuk Yu.A., Dovzhenko T.V. Features pathogenetic relationship of depression and cardiovascular diseases. *Psikhicheskie rasstroystva v obshchey meditsine = Mental Disorders in General Medicine*, 2007, Vol. 2, no. 1, pp. 1-11. (In Russ.)]
5. Гейн С.В., Баева Т.А. Роль опиоидных пептидов в регуляции пролиферации лимфоцитов и изменении Th1/Th2 цитокинового профиля // Проблемы эндокринологии, 2005. Т. 51, № 5. С. 49-51. [Gein S.V., Baeva T.A. Role of opioid peptides in the regulation of lymphocyte proliferation and the change of Th1/Th2 cytokine profile. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2005, Vol. 51, no. 5, pp. 49-51. (In Russ.)]
6. Гейн С.В., Баева Т.А. Эндогенные опиоидные пептиды в регуляции функций клеток врожденного иммунитета обзор // Биохимия, 2006. Т. 76, № 3. С. 379-390. [Gein S.V., Baeva T.A. Endogenous opioid peptides in the regulation of functions of innate immunity cells overview. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2006, Vol. 76, no. 3, pp. 379-390. (In Russ.)]

7. Гейн С.В., Горшкова К.Г., Тендрякова С.П. Роль бета-эндорфина в регуляции продукции провоспалительных цитокинов моноцитами периферической крови *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2007. № 2. С. 175-178. [Gein S.V., Gorshkov K.G., Tendryakova S.P. The role of beta-endorphin in the regulation of the production of proinflammatory cytokines by monocytes *in vitro* peripheral blood. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2007, no. 2, pp. 175-178. (In Russ.)]
8. Гейн С.В., Шаравьева И.Л., Тендрякова С.П. Роль δ -опиатных рецепторов в регуляции гуморального клеточно-опосредованного иммунного ответа при ротационном стрессе // Доклады академии наук, 2006. Т. 407, № 1. С. 127-129. [Gein S.V., Sharaveva I.L., Tendryakova S.P. The role of delta-opioid receptors in the regulation of cell-mediated humoral immune response in a rotary stress. *Doklady akademii nauk* = *Proceedings of the Academy of Sciences*, 2006, Vol. 407, no. 1, pp. 127-129. (In Russ.)]
9. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. Томск: Издательство Томского университета, 1994. 352 с. [Lishmanov Yu.B., Maslov L.N. Opioid neuropeptides, stress and adaptation of heart protection]. Tomsk: Publishing House of Tomsk State University, 1994. 352 p.
10. Горшкова К.Г., Гейн С.В., Тендрякова С.П. Роль бета-эндорфина в регуляции продукции IL-1 β и IL-8 моноцитами и нейтрофилами периферической крови // Вестник уральской медицинской академической науки, 2006. Т. 14, № 3. С. 46-47. [Gorshkov K.G., Gein S.V., Tendryakova S.P. The role of beta-endorphin production in the regulation of IL-1 β and IL-8 by monocytes and neutrophils peripheral blood. *Vestnik yralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki* = *Journal of Ural Medical Academic Science*, 2006, Vol. 14, no. 3, pp. 46-47. (In Russ.)]
11. Парцерняк С.А. Интегративная медицина: путь от идеологии к методологии здравоохранения. – СПб.: Нордмедиздат, 2007. 424 с. [Parcernyak S.A. Integrative Medicine: the path from ideology to the methodology of Health]. St. Petersburg: Nordmedizdat, 2007. 424 p.
12. Симоненко В.Б., Фисун А.Я., Овчинников Ю.В., Александров А.С. Артериальная гипертония при экстремальных ситуациях // Клиническая медицина, 2007. Т. 85, № 10. С. 4-10. [Simonenko V.B., Fisun A.Ya. Ovchinnikov Yu.V., Alexandrov A.S. Hypertension in extreme situations. *Klinicheskaya meditsina* = *Clinical Medicine (Russian Journal)*, 2007, Vol. 85, no. 10, pp. 4-10. (In Russ.)]
13. Смуглевич А.Б. Психокardiология. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. 780 с. [Smulevich A.B. Psihokardiologiya]. Moscow: Medical News Agency, 2005. 780 p.
14. Черешнев В.А., Гейн С.В. β -эндорфин – эндогенный регулятор иммунных процессов // Российский физиологический журнал им. Сеченова, 2009. Т. 95, № 12. С. 1279-1290. [Chereshnev V.A., Gein S.V. β -endorphin – an endogenous regulator of immune processes. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. Sechenova* = *Russian Journal of Physiology*, 2009, Vol. 95, no. 12, pp. 1279-1290. (In Russ.)]
15. Шпагина Л.А., Ермакова М.А., Волкова Е.А., Яковлева С.А. Клинико-функциональная и биохимическая характеристика артериальной гипертензии у военнослужащих в условиях хронического стресса // Медицина труда и промышленная экология, 2008. № 7. С. 24-29. [Shpagin L.A. Ermakova M.A., Volkova E.A., Yakovleva S.A. Clinical and functional and biochemical characteristics of hypertension in the military in conditions of chronic stress. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya* = *Occupational Medicine and Industrial Ecology*, 2008, no. 7, pp. 24-29. (In Russ.)]

Авторы:

Герцев А.В. — к.м.н., слушатель ординатуры факультета руководящего медицинского состава Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова; научно-исследовательская лаборатория клеточного и гуморального иммунитета, Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Ищук В.Н. — к.м.н., доцент кафедры курортологии и физиотерапии (с курсом медицинской реабилитации) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова; научно-исследовательская лаборатория клеточного и гуморального иммунитета, Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Закревский Ю.Н. — д.м.н., начальник медицинской службы Объединённого стратегического командования «Север», Россия

Authors:

Gertsev A.V., PhD (Medicine), Resident Physician, Managing Staff Faculty, S. Kirov Military Medical Academy; Research Laboratory of Cellular and Humoral Immunity, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ischuk V.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Chair of Balneology, Physiotherapy and Rehabilitation, S. Kirov Military Medical Academy; Research Laboratory of Cellular and Humoral Immunity, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Zakrevsky Yu.N., PhD, MD (Medicine), Chief Medical Officer, The Northern Joint Strategic Command, Russian Federation

Поступила 06.03.2017

Отправлена на доработку 14.03.2017

Принята к печати 15.03.2017

Received 06.03.2017

Revision received 14.03.2017

Accepted 15.03.2017

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ HLA-DRB1 И DQB1 У ДЕТЕЙ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

Старшинова А.А.^{1,2}, Беркос А.С.³, Ватутина В.А.¹,
Овчинникова Ю.Э.¹, Соколова Ю.В.³, Довгалюк И.Ф.¹, Бубнова Л.Н.^{3,4},
Яблонский П.К.^{1,2}

¹ ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. До настоящего времени нет четкого понимания причин возникновения генерализации инфекции у детей. Генерализация инфекции также может быть обусловлена особенностями иммунного ответа, который определяется и генетическими маркерами.

Цель исследования — изучить особенности распределения аллелей HLA-DRB1 и HLA-DQB1 у детей с генерализованным туберкулезом.

Обследовано 40 детей в возрасте от 1 до 15 лет с генерализованным туберкулезом. После проведения стандартного фтизиатрического комплекса обследования с включением молекулярно-генетических методов диагностики операционного материала, МСКТ, иммунологических методов выполнено HLA-DRB1 и DQB1 типирование. Проведено сравнение распределения аллелей HLA-DRB1 и DQB1 с группой здоровых доноров ($n = 100$).

У пациентов основной группы и группы сравнения не найдено достоверных различий в распределении аллелей HLA-DQB1, тогда как при сравнении результатов типирования по локусу HLA-DRB1 отмечается достоверно низкая встречаемость HLA-DRB1*01 (12,5% против 31,0%, $\chi^2 = 4,08$; $p < 0,05$), который может считаться протективным, а также повышенная частота HLA-DRB1*14 (7,5% против 1,0%, $\chi^2 = 3,67$, $p < 0,05$), что свидетельствует о его предрасполагающей роли. Кроме того, в фенотипе пациентов по сравнению с контролем выявлены достоверные различия в частоте встречаемости отдельных аллельных сочетаний, что также подтверждает ключевую роль иммуногенетических факторов в развитии и характере течения туберкулеза.

Выводы: полученные данные свидетельствуют о важной роли иммуногенетических факторов, в частности HLA-DRB1, DQB1 фенотипа, в предрасположенности к развитию генерализованной формы туберкулеза у детей, а также о целесообразности дальнейших исследований в этом направлении.

Ключевые слова: дети, аллели, туберкулезная инфекция, генерализованный туберкулез, иммуногенетика

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.А. Старшинова, А.С. Беркос, В.А. Ватутина, Ю.Э. Овчинникова, Ю.В. Соколова, И.Ф. Довгалюк, Л.Н. Бубнова, П.К. Яблонский «Особенности распределения аллелей HLA-DRB1 и DQB1 у детей с генерализованным туберкулезом» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 755–762. doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-755-762

For citation:

A.A. Starshinova, A.S. Berkos, V.A. Vatutina, Yu.E. Ovchinnikova, Yu.V. Sokolova, I.F. Dovgalyuk, L.N. Bubnova, P.K. Yablonskiy "Features of HLA-DRB1 and DQB1 alleles distribution in children with generalized tuberculosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 755–762. doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-755-762

FEATURES OF HLA-DRB1 AND DQB1 ALLELES DISTRIBUTION IN CHILDREN WITH GENERALIZED TUBERCULOSIS

Starshinova A.A.^{a,b}, Berkos A.S.^c, Vatutina V.A.^a, Ovchinnikova Yu.E.^a, Sokolova Yu.V.^c, Dovgalyuk I.F.^a, Bubnova L.N.^{c,d}, Yablonskiy P.K.^{a,b}

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

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

^c Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. So far, there is no clear understanding for the reasons causing tuberculosis generalization in children. Development of generalized infection could be also determined by some features of immune response which may depend on genetic markers. The aim of our work was to study the features of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 allele distribution in children with generalized tuberculosis (gTBC). Materials and methods: we have observed 40 children at the age of 1 to 15 years suffering from gTBC. After performing a standard phthisiatric examination, including molecular-genetic diagnostics of surgical material, multispiral CT, immunological testing, as well as HLA-DRB1 and DQB1 alleles. We have studied distribution of the HLA-DRB1 and DQB1 alleles comparing it with a group of healthy donors (n = 100).

The results did not show significant differences in HLA-DQB1 allele distribution between the gTBC patients and comparison group. Meanwhile, when comparing genotypes for HLA-DRB1 loci, we have revealed a significantly lower prevalence of the *01 allele of HLA-DRB1 (12.5% versus 31.0%; $\chi^2 = 4.08$; $p < 0.05$), which could be considered a predisposing factor, as well as a higher incidence of *14 allele (7.5% against 1.0%; $\chi^2 = 3.67$, $p < 0.05$) of HLA-DRB1 gene, thus suggesting its protective role.

Conclusions: we did not find any significant differences for HLA-DQB1 distribution between pediatric patients with generalized tuberculosis and healthy donors, whereas *01 allele of HLA-DRB1 may predispose for gTBC, and the *14 allele could be protective in evolving generalized tuberculosis in children.

Keywords: children, alleles, tuberculosis infection, generalized tuberculosis, immunogenetics

Введение

По данным ВОЗ, туберкулезом болеет более миллиона человек в год. Так, в 2014 году впервые заболевание было диагностировано у 9,6 миллионов человек, а 1,5 миллиона умерло от туберкулезной инфекции, в том числе 140 000 детей [11].

Заболеемость туберкулезом детей имеет особенное значение, так как она отражает эпидемическую ситуацию в регионе в целом [2]. В последние годы отмечается некоторая стабилизация и снижение показателей заболеваемости и смертности от туберкулеза, что приводит к снижению числа впервые выявленных детей с туберкулезной инфекцией. Показатель заболеваемости туберкулезом детей в возрасте от 0 до 14 лет уменьшился за последние годы на 7,7% (2013 – 14,3; 2014 – 13,2; 2015 – 12,4, 2016 – 11,5 на 100 000 детей) [3, 7]. Ведущей формой туберкулеза по-прежнему остается туберкулез внутригрудных лимфатических узлов, который диагностируется в 75-76% случаев. Генерализованные формы заболевания встречаются значительно реже, что обусловлено общим снижением заболеваемости. Внелегочные локализации регистрируются в 4,6% случаев

в зависимости от возрастной группы (от 3,7% – в возрасте от 7 до 14 лет и до 5,9% – от 0 до 4 лет), при этом его доля за последние 15-16 лет имеет тенденцию к уменьшению [4, 5, 7]. До настоящего времени нет четкого понимания причин возникновения генерализации инфекции у детей.

Развитие инфекционного процесса определяется не только свойствами возбудителя, но и способностью макроорганизма формировать адекватный иммунный ответ, что в свою очередь обусловлено иммуногенетическими особенностями организма [10]. В настоящее время установлена важная роль генетической предрасположенности организма к развитию различных заболеваний, в том числе и инфекционных [8]. В частности, имеются доказательства взаимосвязи HLA-DRB1 фенотипа с характером иммунного ответа у больных с диссеминированным туберкулезом легких [1]. Предполагается, что отдельные HLA-специфичности могут определять характер течения туберкулезной инфекции у детей и подростков, выявлены предрасполагающие и резистентные аллели гена HLA-DRB1 [6, 9]. Генерализация инфекции также обусловлена особенностями иммунного ответа. Вместе с тем механизмы, обеспечивающие реализацию иммуногенетической предрасположенности к развитию генерализованных форм туберку-

леза при внедрении *M. bovis* BCG и *M. Tuberculosis*, в настоящее время остаются неясными. Исследование HLA-DRB1 и DQB1 фенотипа может выявить аллели, ассоциированные с развитием генерализованных форм туберкулеза у детей, что послужило основанием для настоящего исследования. Цель исследования - изучить особенности распределения аллелей HLA-DRB1 и DQB1 у детей с генерализованным туберкулезом.

Авторы выражают благодарность Северо-Западному банку ПАО Сбербанк за средства, выделенные на приобретение части реактивов по исследованию.

Материалы и методы

В клинике ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава РФ (отделение детской хирургии костно-суставного туберкулеза у детей и подростков) и в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России с 2008 по 2015 г. обследовано 40 детей в возрасте от 1 года до 15 лет с генерализованным туберкулезом.

В подавляющем большинстве случаев дети были вакцинированы БЦЖ при рождении. Каждый третий ребенок имел контакт с больным туберкулезом, при этом в половине случаев с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. В 27,5% случаев дети предъявляли жалобы на боли в месте воспаления, которые только в 10% случаев сопровождались симптомами интоксикации и гипертермией.

В 90% случаев костно-суставной туберкулез сопровождался поражением внутригрудных лимфатических узлов средостения, только у одного ребенка имел место первичный туберкулезный комплекс и милиарный туберкулез легких. Чаще всего выявлялся туберкулезный спондилит (50,0%) и туберкулезный остит (32,5%).

По данным туберкулинодиагностики, отрицательные результаты по пробе Манту с 2 ТЕ зафиксированы в 20,0% случаев, так же как в 36,7% случаев — отрицательные пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным.

При этом в диагностическом материале положительные результаты, по данным ПЦР диагностики ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*, определялись в 92,5% случаев, что совпадало с данными гистологического обследования.

Группа популяционного контроля для сравнения результатов HLA-типирования представлена 100 здоровыми взрослыми жителями Северо-Западного региона России (доноры крови).

Всем детям проведен стандартный комплекс фтизиатрического обследования с включением иммунологических (проба Манту с 2 ТЕ и проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным), иммуногенетических, лучевых (выполняли компьютерную томографию органов грудной

клетки и костно-суставного аппарата на многосрезовом спиральном компьютерном томографе “Aquilion-32” (фирма Toshiba) по стандартной методике) и лабораторных методов (исследование респираторного материала (промывные воды бронхов, мокрота, смывы из бронхов) и операционного материала с использованием бактериоскопии, посева на плотные питательные среды (Левенштейна–Йенсена, Финна 2), посева на жидкую питательную среду BACTEC MGIT 960 и метода ПЦР реального времени с использованием системы амплитуд — RW — производитель «Синтол», Россия) для выявления микобактерий туберкулеза.

Определение аллелей HLA-DRB1 и DQB1 на уровне базового разрешения проводилось в Республиканском центре иммунологического типирования тканей (EFI аккредитованная лаборатория) методом PCR SSP с использованием коммерческих наборов сиквенс-специфических праймеров. Визуализация продуктов, полученных в результате полимеразной цепной реакции, проводилась посредством электрофореза в горизонтальном агарозном геле.

Проведен анализ материала с применением методов параметрической и непараметрической статистики, а также расчет показателей: величины относительного риска (RR), превентивной фракции (PF), достоверность различий между группами оценивалась с помощью критерия 2 (Хи-квадрат) (Svejgaard A., 1994).

Результаты и обсуждение

Проведенный анализ особенностей распределения аллелей гена HLA-DQB1 представлен в таблице 2.

Согласно представленным данным, значимых различий в группах не обнаружено. Вместе с тем при сопоставлении частоты встречаемости аллелей HLA-DRB1 в исследуемых группах (табл. 3) было установлено достоверное снижение частоты DRB1*01 у детей с генерализованным туберкулезом по сравнению с группой здоровых лиц, что может быть связано в данном случае с его протективными свойствами. В то же время достоверно повышенная частота встречаемости DRB1*14 может свидетельствовать о предрасполагающей роли данного антигена.

Анализ внутрилокусных и межлокусных сочетаний аллелей HLA DRB1 и DQB1 представлен в таблице 4.

В фенотипе пациентов по сравнению с контролем выявлены достоверные различия в частоте встречаемости отдельных аллельных сочетаний. Увеличение частоты внутрилокусного сочетания DRB1*03,*04 и межлокусного сочета-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

TABLE 1. FEATURES OF PATIENTS WITH GENERALIZED TUBERCULOSIS

Характеристика (n = 40) Characteristics		Число пациентов (n/%) Number of patients
Мальчики Boys		24 (60,0)
Девочки Girls		16 (40,0)
Вакцинация БЦЖ Vaccination with BCG		39 (97,5)
Контакт с больным туберкулезом Contact with tuberculosis patients		12 (30,0)
Жалобы Complaints		11 (27,5)
Боль в месте воспаления Pain at the site of inflammation		12 (30,0)
Симптомы интоксикации Intoxication symptoms		4 (10,0)
Субфебрильная температура Low-grade fever		2 (5,0)
Туберкулез внутригрудных лимфатических узлов Tuberculosis of intrathoracic lymph nodes		36 (90,0)
Первичный туберкулезный комплекс Primary tuberculosis complex		1 (2,5)
Милиарный туберкулез легких Miliary lung tuberculosis		1 (2,5)
Туберкулезный остит Osteitis tuberculosis		13 (32,5)
Туберкулезный коксит Coxitis tuberculosis		3 (7,5)
Туберкулезный гонит Tuberculous gonarthritis		2 (5,0)
Туберкулезный спондилит Spondylitis tuberculosis		20 (50,0)
Туберкулез грудины Sternal tuberculosis		2 (5,0)
Результаты пробы Манту с 2 ТЕ Results of Mantu test	Отрицательная Negative	8 (20,0)
	Сомнительная Ambiguous	–
	Положительная от 5 до 10 мм Positive (5 to 10 mm)	10 (25,0)
	Положительная от 11 и выше Positive, > 11 mm in di-amer	22 (55,0)
Проба с Диаскинтестом Diaskintest (n = 30)	Отрицательная / Negative	11 (36,7)
	Сомнительная / Ambiguous	–
	Положительная / Positive	19 (63,3)
Посев мокроты на МБТ Sputum MBT culture	Положительный / Positive	2 (5,0)
	Отрицательный / Negative	38 (95,0)
Микроскопия Microscopy	Положительная / Positive	6 (16,2)
	Отрицательный / Negative	–
Молекулярно-генетический метод Molecular genetic testing	Положительный / Positive	37 (92,5)
	Отрицательный / Negative	3 (7,5)
Гистологическое исследование Histological examination	Продуктивно-некротический тип воспаления Productive/necrotic type of inflammation	38 (95,0)

ТАБЛИЦА 2. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ HLA-DQB1 У ДЕТЕЙ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

TABLE 2. FEATURES OF DISTRIBUTION OF HLA-DQB1 ALLELES AMONG CHILDREN WITH GENERALIZED TUBERCULOSIS

HLA-DQB1*	Дети с генерализованным туберкулезом Children with generalized tuberculosis n = 40 (n/%)	Группа контроля Control group n = 100 (n/%)	p < 0,05	RR
02	13 (32,5)	31 (31,0)	—	0,77
03	26 (65,0)	52 (52,0)	—	1,25
04	4 (10,0)	9 (9,0)	—	0,1
05	11 (27,5)	40 (40,0)	—	0,57
06	15 (37,5)	47 (47,0)	—	0,79
Blank	11 (27,5)	21 (21,0)	—	

ТАБЛИЦА 3. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ HLA-DRB1 У ДЕТЕЙ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

TABLE 3. FEATURES OF DISTRIBUTION OF HLA-DRB1 ALLELES AMONG CHILDREN WITH GENERALIZED TUBERCULOSIS

HLA-DRB1*	Дети с генерализованным туберкулезом Children with generalized tuberculosis n = 40 (n/%)	Группа контроля Control group n = 100 (n/%)	p < 0,05	RR
01	5 (12,5)	31 (31,0)	p < 0,05	0,34
03	6 (15,0)	11 (11,0)	—	0,13
04	9 (22,5)	15 (15,0)	—	0,21
07	10 (25,0)	31 (31,0)	—	0,41
08	4 (10,0)	8 (8,0)	—	0,09
09	3 (7,5)	4 (4,0)	—	0,05
10	2 (5,0)	2 (2,0)	—	0,02
11	12 (30,0)	18 (18,0)	—	0,27
12	2 (5,0)	8 (8,0)	—	0,07
13	8 (20,0)	32 (32,0)	—	0,4
14	3 (7,5)	1 (1,0)	p < 0,05	0,03
15	9 (22,5)	21 (21,0)	—	0,27
16	1 (2,5)	6 (6,0)	—	0,05
Blank	6 (15,0)	12 (12,0)		

ТАБЛИЦА 4. ВНУТРИЛОКУСНЫЕ И МЕЖЛОКУСНЫЕ СОЧЕТАНИЯ АЛЛЕЛЕЙ HLA-DRB1 И DQB1, ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ У ДЕТЕЙ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ С ЧАСТОТОЙ, ОТЛИЧАЮЩЕЙСЯ ОТ КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ
TABLE 4. INTRALOCUS AND INTERLOCUS COMBINATIONS OF HLA-DRB1 AND DQB1 ALLELES IN CHILDREN WITH GENERALIZED TUBERCULOSIS AND IN CONTROL GROUP

Сочетания антигенов Combinations of antigens	Дети с генерализованным туберкулезом Children with generalized tuberculosis n = 40	Группа контроля Control group n = 100	p
DRB1*01,*13	0%	10%	p < 0,05
DRB1*03,*04	7,5%	1,0%	p < 0,05
DRB1*01, DQB1*05	12,5%	30,0%	p < 0,05
DRB1*01, DQB1*06	0%	13,0%	p < 0,05
DRB1*11, DQB1*06	15,0%	5,0%	p < 0,05

ния DRB1*03,DQB1*06 среди детей с генерализованной формой туберкулеза свидетельствует о возможной связи данных фенотипов с предрасположенностью к развитию такого течения инфекционного процесса. Следует отметить, что DRB1*03,*04 аллели прочно ассоциируются с предрасположенностью к аутоиммунным заболеваниям, в частности к аутоиммунным эндокринопатиям. Это лишний раз подтверждает ключевую роль иммуногенетических факторов в развитии и характере течения туберкулеза.

Установленное достоверное уменьшение частоты сочетаний DRB1*01,*13; DRB1*01, DQB1*05

и DRB1*01, DQB1*06 свидетельствует о возможном протективном свойстве данных фенотипов в отношении развития генерализованной формы туберкулеза у детей.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о важной роли иммуногенетических факторов, в частности HLA-DRB1, DQB1 фенотипа, в предрасположенности к развитию генерализованной формы туберкулеза у детей, а также о целесообразности дальнейших исследований в этом направлении.

Список литературы / References

1. Арчакова Л.И. Значение генетических маркеров системы HLA у больных туберкулезом легких // Вестник новых медицинских технологий, 2008. Т. 15, № 3. С. 35-37. [Archakova L.I. The importance of genetic markers HLA system in patients with pulmonary tuberculosis. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*, 2008, Vol. 15, no. 3, pp. 35-37. (In Russ.)]
2. Довгалюк И.Ф., Корнева Н.В., Старшинова А.А., Овчинникова Ю.Э., Ананьев С.М. Клинико-эпидемиологические особенности туберкулеза у детей на территориях Северо-Западного региона России при внедрении в диагностику туберкулеза кожной пробы с Диаскинтестом и компьютерной томографии // Туберкулез и болезни легких, 2015. № 1. С. 4-9. [Dovgalyuk I.F., Korneva N.V., Starshinova A.A., Ovchinnikova Yu.E., Anan'ev S.M. Clinical and epidemiological characteristics of registered childhood tuberculosis cases in North-Western region of Russia when introducing a tuberculosis diagnosis complex using Diaskintest and multislice spiral computed tomography. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2015, no. 1, pp. 4-9. (In Russ.)]
3. Нечаева О.Б. Туберкулез в Российской Федерации: заболеваемость и смертность // Медицинский алфавит. Эпидемиология и гигиена, 2013. № 4 (24). С. 7-12. [Nechaeva O.B. Tuberculosis in the Russian Federation: morbidity and mortality. *Meditsinskiy alfavit. Epidemiologiya i gigiena = Medical Alphabet (Epidemiology and Hygiene)*, 2013, no. 4 (24), pp. 7-12. (In Russ.)]

4. Овчинникова Ю.Э., Довгальук И.Ф., Старшинова А.А., Буцацкая Л.А. Причины хронического течения туберкулеза внутригрудных лимфатических узлов у детей, особенности клинических проявлений и терапии // Туберкулез и болезни легких, 2010. Т. 87, № 1. С. 40-44. [Ovchinnikova Yu.E., Dovgalyuk I.F., Starshinova A.A., Buchatskaya L.A. Causes of chronic tuberculosis of intrathoracic lymph nodes in children, the specific features of clinical manifestations and therapy. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2010, Vol. 87, no. 1, pp. 40-44. (In Russ.)]
5. Старшинова А.А., Павлова М.В., Скворцова Л.А., Довгальук И.Ф. Подход к диагностике у детей туберкулеза внутригрудных лимфатических узлов парааортальной группы // Туберкулез и болезни легких, 2007. Т. 84, № 12. С. 14-17. [Starshinova A.A., Pavlova M.V., Skvortsova L.A., Dovgalyuk I.F. The approach to the diagnosis of tuberculosis of intrathoracic lymph nodes para-aortic group in children. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2007, Vol. 84, no. 12, pp. 14-17. (In Russ.)]
6. Старшинова А.А., Павлова М.В., Довгальук И.Ф., Павлова И.Е., Бубнова Л.Н. Взаимосвязь HLA-DRB1 генотипа с различными проявлениями туберкулеза у детей // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 4-5. С. 544. [Starshinova A.A., Pavlova M.V., Dovgalyuk I.F., Pavlova I.E., Bubnova L.N. Interrelation of HLA-DRB1 genotype with different forms of tuberculosis in children. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, Vol. 13, no. 4-5, p. 544. (In Russ.)]
7. Туберкулез в Российской Федерации в 2011 / Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. М., 2014. 213 с. [Tuberculosis in Russian Federation in 2011 / Analytical review of statistical indicators used in the Russian Federation and in the world]. Moscow, 2014. 213 p.
8. Bindoli S., Dagan A., Torres-Ruiz José J., Perricone C., Bizjak M., Doria A., Shoenfeld Y. Sarcoidosis and Autoimmunity: From Genetic Background to Environmental Factors. *IMAJ*, 2016, Vol. 18, Issue. 4, pp. 197-201.
9. Features of the distribution alleles of HLA-DRB1 in children with tuberculosis / A. Starshinova, I. Dovgalyuk, M. Pavlova, N. Korneva, L. Bubnova, I. Pavlova, P. Yablonskii, E. Zilber. *Wulfenia' Journal*, 2015, Vol. 22, Issue 7, pp. 494-499.
10. Frodsham A.J., Hill A.V.S. Genetic of infections disease. *Hum. Mol. Genet.*, 2004, Vol. 69, pp. 187-194.
11. World Health Organization. Global tuberculosis report, 2016, p. 10.

Авторы:

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

Беркос А.С. — к.м.н., заведующий лабораторией типирования тканей Республиканского центра иммунологического типирования тканей ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Ватутина В.А. — врач-фтизиатр отделения туберкулезного для больных костно-суставным туберкулезом (детей и подростков) ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

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

Berkos A.S., PhD (Medicine), Head, Tissue Typing Laboratory of the Republican Center Immunological Tissue Typing, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

Vatutina V.A., Clinical Phthisiatrist, Department for Pediatric Patients Patients with Osteoarticular Tuberculosis, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Ovchinnikova Yu.E., PhD (Medicine), Senior Research Associate, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Соколова Ю.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

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

Бубнова Л.Н. — заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории иммуногематологии и Республиканского центра иммунологического типирования тканей ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»; ГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, кафедра иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

Яблонский П.К. — д.м.н., профессор, директор ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ; декан медицинского факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Sokolova Yu.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Bubnova L.N., Honored Worker of Science of the Russian Federation, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunohematology and Russian Center of Tissue Typing, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Department of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

Yablonskiy P.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology; Dean, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 26.07.2017
Принята к печати 22.09.2017

Received 26.07.2017
Accepted 22.09.2017

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del У ЖЕНЩИН, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА ИЛИ РЕПРОДУКТИВНЫЕ ПОТЕРИ В РАННИЕ СРОКИ ГЕСТАЦИИ

Шабалдин А.В.¹, Цепочкина А.В.¹, Шмелевич С.А.², Понасенко А.В.¹,
Крюков П.М.³, Шабалдина Е.В.⁴

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

² ГБУЗ КО «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика
Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

³ МАУЗ «Детская городская клиническая больница № 5», г. Кемерово, Россия

⁴ ГБОУ ВПО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Кемерово, Россия

Резюме. Врожденные пороки сердца являются доминирующей патологией среди всех врожденных пороков плода и новорожденного. Нарушения иммунных взаимодействий в системе «мать — эмбрион» могут быть следствием тератогенеза. *HLA-G* является основной молекулой, посредством которой формируется толерантность материнского иммунного микроокружения к полуаллогенному эмбриону. Полиморфный вариант гена *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del влияет на устойчивость и экспрессию матричной РНК и тем самым на эффективность блокирования иммунного отторжения полуаллогенного эмбриона. Цель исследования была связана с поиском ассоциативных связей между носительством женщинами одного из полиморфных вариантов гена *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del с репродуктивными потерями и рождением детей с врожденными пороками сердца.

Обследовано 103 женщины, имеющие детей с врожденными пороками сердца, 21 женщина с репродуктивными потерями до 9 недель беременности и 101 женщина, имеющая двух и более здоровых детей.

Выявлено, что маркером ранних репродуктивных потерь у женщин являлся минорный гомозиготный генотип *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/14-bp ins (OR = 5,25; 95%CI = 1,31–21,11) и аллель *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins (OR = 2,34; 95%CI = 1,13–4,84). При носительстве женщиной гетерозиготного вариантного генотипа 14-bp ins/14-bp del *HLA-G* 3'UTR значимых ассоциаций с рождением детей с ВПС не определено.

Ключевые слова: *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del, репродуктивные потери, врожденные пороки сердца

Адрес для переписки:

Цепочкина Анна Викторовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
652002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.
Тел.: 8 (3842) 64-46-50.
E-mail: cepoav1991@gmail.com

Address for correspondence:

Tsepokina Anna V.
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular
Diseases
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnoviy blvd, 6.
Phone: 7 (3842) 64-46-50.
E-mail: cepoav1991@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, А.В. Цепочкина, С.А. Шмелевич,
А.В. Понасенко, П.М. Крюков, Е.В. Шабалдина
«Особенности распределения аллелей и генотипов
HLA-G 3'UTR 14-bp ins/del у женщин, имеющих детей
с врожденными пороками сердца или репродуктивные
потери в ранние сроки гестации» // Медицинская
иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 763–770.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-763-770

© Шабалдин А.В. и соавт., 2017

For citation:

A.V. Shabaldin, A.V. Tsepokina, S.A. Shmulevich,
A.V. Ponasenko, P.M. Kryukov, E.V. Shabaldina "Distribution
patterns of alleles and genotypes for *HLA-G* 3'UTR 14-bp
ins/del in mothers of children with congenital heart defects
or reproductive losses at early gestation terms", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017,
Vol. 19, no. 6, pp. 763–770.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-763-770

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-763-770

DISTRIBUTION PATTERNS OF ALLELES AND GENOTYPES FOR *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del IN MOTHERS OF CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DEFECTS OR REPRODUCTIVE LOSSES AT EARLY GESTATION TERMS

Shabaldin A.V.^a, Tsepokina A.V.^a, Shmulevich S.A.^b, Ponasenko A.V.^a, Kryukov P.M.^c, Shabaldina E.V.^d

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

^b Kemerovo L.S. Barbarash Cardiological Dispensarys, Kemerovo, Russian Federation

^c Children City Clinical Hospital No. 5, Kemerovo, Russian Federation

^d Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. *HLA-G* is the main molecule through which provides tolerance of maternal immune microenvironment to the semi-allogeneic embryo. Polymorphic variant of 14-bp ins/del in the *HLA-G* 3'UTR gene affects stability and expression of specific mRNA and, thereby, efficiency of immune rejection blockade of the semi-allogeneic embryo. Immune interactions in the "mother – fetus" system can cause teratogenic effects. Congenital heart defects are the dominant pathology among congenital malformations of the fetus and newborns. The aim of the study was to search possible associations between polymorphic 14-bp ins/del variants of maternal *HLA-G* 3'UTR gene, and reproductive losses or congenital heart defects in their children. Subjects and Methods. We have examined 103 women who had children with congenital heart defects, 21 women with reproductive losses at up to 9 weeks of pregnancy, 101 women with two or more healthy children. Results. It was revealed that the minor homozygous genotype *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/14-bp ins (OR = 5.25; 95% CI = 1.31-21.11), and allele *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins (OR = 2.34; 95% CI = 1.13-4.84) were markers of early reproductive loss in women. Polymorphic variant of the 14-bp ins/14-bp del gene variant of *HLA-G* 3'UTR in the mothers was not significantly associated with birth of infants with congenital heart defects.

Keywords: *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del, gestation, reproductive loss, congenital heart diseases

Введение

Вынашивание беременности является иммунным феноменом, связанным с распознаванием иммунокомпетентными клетками материнского микроокружения аллогенных антигенов главного комплекса тканевой совместимости (у человека HLA) зародыша [1]. Молекулы HLA, экспрессирующиеся на клетках эмбриона, также участвуют в формировании межклеточных контактов, обеспечивающих его имплантацию [3].

Человеческий лейкоцитарный антиген G (*HLA-G*) является представителем молекул главного комплекса тканевой совместимости, экспрессирующихся на мембране клеток зародыша и цитотрофобласта [4]. Основной функцией данной молекулы является ингибция NK-лимфоцитов матки через блокирование киллерных рецепторов (KIR2DL4 и ILT-2) по отношению к полуаллогенному зародышу [5]. Данную функцию выполняют не только *HLA-G*, экспрессирующиеся на мембране цитотрофобласта, но и растворимые формы *HLA-G* (s*HLA-G*). Блокирующий эффект растворимых форм *HLA-G* по отношению к антигенам зародыша связан и со

взаимодействием их с дендритными клетками маточного микроокружения [6].

Для *HLA-G* выявлен полиморфизм как в транслируемой (со второго по восьмой экзона), так и не в транслируемой (3'UTR) частях гена. Доказано неравновесное сцепление по отдельным гаплотипам как внутри гена *HLA-G*, так и по локусу HLA [7].

Полиморфизм *HLA-G* в позиции rs1704 (*HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del) определяет уровень трансляции гена и устойчивость матричной РНК [8]. Исследования показали, что при укорочении на 14 bp длины 3' UTR области скорость трансляции ДНК в матричную РНК увеличивается, в то же время сама матричная РНК с короткой 3' UTR областью становится менее устойчива к действию ферментов РНКаз. Возможно, что эти два противоположно направленных феномена, связанных с делецией *HLA-G* в 3' UTR, определяют разноречивость литературных данных о связи полиморфизма *HLA-G* в 3' UTR с уровнем экспрессии молекулы *HLA-G* на цитотрофобласте и концентрации ее растворимой формы в сыворотке крови.

Принимая во внимание функцию *HLA-G* как основной молекулы, предотвращающей иммунное отторжение эмбриона, а в дальнейшем плода, можно предполагать, что снижение экспрессии данной молекулы как в мембранной, так и в растворимой формах будет способствовать реализации декомпенсации иммунного конфликта между матерью и полуаллогенным плодом. В большинстве исследований, посвященных этой проблеме, указывается на ассоциативную связь между аллелем с добавлением 14 bp в 3' UTR и ранними репродуктивными потерями [9, 10, 11, 12]. В то же время в данных работах показана ассоциация материнского, но не плода, полиморфного варианта *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del. Соответственно, особенности наследования от матери к плоду того или иного полиморфного варианта гена будут реально определять экспрессию *HLA-G* на эмбрионе, цитотрофобласте и в растворимом виде.

Неоднократно показано, что реализация тератогенеза связана с иммунными нарушениями в системе «мать — эмбрион/плод» [13]. Исходя из этого, *HLA-G* является ключевой молекулой, обеспечивающей иммунные взаимодействия маточного микроокружения с аллогенными *HLA* эмбриона, а нарушения ее экспрессии будут приводить к индукции тератогенеза, связанного с фоновыми ксенобиотическими нагрузками. Исследователями показана связь материнского полиморфизма *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del с вертикальной передачей от матери к эмбриону/плоду резидентных вирусов [14]. Ранняя активация у матери и эмбриона геномов вирусов может способствовать манифестации тератогенеза [15, 16, 17].

Эмбриогенез сердца приходится на 3–5 неделю гестации. За этот короткий промежуток времени сердце из утолщенного сосуда с сократительной функцией превращается в четырехкамерный сложноорганизованный орган с автономной сократительной системой. Влияние различных тератогенов, мутагенов в этот временной промежуток приводит к формированию большого количества (более 140 нозологических форм) комбинированных и изолированных врожденных пороков сердца (ВПС). Генетические исследования при ВПС являются приоритетными в мировой кардиологии [18]. С позиции иммунной защиты эмбриона от ксенобиотиков с тератогенным эффектом обоснованным является поиск предикторов в локусе *HLA*. Исходя из того факта, что уровень кроссинговера внутри локуса *HLA* невысок, полиморфизм *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del может быть ассоциирован с аллелями *It* генов, определяющих пролонгированное воспаление.

Учитывая выполненные исследования, посвященные *HLA-G*, сформулирована **цель данной работы** — изучить особенности распределения аллелей и генотипов *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del у женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца или репродуктивные потери в ранние сроки гестации.

Материалы и методы

Исследование проводили с участием трех групп женщин. Первая основная группа была представлена матерями, имеющими детей с врожденными пороками сердца (ВПС). Вторая основная группа — женщинами, имеющими в анамнезе более двух спонтанных аборт в сроке до 9 недель беременности. Третья группа была контрольной и в ней были женщины, имеющие двух и более здоровых детей. После разъяснения условий участия в исследовании все женщины давали письменное информированное согласие, одобренное комитетом по биоэтике ГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (выписка из протокола № 57/К от 09.12.2012) и локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (выписка из протокола № 20 от 24.11.2011).

Первую основную группу составили 103 женщины. Средний возраст матерей был 26 лет (от 18 до 48). Данная группа была сформирована на базе отделения детской кардиологии Кемеровского кардиологического диспансера в период с 2013 по 2015 год.

Распределение ВПС по нарушениям гемодинамики у детей основной группы, согласно классификации *Nomenclature of Diagnosis of Heart Diseases at NMMC*, представлено в таблице 1.

Вторая основная группа была представлена 21 женщиной с отягощенным акушерским анамнезом, связанным со спонтанным самопроизвольным прерыванием беременности на ранних сроках гестации. Средний возраст матерей составил 27 лет (от 18 до 47 лет) и был сопоставим с первой основной группой.

Группа контроля состояла из 103 здоровых женщин, имеющих более двух здоровых детей. Средний возраст женщин этой группы составил 24 года (от 17 до 39 лет) и был сопоставим с обеими основными группами.

Вторая основная группа и группа контроля формировалась в поликлиническом отделении ООО «Современные медицинские технологии», (главный врач д.м.н. Шабалдина Е.В.) и МБУЗ ДГКБ № 5 (директор д.м.н. Ликстанов М.И.).

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови обследуемых женщин методом фенол-хлороформной экстракции [14]. Амплификацию полиморфных участков генов проводили методом аллель-специфичной по-

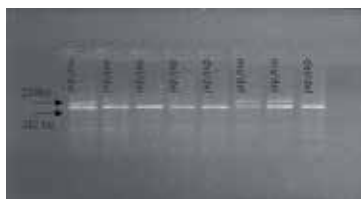


Рисунок 1. Детекция результатов на 3,0% агарозном геле
Figure 1. Detection of results in the 3 per cent agarose gel

лимеразной цепной реакции, в соответствии с протоколом производителя (Applied Biosystems, USA), с дальнейшей электрофоретической детекцией в 3,0% агарозном геле (рис. 1).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программа Statistica 10.0. (StatSoft Inc., США). Анализ возрастных характеристик проводили с помощью методов описательной статистики (медиана, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Равновесие Харди-Вайнберга определяли при помощи критерия Хи-квадрат Пирсона. Статистический анализ результатов генотипирования осуществляли посредством программы SNPStats [20]. Для оценки риска вычисляли отношение шансов (OR) и 95% доверительный интервал (CI) для OR. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВПС У ДЕТЕЙ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ СОГЛАСНО КЛАССИФИКАЦИИ

TABLE 1. INBORN HEART DEFECTS IN THE CHILDREN, ACCORDING TO NMMC CLASSIFICATION OF HEART DISEASES AT (NDHD)

ВПС по нарушениям гемодинамики согласно NDHD Inborn heart defects	Абсолютное число, n Absolute number, n	Удельный вес, % Relative weight, %
Стенотические или обструктивные пороки левого сердца Left heart stenotic or obstructive defects	8	7,92
Стенотические или обструктивные пороки правого сердца Right heart stenotic or obstructive defects	14	13,86
Шунтовые пороки с перегрузкой правого желудочка Shunt defects with right ventricle overload	19	18,81
Шунтовые пороки с перегрузкой левого желудочка Shunt defects with left ventricle overload	42	41,58
Комбинированные ВПС Combined inborn heart defects	18	17,82

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ГЕНОТИПОВ HLA-G 3'UTR В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 2. PREVALENCE OF HLA-G 3'UTR GENOTYPES IN THE STUDIED GROUPS

Группа Group	Частота генотипа Genotype frequency						$p_{\text{ХВ}}^*$ p_{HW}^*
	D/D		I/D		I/I		
	Абс. Abs	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	
Вся выборка Total sample (n = 225)	84	37,3	114	50,7	27	12,0	0,41
Первая основная группа First main group (n = 103)	44	43	51	49	8	8	0,19
Вторая основная группа Second main group (n = 21)	4	19	10	48	7	33	0,8
Контроль Controls (n = 101)	36	35	53	53	12	12	0,25

Примечание. * – уравнение Харди-Вайнберга.

Note. *, Hardy–Weinberg equilibrium.

Результаты

Проведенные исследования показали, что распределение генотипов *HLA-G* 3'UTR (14-bp del/14-bp del [D/D]; 14-bp del/14-bp ins [I/D]; 14-bp ins/14-bp ins [I/I]) у женщин в первой, второй и контрольной группах не отклонялось от расчетных величин, полученных по уравнению Харди-Вайнберга, отражающего генетическое равновесие в популяции (табл. 2; $p < 0,05$).

При анализе возрастного состава женщин трех групп не обнаружено статистически значимых различий ($p > 0,05$). Тем самым показано, что возраст матерей не являлся дополнительным ограничительным критерием для генетического сопоставления исследуемых групп.

Сравнение частот аллелей и генотипов в группе женщин, родивших детей с ВПС, и в группе сравнения не выявило значимых различий по пяти моделям наследования (табл. 3).

Анализ распределения аллелей и генотипов в группе матерей, имеющих детей с шунтовыми пороками сердца с перегрузкой левого желудочка, как наиболее часто встречаемого ВПС (42,2%), также не выявил статистически значимых различий по отношению к контролю ($p > 0,05$).

Показано, что в группе женщин с ранними репродуктивными потерями чаще встречается гомозиготный генотип *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/14-bp ins по отношению к контрольной группе, наследуемый по рецессивной модели (табл. 4).

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ *HLA-G* 3'UTR В ПЕРВОЙ ОСНОВНОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППАХ

TABLE 3. FREQUENCIES OF *HLA-G* 3'UTR GENOTYPES IN FIRST MAIN GROUP AND CONTROLS

Модель наследования Genetic model	Генотип Genotype	Контрольная группа Control group	Первая основная группа First main group	OR (95% CI) Odds ratio	P
Кодоминантная Codominant	D/D	36 (35,6%)	44 (42,7%)	1,00	0,44
	I/D	53 (52,5%)	51 (49,5%)	0,79 (0,44-1,41)	
	I/I	12 (11,9%)	8 (7,8%)	0,55 (0,20-1,48)	
Доминантная Dominant	D/D	36 (35,6%)	44 (42,7%)	1,00	0,3
	I/D-I/I	65 (64,4%)	59 (57,3%)	0,74 (0,42-1,31)	
Рецессивная Recessive	D/D-I/D	89 (88,1%)	95 (92,2%)	1,00	0,32
	I/I	12 (11,9%)	8 (7,8%)	0,62 (0,24-1,60)	
Сверхдоминантная Superdominant	D/D-I/I	48 (47,5%)	52 (50,5%)	1,00	0,67
	I/D	53 (52,5%)	51 (49,5%)	0,89 (0,51-1,54)	
Лог-аддитивная Log-additive	—	—	—	0,76 (0,49-1,17)	0,21

ТАБЛИЦА 4. ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ *HLA-G* 3'UTR ВО ВТОРОЙ ОСНОВНОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППАХ

TABLE 4. FREQUENCIES OF *HLA-G* 3'UTR GENOTYPES IN SECOND MAIN GROUP AND CONTROLS

Модель наследования Genetic model	Генотип Genotype	Контрольная группа Control group	Вторая основная группа Second main group	OR (95% CI) Odds ratio	P
Кодоминантная Codominant	D/D	36 (35,6%)	4 (19,1%)	1,00	0,049
	I/D	53 (52,5%)	10 (47,6%)	1,70 (0,49-5,83)	
	I/I	12 (11,9%)	7 (33,3%)	5,25 (1,31-21,11)	
Доминантная Dominant	D/D	36 (35,6%)	4 (19,1%)	1,00	0,13
	I/D-I/I	65 (64,4%)	17 (81%)	2,35 (0,74-7,53)	
Рецессивная Recessive	D/D-I/D	89 (88,1%)	14 (66,7%)	1,00	0,023
	I/I	12 (11,9%)	7 (33,3%)	3,71 (1,25-11,02)	
Сверхдоминантная Superdominant	D/D-I/I	48 (47,5%)	11 (52,4%)	1,00	0,69
	I/D	53 (52,5%)	10 (47,6%)	0,82 (0,32-2,11)	
Лог-аддитивная Log-additive	—	—	—	2,34 (1,13-4,84)	0,018

ТАБЛИЦА 5. ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ *HLA-G* 3'UTR В ПЕРВОЙ И ВО ВТОРОЙ ОСНОВНЫХ ГРУППАХ

TABLE 5. FREQUENCIES OF *HLA-G* 3'UTR GENOTYPES IN FIRST AND SECOND MAIN GROUPS

Модель наследования Genetic model	Генотип Genotype	Первая основная группа First main group	Вторая основная группа Second main group	OR (95% CI) Odds ratio	P
Кодоминантная Codominant	D/D	44 (42,7%)	4 (19,1%)	1,00	0,006
	I/D	51 (49,5%)	10 (47,6%)	2,16 (0,63-7,36)	
	I/I	8 (7,8%)	7 (33,3%)	9,62 (2,28-40,67)	
Доминантная Dominant	D/D	44 (42,7%)	4 (19,1%)	1,00	0,034
	I/D-I/I	59 (57,3%)	17 (81%)	3,17 (1,00-10,08)	
Рецессивная Recessive	D/D-I/D	95 (92,2%)	14 (66,7%)	1,00	0,003
	I/I	8 (7,8%)	7 (33,3%)	5,94 (1,86-18,93)	
Сверхдоминантная Superdominant	D/D-I/I	52 (50,5%)	11 (52,4%)	1,00	0,87
	I/D	51 (49,5%)	10 (47,6%)	0,93 (0,36-2,37)	
Лог-аддитивная Log-additive	—	—	—	3,13 (1,47-6,68)	0,002

При сопоставлении аллелей и генотипов *HLA-G* 3'UTR групп женщин с ранними репродуктивными потерями и женщин, имеющих детей с ВПС, выявлен ряд статистически значимых различий. В группе женщин с репродуктивными потерями достоверно чаще встречались носители гомозиготного генотипа *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/14-bp ins, чем в группе женщин, имеющих детей с ВПС (табл. 5), в соответствии с лог-аддитивной моделью наследования.

Тем самым в исследовании продемонстрировано увеличение частоты встречаемости аллеля 14-bp ins *HLA-G* 3'UTR и соответствующего гомозиготного генотипа *HLA-G* 3'UTR у женщин с репродуктивными потерями, как по отношению к женщинам, имеющих здоровых детей, так и к женщинами, имеющих детей с ВПС.

Обсуждение

Проведенный анализ литературных данных показал, что аллель *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins и соответствующий гомозиготный генотип достоверно чаще встречается у женщин с ранними репродуктивными потерями [5, 22, 25]. Известно, что для *HLA*-генов всегда имеет место кодоминантная модель наследования, то есть постоянное участие в иммунных процессах всех унаследованных аллелей [15]. С этих позиций при гомозиготном генотипе женщины *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/14-bp ins плод получает аллель *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins, который постоянно участвует в процессах, направленных на ограничение иммунного отторжения со стороны материнского микроокружения. Неоднократные исследования показали ассоциативную связь с понижением экспрессии молекулы *HLA-G* на клеточных культурах гомозиготных по *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/14-bp ins, а также

растворимой формы s*HLA-G* в супернатантах [3, 18]. Принимая во внимание доказанный факт блокирования молекулой *HLA-G* киллерных рецепторов натуральных киллерных лимфоцитов (KIR2DL4 и ILT-2) [8, 12], можно утверждать, что понижение экспрессии *HLA-G* у эмбриона на цитотрофобласте и в растворимом виде будет приводить к иммунному отторжению полуаллогенного зародыша или прерыванию беременности на более поздних сроках.

Представленное исследование показало, что в группе женщин с ранними репродуктивными потерями частота гомозиготного генотипа *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/14-bp ins была достоверно выше, чем в контрольной группе. Достоверные различия получены не только для кодоминантной модели наследования, но и для рецессивной, и для лог-аддитивной. Это указывает на тот факт, что даже в гетерозиготном состоянии, при наличии второго, мажорного аллеля, данный минорный аллель будет проявлять свои негативные качества в отношении формирования репродуктивных потерь.

Исследование распределения аллелей и генотипов полиморфизма *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del в мире показали незначительные изменения в частоте встречаемости мажорных и минорных аллелей и генотипов от популяции к популяции (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). Кроме того, для европейских и монголоидных популяций отмечена аналогичная тенденция в повышении гомозиготного генотипа *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/1-4bp ins у женщин с репродуктивными потерями [10]. Учитывая этот факт, можно утверждать, что данный генотип является маркерным для ранних репродуктивных потерь и в популяции Западной Сибири.

Выдвинутая гипотеза о том, что ВПС могут формироваться вследствие иммунных нарушений в системе «мать — плод», имеет право на существование. Морфологические исследования эмбрионов от спонтанно закончившихся беременностей в ранние сроки показали у них пороки развития и хромосомные аномалии в более 90% случаях [6]. Этот факт указывает на общность особенностей этиологии и патогенеза репродуктивных потерь и врожденных пороков развития плода. Показано, что ВПС являются доминирующей патологией в группе врожденных пороков развития плода и новорожденного ребенка, удельный вес которых для всех популяций мира превышает 50% [11]. Тем самым можно говорить, что общность иммунных нарушений, приводящих к репродуктивным потерям и формированию врожденных пороков развития плода, распространяется и на формирование ВПС. С позиции обеспечения нормальных иммунных взаимодействий между материнским микроокружением и полуаллогенным зародышем locus HLA является основополагающим. Кроме того, ранее были получены ассоциации между аллелями и генотипами *HLA-DR* и ВПС, как для детей с ВПС, так и для их матерей [1, 2]. Другой путь формирования ВПС, ассоциированный с *HLA-G*, может быть связан с активацией вертикального пути передачи вирусов от матерей к плоду. Показано, что

ВИЧ и цитомегаловирус достоверно чаще передаются от инфицированных матерей к их детям при наличии у матерей аллелей или генотипов с *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins [21]. Известно, что герпетические вирусы индуцируют формирование ВПС. Но настоящее исследование не показало достоверных положительных ассоциаций между полиморфизмом *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del матерей и ВПС у их детей. Более того, показано достоверное различие по частоте носительства гомозиготного генотипа *HLA-G** 14-bp ins/14-bp ins у женщин с ранними репродуктивными потерями и имеющих детей с ВПС. Эти данные указывают на минимальную роль иммунных нарушений в системе «мать — плод» по *HLA-G* в индукции тератогенеза в формирующемся сердце.

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Маркером ранних репродуктивных потерь у женщин является минорный аллель *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins, а носительство женщиной гомозиготного генотипа по этому аллелю (*HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/14-bp ins) ассоциировано с более чем пятикратным увеличением риска (OR = 5,25; 95%CI = 1,31-21,11).

2. Полиморфный вариант гена *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del (rs1704) матерей не имеет достоверных ассоциаций с рождением детей с ВПС.

Список литературы / References

1. Шабалдин А.В., Цепочкина А.В., Литвинова Н.А., Шмудевич С.А., Крюков П.М. Ассоциации материнских HLA-DRB1* с риском формирования у их детей септальных врожденных пороков сердца // Мать и дитя в Кузбассе, 2016. № 2. С. 15-20. [Shabaldin A.V., Tsepokina A.V., Litvinova N.A., Shmulevich S.A., Kryukov P.M. The association of maternal HLA-DRB1* with risk of development congenital septal heart defects at their children. *Mat' i ditya v Kuzbassa = Mother and Baby in Kuzbass*, 2016, no. 2, pp. 15-20. (In Russ.)]
2. Christiansen O.B., Dahl M., Djuricic S., Klitkou L., Hviid Th.F. Correlation between maternal soluble HLA-G at midterm and term with umbilical cord soluble HLA-G and their association to maternal and fetal HLA-G genotypes. *Journal of Reproductive Immunology*, 2016, Vol. 115, p. 58.
3. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 387-411.
4. Fan W., Li S., Huang Z., Chen Q. Relationship between HLA-G polymorphism and susceptibility to recurrent miscarriage: a meta-analysis of non-family based studies. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2014, Vol. 31, no. 2, p. 173.
5. García-Enguános A. Risk factors in miscarriage and malformation: a review. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 2002, Vol. 102, no. 2, pp. 111-119.
6. Gładki M.M., Składzień T., Skalski J.H. The impact of environmental factors on the occurrence of congenital heart disease in the form of hypoplastic left heart syndrome. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska*, 2015, Vol. 12, no. 3, pp. 204-207.
7. Gonen-Gross T., Gazit R., Achdout H., Hanna J., Mizrahi S., Markel G., Hořejší V., Mandelboim O. Special organization of the HLA-G protein on the cell surface. *Human Immunology*, 2003, Vol. 64, no. 11, pp. 1011-1016.
8. Hong Heather A., Paximadis M., Gray Glenda E., Kuhn L., Tiemessen Caroline T. Maternal human leukocyte antigen-G (HLA-G) genetic variants associate with in utero mother-to-child transmission of HIV-1 in Black South Africans. *Infection, Genetics and Evolution*, 2015, Vol. 30, pp. 147-158.
9. Hunt J., Petroff M., McIntire R., Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *The FASEB Journal*, 2005, Vol. 19, no. 7, pp. 681-693.
10. Jin B., Luo X.P., Ni H. C., Shen W., Shi H.M., Li Y. A meta-analysis of HLA-DR polymorphism and genetic susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Molecular Biology Reports*, 2012, Vol. 39, no.1, pp. 221-226.
11. Kang H.W., Cho Y.G., Yoon U.H. DNA extraction method for RFLP and PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, Vol. 16, pp. 90-103.

12. Mandò Ch., Pileri P., Mazzocco M. I., Lattuada D., Zolin A., Plebani M. Maternal and fetal HLA-G 14 bp gene polymorphism in pregnancy-induced hypertension, preeclampsia, intrauterine growth restricted and normal pregnancies. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 2016, Vol. 29, no. 9, pp. 1509-1514.
13. Meuleman T., Lashley L., Dekkers O.M., Jan M.M. van Lith, Claas F.H.J. HLA associations and HLA sharing in recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *Human Immunology*, 2015, Vol. 76, no. 5, pp. 362-373.
14. Robertson S.A., Prins J.R., Sharkey D.J., Moldenhauer L.M. Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 69, no. 4, pp. 315-330.
15. Rousseau P., le Discorde M., Mouillot G., Marcou C., Carosella E.D., Moreau P. The 14 bp Deletion-Insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Human Immunology*, 2003, Vol. 64, no. 11, pp. 1005-1010.
16. Segat L., Catamo E., Fabris A., Padovan L., Morgutti M., Crovella S. HLA-G 3'UTR haplotypes and HIV vertical transmission. *AIDS*, 2009, Vol. 23, no. 14, pp. 1916-1918.
17. Segat L., Crovella S. HLA-G 14 bp del/ins genetic variation: association with susceptibility to human immunodeficiency virus-1 vertical transmission but not with human immunodeficiency virus-1 infection through horizontal transmission. *Tissue Antigens*, 2012, Vol. 80, no. 1, pp. 12-13.
18. Segat L., Zupin L., Kim H.Y., Catamo E., Thea D.M., Kankasa C., Aldrovandi G.M., Kuhn L., Crovella S. HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism and mother-to-child transmission of HIV. *Tissue Antigens*, 2014, Vol. 83, no. 3, pp. 161-167.
19. Shankarkumar U., Shankarkumar A., Chedda Z., Ghosh K. Role of 14-bp deletion/insertion polymorphism in exon 8 of the HLA-G gene in recurrent spontaneous abortion patients. *J. Hum. Reprod. Sci.*, 2011, Vol. 4, no. 3, pp. 143-146.
20. Sole X., Guino E., Valls J., Iñiest R., Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 2006, Vol. 22, no. 15, pp. 1928-1929.
21. Wang X., Jiang W., Zhang D. Association of 14-bp insertion/deletion polymorphism of HLA-G gene with unexplained recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. *Tissue Antigens*, 2013, Vol. 81, no. 2, pp. 108-115.
22. Xue S., Yang J., Yao F., Xu L., Fan L. Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/+14 bp heterozygotes in the 30UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population. *Tissue Antigens*, 2007, Vol. 69, no. 1, p. 153.
23. Zhu Y., Huo Z., Lai J., Li S., Jiao H., Dang J., Jin C. Case-control study of a HLA-G 14-bp insertion-deletion polymorphism in women with recurrent miscarriages. *Scand. J. Immunol.*, 2010, Vol. 71, no. 1, pp. 52-54.

Авторы:

Шабалдин А.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Цепочкина А.В. — младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Шмелевич С.А. — заведующая детским отделением ГБУЗ КО «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

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

Крюков П.М. — к.м.н., заведующий отделением новорожденных МАУЗ «Детская городская клиническая больница № 5», г. Кемерово, Россия

Шабалдина Е.В. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой оториноларингологии и клинической иммунологии ГБОУ ВПО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Authors:

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Tsepokina A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shmulevich S.A., Head, Pediatric Department, Kemerovo L.S. Barbarash Cardiological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

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

Kryukov P.M., PhD (Medicine), Head, Department for Newborn Children, Children City Clinical Hospital No. 5, Kemerovo, Russian Federation

Shabaldina E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Otolaryngology and Clinical Immunology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 15.02.2017
Принята к печати 22.02.2017

Received 15.02.2017
Accepted 22.02.2017

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ И РЕАКТИВНОМ АРТРИТАХ

Волкова М.В.¹, Кундер Е.В.¹, Генералов И.И.², Петрович Д.М.¹

¹ ГУО «Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь

² УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Резюме. В последние годы активно исследуются каталитические свойства иммуноглобулинов. Установлено, что нуклеазная активность иммуноглобулинов повышается при системных аутоиммунных заболеваниях. Учитывая патогенетические особенности ревматоидного артрита и реактивного артрита, целесообразным является уточнение характера нуклеазной активности при данных заболеваниях. Этому может послужить определение ДНКазной активности иммуноглобулинов с использованием различных ДНК-субстратов и поиск специфических субстратов для конкретных нозологических единиц.

Целью работы является определение ДНКазной активности поликлональных иммуноглобулинов класса G при ревматоидном и реактивном артрите с использованием различных методов.

Для оценки нуклеазной активности используются различные методы. В настоящей работе изложены разработанные и модифицированные нами методики для определения ДНКазной активности поликлональных иммуноглобулинов класса G. Особое внимание уделено электрофоретическому методу оценки ДНКазной активности. Материалом для исследования являются поликлональные иммуноглобулины класса G, выделенные из сыворотки крови пациентов с ревматоидным артритом и реактивным артритом.

Выводы: 1. В сыворотке пациентов с ревматоидным артритом, реактивным артритом присутствуют антитела, обладающие дезоксирибонуклеазной активностью. 2. ДНКазные абзимы проявляют гетерогенную способность гидролизовать различные ДНК-субстраты. 3. Абзимный гидролиз ДНК-субстратов длиной более 700 пар оснований более выражен по сравнению с ДНК-субстратами короткой (100 пар оснований) длины.

Ключевые слова: иммуноглобулины, абзимы, нуклеазная активность, гетерогенность, ревматоидный артрит, реактивный артрит

Адрес для переписки:

Волкова Маргарита Васильевна
ГУО «Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования»
220013, Республика Беларусь, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корп. 3.
Тел.: +375 (44) 777-39-00.
Факс: +375 (17) 292-25-33.
E-mail: margovolkova@gmail.com

Address for correspondence:

Volkova Margarita V.
Belorussian Medical Academy of Postgraduate Education
220013, Republic of Belarus, Minsk, Brovki str., 3, bldg 3.
Phone: +375 (44) 777-39-00.
Fax: +375 (17) 292-25-33.
E-mail: margovolkova@gmail.com

Образец цитирования:

М.В. Волкова, Е.В. Кундер, И.И. Генералов, Д.М. Петрович «Гетерогенность нуклеазной активности поликлональных иммуноглобулинов при ревматоидном и реактивном артрите» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 771-778.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-771-778

© Волкова М.В. и соавт., 2017

For citation:

M.V. Volkova, A.V. Kunder, I.I. Generalov, D.M. Petrovich "Heterogeneity of polyclonal immunoglobulins nuclease activity in rheumatoid and reactive arthritis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 771-778.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-771-778

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-771-778

HETEROGENEITY OF POLYCLONAL IMMUNOGLOBULINS NUCLEASE ACTIVITY IN RHEUMATOID AND REACTIVE ARTHRITIS

Volkova M.V.^a, Kunder A.V.^a, Generalov I.I.^b, Petrovich D.M.^a

^a Belorussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

^b Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Abstract. Catalytic properties of immunoglobulins are widely studied within recent years. It was found that nuclease activity of immunoglobulins is increased in systemic autoimmune diseases. Given some pathogenetic features of rheumatoid arthritis and reactive arthritis, it is appropriate to clarify the nature of nuclease activity in these diseases. Determination of DNase activity of immunoglobulins with different DNA substrates, and search for specific substrates for distinct clinical entities could serve these purposes. The aim of present work is to determine DNase activity of the polyclonal class G immunoglobulins in rheumatoid and reactive arthritis using various methods.

Different methods are used to evaluate nuclease activity. In this paper we present newly developed and modified techniques for determination of DNase activity of polyclonal IgGs. Particular attention was paid to the electrophoretic method of DNase activity assessment. Polyclonal IgG isolated from blood serum of patients with rheumatoid arthritis and reactive arthritis were used for assays. In this study, we demonstrated the presence of an inhomogeneous DNase activity of immunoglobulins in relation to different substrates.

Along with calf thymus DNA, we used bacterial plasmid DNA and PCR products based on bacterial gene sequences. Levels of DNase activity by rivanol clot method with calf thymus DNA as substrate proved to be higher in patients with rheumatoid arthritis than the control values ($p < 0.01$). DNase abzyme activity in patients with rheumatoid arthritis was elevated, as compared to the patients with reactive arthritis ($p < 0.01$). When examining ability of the IgG to hydrolyze procaryotic DNA (bacterial plasmid DNA and PCR products, based on bacterial genes), we obtained heterogeneous results. Different Ig samples showed varying degrees of DNA hydrolysis. Abzyme hydrolysis of DNA substrates longer than 700 bp was more pronounced, as compared to short DNA substrates (100 base pairs).

Conclusions: 1) antibodies having deoxyribonucleic activity are present in serum of patients with rheumatoid arthritis, reactive arthritis; 2) DNase abzymes exhibit heterogeneous ability to hydrolyze various DNA substrates; 3) Abzyme-mediated hydrolysis of DNA substrates longer than 700 base pairs is more pronounced, as compared to a short DNA substrates (100 bp) length.

Keywords: immunoglobulins, abzymes, nuclease activity, heterogeneity, rheumatoid arthritis, reactive arthritis

Введение

В последние годы взаимодействие нуклеиновых кислот и системы нуклеаз крови рассматривается как один из механизмов патогенеза аутоиммунных заболеваний. Для этого существует ряд научных предпосылок. Во-первых, концентрация эндогенных циркулирующих нуклеиновых кислот в плазме при аутоиммунных процессах в десятки раз выше по сравнению со здоровыми донорами [5]. Во-вторых, при ряде аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка и ревматоидный артрит, кроме циркулирующей ДНК, в сыворотке крови появляются антитела к ДНК и циркулирующие иммунные комплексы с ДНК. Обнаружено повышение ДНКазной активности сыворотки крови при ревматоидном артрите, спондилоартритах [4, 9]. Описано снижение ДНКазной активности сы-

воротки при СКВ, в биологических моделях показано развитие клинических проявлений СКВ у мышей, дефицитных по гену ДНКазы I, у 2-х пациентов с СКВ обнаружены дефекты в гене, кодирующем ДНКазу I [10, 16].

Также установлено, что наряду с дезоксирибонуклеазами плазмы крови нуклеазную активность способны проявлять иммуноглобулины [15]. Наиболее высокие уровни ДНКазной активности иммуноглобулинов установлены при ревматоидном артрите, псориатическом артрите, системной красной волчанке [9, 18].

Для оценки ДНКазной активности используются различные методы. В настоящей работе изложены разработанные и модифицированные нами методики для определения ДНКазной активности поликлональных иммуноглобулинов класса G, особое внимание уделено электрофо-

ретическому методу оценки ДНКазной активности.

Материалы и методы

Для исследования использовались поликлональные иммуноглобулины класса G. IgG выделялись из сыворотки крови пациентов с ревматоидным артритом и реактивным артритом риванол-аффинохроматографическим методом с использованием агарозы, конъюгированной с протеином А [1]. Контроль чистоты и гомогенности проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле с окраской нитратом серебра и Coomassie Brilliant Blue [2].

Базовым методом определения ДНКазной активности в нашей лаборатории является метод риванолового сгустка [3].

Для работы используется матричный 0,1% раствор ДНК тимуса теленка (Sigma) путем растворения ДНК в дистиллированной воде. Рабочий раствор ДНК в концентрации 0,25–0,35 мг ДНК/мл изготавливается из матричного раствора непосредственно перед постановкой реакции. Обязательно контролируется состояние рабочего раствора ДНК. Для этого к 0,2 мл раствора ДНК следует прибавить 0,1 мл 0,9% NaCl и 0,1 мл 0,02М трис-НСl буфера pH 8,3 с 0,01 М хлоридом магния. Затем добавить 0,02 мл 0,75% раствора риванола и встряхнуть до образования сгустка ДНК. Далее сгусток отмыть, экстрагировать при 100 °С 0,5–1М раствором HCl в течение 1–2 минут и фотометрировать на длине волны 405 нм. Пригодным для работы считается оптическая плотность сгустка ДНК 0,7–0,9.

Постановка осуществляется в центрифужных пробирках. К 0,1 мл поликлональных иммуноглобулинов в концентрации 1 мг/мл следует прибавить 0,2 мл стандартизованного раствора ДНК и 0,1 мл 0,02 М pH 7,4 Трис-НСl буфера, содержащего 0,01 М MgCl₂, затем встряхнуть. Реакция ставится в дублях. В контрольных пробах используется 0,02 М pH 8,3 Трис-НСl буфер, не содержащий солей магния, что блокирует ДНКазную активность, а также сыворотка донора, не проявляющая собственной ДНКазной активности в указанном разведении. Пробы необходимо инкубировать при 37 °С в течение 2 часов. После инкубации к пробам добавляется по 20 мкл 0,75% риванола. Результат оценивается по сгустку. Визуальный учет реакции проводится в баллах: 0 – отсутствие активности (компактный сгусток); 1 – минимальная активность (рыхлый сгусток); 2 – слабая активность (рыхлый сгусток, хлопья, нити); 3 – умеренная активность (хлопья, нити); 4 – высокая активность (распад сгустка, хлопья, нити); 5 – максималь-

ная активность (полный распад сгустка с образованием гомогенной взвеси).

Время инкубации реакции составило 20 часов. Забор аликвот производился сразу после смешивания компонентов (без инкубации), через 5 и 20 часов инкубации.

Наличие ДНКазной активности также определялось электрофорезом продуктов распада ДНК под влиянием иммуноглобулинов в 1,5% агарозном геле [2]. Для постановки электрофореза субстратно-буферная смесь (0,01 мл) вносилась в агарозный гель, содержащий Трис-боратный буфер (89 мМТрис, 2,5 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 8,9 мМ H₃BO₃) с бромидом этидия (0,4 мкг/мл). Электрофорез выполнялся в аппарате для горизонтального электрофореза, заполненном Трис-боратным буфером при силе тока 30 мА, напряжении 120 V, в течение 2 часов или до момента достижения образцами края геля. Результаты электрофореза оценивались при помещении агарозного геля под ультрафиолетовый свет для визуализации продуктов реакции.

Для изучения патогенетической значимости феномена нуклеазной активности поликлональных иммуноглобулинов также были использованы другие субстраты ДНК, а именно бактериальная плазмидная двухспиральная ДНК *Escherichia coli*, ДНК *Chlamydia trachomatis* и *E. coli*, полученная методом ПЦР. ДНК-гидролизующую способность антител в отношении ДНК *E. coli* и *C. trachomatis* оценивали по изменению электрофоретической подвижности субстрата.

Для определения способности IgG гидролизовать бактериальную плазмидную ДНК *E. coli* использовалась разработанная нами методика. Реакционная смесь (0,3 мл) состояла из 0,1 мл двухспиральной плазмидной ДНК (3,400 пар оснований) в концентрации 100 мкг/мл, 0,1 мл препарата поликлональных IgG в концентрации 1 мг/мл или 0,1 мл 0,9% раствора NaCl в контрольной пробе и 0,1 мл буферного раствора 0,02 М Трис-НСl pH 7,4 с 0,01 М MgCl₂. Субстратно-буферная смесь инкубировалась в течение 20 часов при 37 °С. Результаты оценивались путем электрофореза в агарозном геле согласно вышеописанной методике.

Субстратом реакции гидролиза ДНК *Chlamydia trachomatis* под влиянием IgG послужила ДНК, полученная путем амплификации. Модифицированный, клонированный в плазмиде, фланкированный праймерами СТ-1, СТ-2, выбранными в области генома криптоической плазмиды, фрагмент ДНК *Chlamydia trachomatis* амплифицировали по протоколу производителя тест-системы. Реакционная смесь состояла из 0,01 мл ДНК *Chlamydia trachomatis*, 0,01 мл IgG в концентрации 1 мг/мл или 0,01 мл 0,9% раствора NaCl в контро-

ле и 0,01 мл буферного раствора 0,02 М Трис-НСl pH 7,4 с 0,01М MgCl₂. Инкубацию проводили 20 часов при 37 °С. Результаты оценивались методом электрофореза.

Также было произведено определение ДНКазной активности иммуноглобулинов с использованием смеси синтезированных нами согласно стандартному протоколу ПЦР-продуктов stx2e (733 пары оснований) и aggR (100 пар оснований).

ПЦР продукты представляют собой последовательности ДНК, соответствующие определенным генам кишечной палочки, stx2e представляет собой ген, кодирующий Shiga токсин 2Е [6], последовательность нуклеотидов aggR является транскрипционным регулятором энтеро-агрегативных штаммов *Escherichia coli* (ЕАЕС) [11].

Реакционная смесь (0,3 мл) состояла из 0,1 мл смеси ПЦР-продуктов, 0,1 мл препарата поликлональных IgG в концентрации 1 мг/мл или 0,1 мл 0,9% раствора NaCl в контрольной пробе и 0,1 мл буферного раствора 0,02 М Трис-НСl pH 7,4 с 0,01 М MgCl₂. Субстратно-буферная смесь инкубировалась в течение 20 часов при 37 °С. Результаты оценивались путем электрофореза в агарозном геле согласно вышеописанной методике.

Результаты

При исследовании ДНКазной активности методом риванолового сгустка у пациентов с РА установлено наличие ДНКазной активности иммуноглобулинов, уровни которой превышают ($p < 0,01$) контрольные величины. ДНКазная абзимная активность у пациентов с РА превышает ($p < 0,01$) значения данной активности у пациентов с РеА (табл. 1).

Выявлена взаимосвязь ($p < 0,05$) между ДНКазной активностью поликлональных IgG и оценкой общего состояния здоровья пациентом по ВАШ ($r = 0,27$), оценкой активности заболевания по шкале Ликкерт ($r = 0,30$), а также между

удельной ДНКазной активностью поликлональных IgG и уровнем СОЭ ($r = 0,42$). При оРеА отмечена зависимость ($p < 0,05$) между ДНКазной активностью поликлональных IgG и уровнем ЦИК ($r = 0,42$), количеством Т-лимфоцитов ($r = 0,40$).

На рисунке 1 приведены результаты электрофореза продуктов реакции гидролиза ДНК под действием 3 препаратов (продукты реакции № 1-3) поликлональных иммуноглобулинов. Данные препараты были выделены от разных пациентов с ревматоидным артритом и обладали высокой (5 баллов) ДНКазной активностью, определенной методом риванолового сгустка. При электрофорезе в 1,5% агарозном геле наблюдалось разделение субстрата на высоко- и низкополимерную фракции (рис. 1 – 1, 4, 7). После 20 часов инкубации происходил полный гидролиз обеих фракций субстрата с образованием так называемого «шмера» (рис. 1 – 3, 6, 9).

На рисунке 2 представлены результаты оценки ДНКазной активности IgG, выделенных из сыворотки крови пациентов с ревматоидным артритом в отношении плазмидной ДНК *E. coli*. Исследуемые образцы IgG обладали различной способностью гидролизовать данный субстрат. Так, образец IgG одного пациента с рРА (рис. 2 – 4) полностью гидролизировал ДНК в течение 20 часов инкубации. Три других образца IgG (рис. 2 – 2, 3, 5) в большей степени воздействовали на суперскрученную фракцию плазмидной ДНК, приводя к образованию одноцепочечных разрывов и перехода суперскрученной ДНК в релаксированную форму по сравнению с контрольным образцом (рис. 2 – 1) в течение 20 часов.

При исследовании способности IgG гидролизовать ДНК *Chlamydia trachomatis* также принимали во внимание свойство молекулы ДНК изменять подвижность в агарозном геле в результате случайных одно- и двухцепочечных разрывов.

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ДНКазной АКТИВНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ IgG

TABLE 1. DNase ACTIVITY LEVELS OF POLYCLONAL IgGs

Группы обследованных лиц Groups of involved patients	Уровни ДНКазной активности поликлональных IgG, баллы DNase activity of polyclonal IgG, units		
	Количество пациентов Patient number	Me (95% ДИ) Me (95% CI)	Range (Min-Max)
РА RA	64	4,00 (3,50;4,50)	3,00-5,00
РеА ReA	55	2,50 (2,00;3,00)	0,50-4,50
Здоровые лица Healthy controls	40	0,00 (0,00;0,50)	0,00-2,00

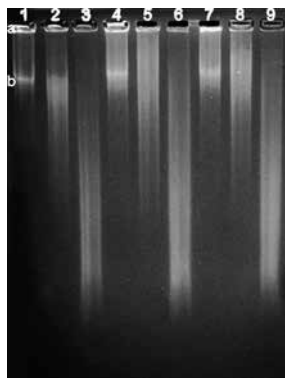


Рисунок 1. Электрофорез в 1,5% агарозном геле продуктов реакции гидролиза ДНК тимуса теленка под действием поликлональных IgG

Примечание. 1 – субстратно-буферная смесь № 1 без инкубации (контроль), 2 – продукты реакции гидролиза ДНК № 1 через 5 часов инкубации, 3 – продукты реакции № 1 через 20 часов инкубации, 4 – субстратно-буферная смесь № 2 без инкубации (контроль), 5 – продукты реакции гидролиза ДНК № 2 через 5 часов инкубации, 6 – продукты реакции № 2 через 20 часов инкубации, 7 – субстратно-буферная смесь № 3 без инкубации (контроль), 8 – продукты реакции гидролиза ДНК № 2 через 5 часов инкубации, 9 – продукты реакции № 3 через 20 часов инкубации, а – высокополимерная фракция ДНК, б – низкополимерная фракция ДНК.

Figure 1. 1.5% Agarose gel electrophoresis of calf thymus DNA hydrolysis products induced by polyclonal IgG

Note. 1, substrate-buffer mixture No. 1 without incubation (control); 2, products of DNA sample No. 1 hydrolysis after 5 hours of incubation; 3, reaction products of sample No. 1 after 20 hours of incubation; 4, substrate-buffer mixture No. 2 without incubation (control); 5, products of the DNA hydrolysis reaction No. 2 after 5 hours of incubation; 6, reaction products of sample No. 2 after 20 hours of incubation; 7, substrate-buffer mixture No. 3 without incubation (control); 8, products of DNA hydrolysis reaction No. 2 after 5 hours of incubation; 9, reaction products of the sample No. 3 after 20 hours of incubation; a, high-molecular DNA fraction; b, low-molecular polymer fraction of DNA.

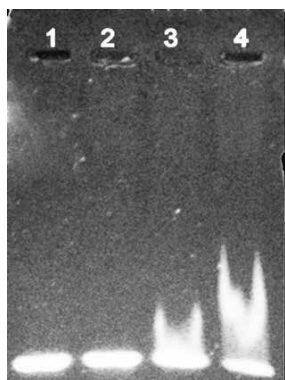


Рисунок 3. Результаты электрофореза продуктов распада ДНК Chlamydia trachomatis под действием IgG

Примечание. 1 – контрольный образец, 2 – продукты реакции IgG донора с ДНК Chlamydia trachomatis, 3, 4 – продукты реакции IgG пациентов с ревматоидным артритом с ДНК Chlamydia trachomatis.

Figure 3. Results of Chlamydia trachomatis DNA electrophoresis after hydrolysis by IgG

Note. 1, control sample; 2, donor IgG incubated with Chlamydia trachomatis DNA reaction products; 3, 4, DNA hydrolysis products obtained with IgG of patients with rheumatoid arthritis.

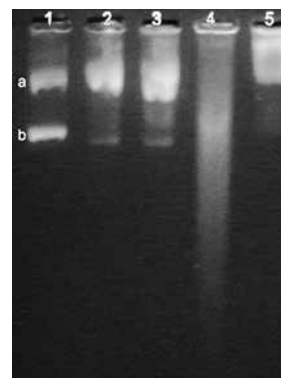


Рисунок 2. Результаты электрофореза продуктов распада плазмидной ДНК E. coli под действием IgG

Примечание. 1 – контрольный образец, 2, 3, 4, 5 – продукты реакции IgG с плазмидной ДНК, а – релаксированная фракция ДНК, б – суперскрученная фракция ДНК.

Figure 2. Results of E. coli plasmid DNA electrophoresis after hydrolysis by IgG

Note. 1, control sample; 2, 3, 4, 5, IgG reaction products with plasmid DNA; a, relaxed DNA fraction; b, supercoiled DNA fraction.

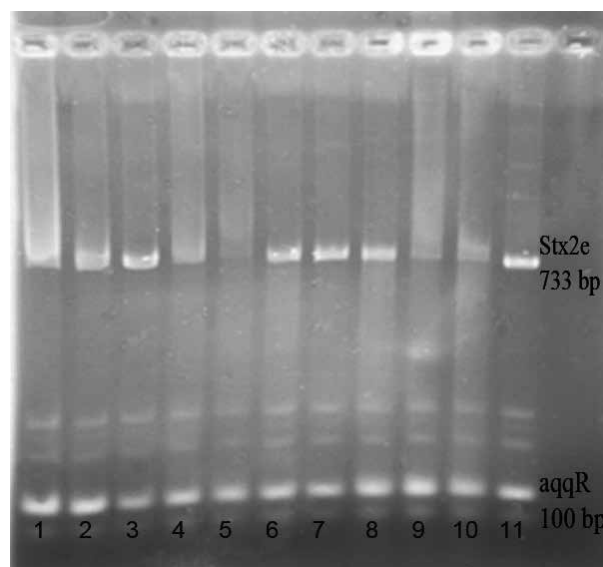


Рисунок 4. Результаты электрофореза продуктов распада ДНК ПЦР-продуктов под действием IgG

Примечание. 1-5 – продукты реакции IgG пациентов с ревматоидным артритом со смесью ПЦР-продуктов, 6-10 – продукты реакции IgG пациентов с реактивным артритом со смесью ПЦР-продуктов, 11 – отрицательный контроль.

Figure 4. Results of the of PCR- products electrophoresis after DNA hydrolysis induced by IgG

Note. 1 to 5, Results of IgG treatment (rheumatoid arthritis patients) upon a mixture of PCR products; 6 to 10, Results of IgG treatment from patients with reactive arthritis upon a mixture of PCR products; 11, negative control.

В опытных образцах наблюдали изменение подвижности амплифицированной ДНК *Chlamydia trachomatis* вследствие конформационных изменений (рис. 3 – 3, 4), в то время как в образце донора и контрольном образце ДНК мигрировала одной полосой (рис. 3 – 1, 2).

При исследовании способности иммуноглобулинов G гидролизовать ПЦР-продукты наблюдались неоднородные результаты реакции (рис. 4). Во-первых, разные препараты иммуноглобулинов демонстрировали различную степень гидролиза ДНК. Препараты 1, 4, 5 и 9 (рис. 4) полностью гидролизовали stx2e продукт с образованием «шмера». Препараты 2 и 10 гидролизовали данный ПЦР-продукт в меньшей степени. Гидролиз stx2e препаратами 3, 6, 7, 8 (рис. 4) был сопоставим с отрицательным контролем (рис. 4 – 11). Во-вторых, препараты иммуноглобулинов в меньшей степени гидролизовали короткий, длиной в 100 пар оснований aggR-продукт. Вероятно, это обусловлено избирательной способностью иммуноглобулинов гидролизовать ДНК-последовательности не короче определенной длины.

Обсуждение

Появление антител, обладающих ДНКазной активностью при аутоиммунных заболеваниях полностью не изучено. Феномен появления дезоксирибонуклеазной активности иммуноглобулинов при ревматических заболеваниях открывает новые иммуно-патогенетические механизмы, лежащие в основе хронического иммуноопосредованного воспаления. В данной работе мы продемонстрировали наличие неоднородной ДНКазной активности иммуноглобулинов по отношению к разным субстратам. Помимо ДНК тимуса телят, мы использовали бактериальную плазмидную ДНК и ПЦР продукты, синтезированные на основе бактериальных генов.

Учитывая значимое, но не прямое влияние инфекционных антигенов на развитие аутоиммунного процесса, следует предположить, что появление ДНКазных антител может быть спровоцировано повышением концентрации бактериальной ДНК в плазме крови. Известно, что бактериальная ДНК отличается от эукариотической большим содержанием гипометилированных CpG последовательностей. Установлено, что пациенты с СКВ имеют повышенные уровни циркулирующей ДНК, содержащей гипометилированные CpG-мотивы [8].

В свою очередь гипометилированные CpG последовательности ДНК активируют В-клетки через Toll-like рецептор 9. При этом запускается каскад реакций, который включает не только по-

ликлональную активацию В-клеток, но и секрецию провоспалительных цитокинов и устойчивость к апоптозу, что обуславливает выживание аутореактивных клеток при ревматоидном артрите и СКВ [13]. Недавно было установлено, что интерферон- γ играет важную роль в запуске синтеза антител В-клетками после активации CpG ДНК [12]. В то же время оказалось, что по содержанию неметилованных CpG транскрибируемый участок рибосомальной ДНК идентичен бактериальной ДНК и может подобным образом взаимодействовать с Toll-like рецептором 9 [17]. Это взаимодействие по принципу молекулярной мимикрии может лежать в основе выработки аутоантител к собственным рибонуклеопротеинам, а также провоцировать появление ДНКазных абзимов.

Оказалось, что CpG инициируют транскрипцию генов зародышевой линии C(gamma)1, C(gamma)2, и C(gamma)3 в активированных В-клетках через TLR9-опосредованный NF- κ B-зависимый путь, взаимосвязанный с IL-10 через STAT-белки и IFN-запускаемые факторы. Транскрипция C(gamma) гена вызывает повышение активности цитидин-деиминазы, ключевого элемента в механизме переключения классов иммуноглобулинов в В-клетках [14]. Таким образом, CpG ДНК, высвобождаемая при инфекционном процессе, может стимулировать аутоиммунные сдвиги путем переключения аутореактивных В-клеток с IgM на IgG изотип [7]. Кроме того, установлено, что этот каскад ингибируется хлорохином – препаратом, который снижает выраженность клинических проявлений IgG-опосредованных аутоиммунных заболеваний и в настоящее время используется в лечении СКВ и РА.

Учитывая эти сложные взаимосвязанные патогенетические пути, обнаружение дополнительных свойств иммуноглобулинов существенно расширяет представление о механизмах аутоиммунного воспаления. Нами обнаружена способность иммуноглобулинов гидролизовать различные ДНК-субстраты у пациентов с ревматоидным и реактивным артритом. Полученные данные о неоднородной способности ДНКазных абзимов гидролизовать разные ДНК-субстраты указывают на их определенную специфичность, особенно в отношении бактериальной ДНК. Для более детального изучения феномена ДНКазной активности необходимо исследовать профили специфичности к разным ДНК-субстратам для каждой нозологической формы, разработать методы количественного определения степени гидролиза. Это в дальнейшем позволит более детально изучить влияние определенных микроорганизмов в патогенезе аутоиммунных заболе-

ваний. Кроме этого, оптимизация определения ДНКазной активности позволит усовершенствовать имеющиеся и разработать новые диагностические методы.

Выводы

1. В сыворотке пациентов с ревматоидным артритом, реактивным артритом присутствуют

антитела, обладающие дезоксирибонуклеазной активностью.

2. ДНКазные абзимы проявляют гетерогенную способность гидролизовать различные ДНК-субстраты.

3. Абзимный гидролиз ДНК-субстратов длиной более 700 пар оснований более выражен по сравнению с ДНК-субстратами короткой (100 пар оснований) длины.

Список литературы / References

1. Волкова М.В., Кундер Е.В., Генералов И.И. Ферментативная активность антител при ранних артритах: патогенетическая роль и диагностические перспективы // Лечебное дело, 2014. Т. 40, № 6. С. 31-40. [Volkova M.V., Kunder E.V., Generalov I.I. Enzymatic activity of antibodies in early arthritis: pathogenetic role and diagnostic perspectives. *Lechebnoe delo = Medicine*, 2014, Vol. 40, no. 6, pp. 31-40. (In Russ.)]
2. Волкова М.В., Кундер Е.В., Генералов И.И. Нуклеазная активность поликлональных иммуноглобулинов класса G у пациентов с ранним ревматоидным артритом // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2012. № 1. С. 12-18. [Volkova M.V., Kunder E.V., Generalov I.I. Nuclease polyclonal IgG activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Immunopatologiya. Allergologiya = International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2012, no. 1, pp. 12-18. (In Russ.)]
3. Конорев М.Р., Генералов И.И., Жильцов И.В., Генералова А.Г. Способ очистки иммуноглобулинов класса G из сыворотки крови и устройство для аффинной хроматографии: пат. 3205 Респ. Беларусь, МПК 6G 01 N 33/48; заявитель Витебск. гос. мед. инст-т. – заявл. 05.02.96; опубл. 30.12.99 // Официальный бюллетень Национального центра интеллектуальной собственности, 1999. № 3. С. 121. [Konorev M.R., Generalov I.I., Zhiltsov I.V., Generalova A.G. A method for purifying class G polyclonal immunoglobulins from blood serum and an affinity chromatography device. Patent. 3205 Belarus, 6G 01 N 33/48. *Ofitsial'nyy byulleten Natsionalnogo tsentra intellektualnoy sobstvennosti = Vitebsk State Medical Institute. Applic.* 05.02.96; publ. 30.12.99. *Official Bulletin of National center of intellectual property*, 1999, no. 3, p. 121. (In Russ.)]
4. Кундер Е.В., Волкова М.В., Генералов И.И., Невинский Г.А. Клинико-патогенетическая и диагностическая значимость дезоксирибонуклеазной активности поликлональных IgG и сыворотки крови при спондилоартритах // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 337-346. [Kunder E.V., Volkova M.V., Generalov I.I., Nevinsky G.A. Clinical and diagnostic significance of deoxyribonuclease activity of polyclonal IgG and blood sera in patients with spondyloarthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no 4-5, pp. 337-346. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-337-346.
5. Черепанова А.В., Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Активность дезоксирибонуклеаз крови в норме и при патологии // Биомедицинская химия, 2007. Т. 53, № 5. С. 488-496. [Cherepanova A.V., Tamkovich S.N., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Blood deoxyribonuclease activity in health and diseases. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 2007, Vol. 53, no. 5, pp. 488-496. (In Russ.)]
6. Beutin L., Kruger U., Krause G., Miko A., Martin A., Strauch E. Evaluation of major types of Shiga toxin 2E-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs, and the environment as potential pathogens for humans. *Appl. and Environment. Microbiol.*, 2008, Vol. 74, no. 15, pp. 4806-4816.
7. He B., Qiao X., Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 7, pp. 4479-4491.
8. Krieg A.M. CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? *J. Clin. Immunol.*, 1995, Vol. 5, no. 6, pp. 284-292.
9. Kundzer A.V., Volkava M.V., Bogdanos P., Rodiger S., Schierack P., Generalov I., Nevinsky G.A., Roggenbuck D. DNase activity of polyclonal IgG – a putative serological marker in patients with spondyloarthritides. *Immunol. Res.*, 2013, Vol. 56, no. 2-3, pp. 457-464.
10. Martinez-Valle F., Balada E., Ordi-Ros J., Bujan-Rivas S., Sellas-Fernandez A., Vilardell-Tarres M. DNase 1 activity in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with epidemiological, clinical, immunological and therapeutic features. *Lupus*, 2009, Vol. 18, pp. 418-442.
11. Morin N., Araceli E. Santiago, Robert K. Ernst, Stacey J. Guillot, Nataro J. Characterization of the AggR Regulon in Enterococcal *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 2013, Vol. 81, no. 1, pp. 122-132.
12. Oganessian G., Saha S.K., Pietras E.M., Guo B., Miyahira A.K., Zarnegar B., Cheng G. IRF3-dependent type I interferon response in B cells regulates CpG-mediated antibody production. *J. Biol. Chem.*, 2008, Vol. 283, no. 2, pp. 802-808.
13. Rudnicka W., Burakowski T., Warnawin E., Jastrzebska M., Bik M., Kontny E., Chorazy-Massalska M., Radzikowska A., Buler M., Maldyk P., Maslinski W. Functional TLR9 modulates bone marrow B cells from rheumatoid arthritis patients. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 5, pp. 1211-1220.

14. Rutz M., Metzger J., Gellert T., Lippa P., Lipford G.B., Wagner H., Bauer S. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.*, 2004, Vol. 34, no. 9, pp. 2541-2550.
15. Schourov D.V., Gololobov G.V., Makarevich O.I., Yadav R.P., Chernova E.A., Nevinsky G.A., Prokaeva T.B., Alekberova Z.S., Gabibov A.G. DNA-hydrolyzing autoantibodies in autoimmune pathologies. *Ann. of the New York Academy of Sciences*, 2005, Vol. 750, pp. 255-264.
16. Tsukumo S., Yasutomo K. DNase I in pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.*, 2004, Vol. 113, pp. 14-18.
17. Veiko N.N., Shubaeva N.O., Ivanova S.M., Speranskii A.I., Lyapunova N.A., Spitkovskii D.M. Blood serum DNA in patients with rheumatoid arthritis is considerably enriched with fragments of ribosomal repeats containing immunostimulatory CpG-motifs. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2006, Vol. 142, no. 3, pp. 313-316.
18. Volkava M.V., Kundzer E.V., Generalov I.I. Enzymatic DNase and hyaluronidase serum activity in patients with early arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013, Vol. 72, Suppl. 3, p. 376.

Авторы:

Волкова М.В. — к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории ГУО «Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь

Кундер Е.В. — д.м.н., профессор, профессор кафедры кардиологии и ревматологии ГУО «Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь

Генералов И.И. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической микробиологии УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Петрович Д.М. — соискатель кафедры кардиологии и ревматологии ГУО «Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь

Authors:

Volkova M.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, The Research Laboratory, Belorussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Kunder A.V., PhD (Medicine), Professor, Professor, Department of Cardiology and Rheumatology, Belorussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Generalov I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Microbiology, Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Petrovich D.M., Postgraduate Student, Department of Cardiology and Rheumatology, Belorussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Поступила 09.02.2017
Отправлена на доработку 22.02.2017
Принята к печати 02.05.2017

Received 09.02.2017
Revision received 22.02.2017
Accepted 02.05.2017

ПЕРВЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОК СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЛИПОАСПИРАТА У ПАЦИЕНТОВ С ГОНАРТРОЗОМ

Шевела Е.Я., Ница Н.А., Старостина Н.М., Баранов С.И.,
Кожевников Ю.А., Попова Н.Д., Баторов Е.В., Останин А.А.,
Черных Е.Р.

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

Резюме. В работе представлены результаты клинической апробации аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции (СВФ) у пациентов с деформирующим остеоартрозом (ДОА) коленных суставов II–III стадии по Kellgren–Lawrence. В пилотное исследование были рекрутированы 6 больных с ДОА коленных суставов (3 мужчин и 3 женщины; медиана возраста 64 года) с давностью заболевания 7 лет. Пациентам однократно, под УЗИ-навигацией, вводили аутологичные клетки СВФ в средней дозе $16,8 \pm 0,9 \times 10^6$ /сустав. Внутрисуставное введение клеток СВФ не вызывало развития аллергических, токсических или воспалительных реакций. Анкетирование пациентов через 1 мес. после введения клеток СВФ выявило снижение выраженности болевого синдрома, оцениваемого по визуально-аналоговой шкале (ВАШ) и специализированной 100-балльной шкале KOOS (подшкала «Боль») ($p < 0,05$ по обеим шкалам). Более того, пациенты отметили улучшение функциональной активности суставов и качества жизни, связанного с пораженными суставами по шкале KOOS ($p < 0,05$). Положительная клиническая динамика сохранялась при наблюдении до 6 мес. УЗИ суставов продемонстрировало увеличение толщины гиалинового хряща через 3 (в 73% случаев) и 6 мес. (в 82%). Проведенное нами пилотное исследование показало безопасность и хорошую переносимость внутрисуставного введения аутологичных клеток СВФ у пациентов с выраженными проявлениями ДОА. Полученные результаты свидетельствуют также о значительном противовоспалительном эффекте аутологичных клеток СВФ жировой ткани, проявляющемся на ранних этапах клеточной терапии. Потенциальную возможность стимулирующего влияния клеток СВФ на регенерацию поврежденных суставов предполагается оценить при дальнейшем наблюдении.

Ключевые слова: стромально-васкулярная фракция, остеоартроз, шкала ВАШ, шкала KOOS

Адрес для переписки:

Шевела Екатерина Яковлевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: shevelak@mail.ru

Address for correspondence:

Shevela Ekaterina Ya.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 228-21-01.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: shevelak@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Я. Шевела, Н.А. Ница, Н.М. Старостина, С.И. Баранов,
Ю.А. Кожевников, Н.Д. Попова, Е.В. Баторов,
А.А. Останин, Е.Р. Черных «Первые клинические
результаты применения клеток стромально-васкулярной
фракции липоаспираата у пациентов с гонартрозом»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 779–788.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-779-788
© Шевела Е.Я. и соавт., 2017

For citation:

E.Ya. Shevela, N.A. Nitsa, N.M. Starostina, S.I. Baranov,
Yu.A. Kozhevnikov, N.D. Popova, E.V. Batorov, A.A. Ostanin,
E.R. Chernykh “Preliminary clinical results with lipoaspirate
stromal vascular cell fraction in treatment of patients with knee
osteoarthritis”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 779–788.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-779-788
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-779-788

PRELIMINARY CLINICAL RESULTS WITH LIPOASPIRATE STROMAL VASCULAR CELL FRACTION IN TREATMENT OF PATIENTS WITH KNEE OSTEOARTHRITIS

Shevela E.Ya., Nitsa N.A., Starostina N.M., Baranov S.I.,
Kozhevnikov Yu.A., Popova N.D., Batorov E.V., Ostanin A.A.,
Chernykh E.R.

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

Abstract. The paper presents results of clinical application of autologous stromal-vascular fraction (SVF) cells in patients with degenerative osteoarthritis (OA) of the knee, grade II and III (Kellgren–Lawrence scale). We recruited six patients with knee OA (3 men and 3 women; median age 64 years) with mean disease duration of 7 years. All the patients were administered a single intra-articular injection of autologous nucleated SVF cells at an average dose of $16.8 \pm 0.9 \times 10^6$ per joint (a total of 11 joints). The patients did not experience any serious side effects (allergic, toxic or inflammatory) related to the knee injection. Patient surveys at 1 month after SVF administration revealed a decrease in the severity of pain, as measured by a visual analog scale (VAS) and a specialized 100-point scale KOOS (subscale "pain") ($p < 0.05$ on both scales). Moreover, the patients reported improvement in the joint functions and quality of life related to affected joints on a KOOS scale ($p < 0.05$). These positive clinical changes persisted during 6 month follow up. Significant improvements were noted in ultrasound findings, with increased thickness of the cartilage layer at 3 months (in 73% of cases) and at 6 months (in 82%). Our pilot study demonstrated the safety and tolerability of intra-articular injection of autologous SVF cells in patients with moderate to severe OA. The results obtained also indicate a significant antiinflammatory effect of autologous adipose tissue SVF cells, which is manifested at the early stages of cell therapy. Our further investigations will be focused on exploring the SVF stimulatory effects on regeneration of damaged joints.

Keywords: stromal-vascular fraction, osteoarthritis, VAS scale, KOOS scale

Введение

Остеоартриты (в отечественной медицине используется термин «остеоартроз», «деформирующий остеоартроз», ДОА) характеризуются дегенерацией суставного хряща, склерозом субхондральной кости и формированием маргинальных остеофитов. Среди всех нозологических форм патологии суставов ДОА составляет 55%. По данным эпидемиологических исследований, ДОА различной локализации страдают 1-2% населения до 45 лет и 15-85% людей старшего возраста [1].

Основными клиническими проявлениями ДОА являются боль и ограничение функции, а также патологические изменения структуры сустава, что является причиной снижения качества жизни, особенно при поражении крупных суставов. Несмотря на мультифакториальность заболевания, важнейшим этиопатогенетическим фактором дегенеративного поражения суставов является воспаление. Признаки воспаления наблюдаются как на ранних, так и на поздних стадиях ДОА. При этом воспаление синовиальной

мембраны сопровождается повышением уровня провоспалительных медиаторов, включая цитокины (TNF, IL-12, IL-6, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, LIF, IL-8), оксид азота, ПГЕ₂, и ассоциируется с повреждением прилегающей хрящевой ткани [17, 30].

Низкая способность суставного хряща к самовосстановлению существенно ограничивает возможности лечения пациентов с ДОА [34]. Традиционно используемые нестероидные противовоспалительные препараты и глюкокортикостероиды подавляют воспаление и достаточно эффективны в купировании болевого синдрома, однако не способны стимулировать регенеративные процессы в поврежденном хряще. Кроме того, препараты этих групп, даже при использовании в терапевтических дозах, нередко вызывают развитие серьезных побочных реакций. Операции по протезированию суставов также относительно часто ассоциируются с серьезными и опасными для жизни осложнениями, включая повышенный риск инфекции, тромбоземболии, ин-

фаркта миокарда, инсульта, а также ограниченным сроком службы протеза.

Одно из новых направлений в лечении ДОА связано с использованием клеточных технологий, основанных на использовании стволовых клеток. Наиболее перспективными кандидатами являются мультипотентные мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (МСК), которые обладают выраженным противовоспалительным и регенераторным потенциалом [8, 10, 15, 18, 19, 22]. Распространенными источниками этих клеток являются костный мозг и жировая ткань, причем жировая ткань обладает рядом преимуществ [9]. Так, количество МСК, которые можно выделить из жировой ткани, в 100–1000 раз превышает их количество, содержащееся в эквивалентном объеме костного мозга [2]. Кроме того, выделенные из жировой ткани МСК генетически более стабильны в течение длительного срока культивирования, отличаются более низким коэффициентом старения и высокой пролиферативной активностью [3, 31]. Жировая ткань может быть легко получена при проведении стандартной процедуры липосакции под местной анестезией, а методы липотрансфера широко используются в современной пластической хирургии. Кроме того, стромально-васкулярная фракция (СВФ) липоаспирата является богатым источником не только МСК, но и других типов клеток, участвующих в регенерации тканей, например, предшественников эндотелиальных клеток, преадипоцитов, фибробластов, тучных клеток, макрофагов, Т- и В-лимфоцитов [13, 31]. Клетки СВФ оказывают противовоспалительный и иммуномодулирующий эффекты; кроме того, содержащиеся в СВФ МСК способны дифференцироваться в клетки соединительной ткани, включая хрящи, сухожилия и связки [32]. Существенным преимуществом можно также считать возможность использования свежесодержанных клеток СВФ, не подвергавшихся культуральной экспансии, поскольку манипуляции *in vitro* могут привести к генетическим и эпигенетическим изменениям, способным повлиять на функциональные и биологические свойства клеток.

Доклинические исследования на животных показали безопасность и эффективность клеток СВФ в лечении ДОА, хрящевых дефектов или других ортопедических заболеваний [3, 23, 29]. Немногочисленные пилотные исследования продемонстрировали хорошую переносимость, безопасность, а также клиническую эффективность СВФ у пациентов с ранними стадиями ДОА [6, 13, 16, 25].

Настоящее исследование было предпринято с целью клинической апробации аутологичных

клеток СВФ у пациентов с длительно текущим ДОА коленных суставов (гонартроз), II–III ст. по Kellgren–Lawrence.

Материалы и методы

Пациенты

Набор пациентов в исследование проводился в соответствии с протоколом (NCT 02967874, clinicaltrials.gov), одобренным локальным этическим комитетом НИИФКИ. Критерии включения: 1) лица обоих полов в возрасте от 40 до 85 лет; 2) наличие первичного деформирующего остеоартроза (ДОА) 1–2 коленных суставов (Rg стадия 2–3 по Kellgren–Lawrence), верифицированного клинически и рентгенологически; 3) возможность проведения липосакции; 4) наличие письменного информированного согласия. Критерии исключения: 1) выраженная декомпенсированная сердечно-сосудистая, дыхательная, печеночная, почечная недостаточность; 2) аутоиммунные заболевания; 3) острые инфекционные заболевания; 4) психические заболевания; 5) аллергия на препараты для местного обезболивания; 6) использование кортикостероидных препаратов в предшествующие 4 недели; 7) наличие противопоказаний для проведения пункции суставов, включая эндопротезирование суставов.

Получение клеток СВФ

Жировую ткань (липоаспират) получали при проведении операции липосакции. Липоаспират интенсивно отмывали холодным физиологическим раствором, забуференным фосфатами (ЗФР; «Биолот», Россия), после чего подвергали ферментативной диссоциации с помощью 0,1% раствора коллагеназы 1А типа (Sigma-Aldrich, США) в течение 45 минут при 37 °С и периодическом встряхивании. По окончании инкубации проводили инактивацию фермента и двукратную отмывку клеточной суспензии с помощью физиологического раствора. Нерасщепленные фрагменты жировой ткани удаляли фильтрованием через нейлоновые фильтры (размер пор 100 µm). Полученные таким образом ядродержащие клетки так называемой стромально-васкулярной фракции (СВФ) ресуспендировали в физиологическом растворе, подсчитывали количество и определяли жизнеспособность (по исключению трипанового синего; Sigma-Aldrich, США).

Процедура исследования

Клетки СВФ вводили однократно интраартикулярно под УЗИ-навигацией в объеме 3 мл клеточной взвеси на сустав. Обследование больных проводили до введения клеток и через 1, 3, 6 мес. после введения клеток. Оценка безопасности включала физикальное обследование и ана-

лиз нежелательных событий (аллергические, токсические, воспалительные реакции). При анализе клинической эффективности использовали оценку выраженности болевого синдрома с помощью визуально-аналоговой шкалы боли (ВАШ) и оценку состояния пораженных суставов и качества жизни по KOOS (Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score; www.koos.nu), а также данные УЗИ суставов.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде средних значений (М) и стандартной ошибки (S.E.), а также в виде медианных значений (Me) и интерквартильного диапазона (IQR, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ квартили). Уровень статистической значимости различий определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Характеристика пациентов

В исследование были рекрутированы 6 пациентов (3 мужчин и 3 женщины в возрасте от 50 до 82 лет; медиана 64 года) с первичным ДОО опорных суставов (гонартроз), Rg стадия II ($n = 2$) и II-III ($n = 4$), НФС II ст ($n = 6$). Давность заболевания $8,6 \pm 3,2$ лет (Me 7, IQR 4-8) (табл. 1).

Для оценки функционального состояния пораженных суставов и качества жизни использовали специализированную 100-балльную шкалу для коленного сустава KOOS, которая позволяет оценить боль, другие симптомы заболевания (отек, ограничение объема движений), повседневную активность, возможность занятия спортом/отдыхом, а также уровень качества жизни, связанный с пораженным суставом. Расчет баллов по шкале KOOS проводили на основе анкетирования пациентов, при этом 100 баллов

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ, ВКЛЮЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ

TABLE 1. THE CHARACTERISTIC OF PATIENTS RECRUITED IN THE STUDY

№	Пол Sex	Возраст Age	Стадия Grade	НФС JFD	Давность, годы OA duration, years	Сопутствующие заболевания Comorbidities
1	М М	50	II	II	1,5	АГ II ст., риск 3. Дислипидемия. Жировой гепатоз Systemic arterial hypertension (SAH), stage II. Dyslipidemia. Hepatic steatosis
2	Ж F	59	II-III	II	4	АГ I ст., риск 2 SAH, stage I
3	М М	59	II-III	II	8	АГ II ст., риск 3. ХНБ, ремиссия. ДН 0 SAH, stage II. CNOB, clinical remission
4	Ж F	67	III-IV	II	6	ГБ II ст, АГ III ст., риск 4. Дислипидемия. Атеросклероз аорты. ХСН I, ФК I. ХЦИ I ст. Ожирение 3 ст. SAH, stage III. Dyslipidemia. CHD. CHF, stage I. CCI, stage I. Obesity, class 3
5	Ж F	67	II	II	24	АГ II ст., риск 4. СД II типа. Ожирение 3 ст. SAH, stage II. Diabetes mellitus. Obesity, class 3
6	М М	82	II-III	II	8	ИБС. ГБ II ст, I степ, риск 4. ХСН I. ХПН 1 CHD. SAH, stage II. CHF, stage I. CRF, stage I

Примечание. НФС – недостаточность функции сустава, АГ – артериальная гипертензия; ГБ – гипертоническая болезнь; ИБС – ишемическая болезнь сердца; СД – сахарный диабет; ХНБ – хронический необструктивный бронхит; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; ДН – дыхательная недостаточность; ХЦИ – хроническая церебральная ишемия; ХПН – хроническая почечная недостаточность.

Note. Joint functional disability (JFD); systemic arterial hypertension (SAH); cardiovascular disease (CVD); coronary heart disease (CHD); chronic heart failure (CHF); chronic renal failure (CRF); chronic cerebral ischemia (CCI); chronic non-obstructive bronchitis (CNOB).

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ ПО ШКАЛАМ ВАШ И KOOS

TABLE 2. INDIVIDUAL VALUES OF VAS AND KOOS SCORES

№	ВАШ VAS	KOOS*				
		Симптомы Symptoms	Боль Pain	Повседневная активность Activities of daily living	Спорт и отдых Sport and recreation	Качество жизни Quality of life
1	3	43	56	77	35	19
2	6	46	42	47	15	13
3	5	43	39	54	25	19
4	6	61	61	66	10	19
5	8	71	53	53	50	31
6	8	43	53	56	35	19
n = 6	6±0,77 (6; 5-8)	51±4,9 (45; 43-61)	50±3,5 (53; 42-56)	59±4,3 (55; 53-66)	28±4,9 (30; 15-35)	20±2,5 (19; 12-25)

Примечание. * – данные представлены в виде нормализованных значений, рассчитанных как процент от максимально возможного балла по соответствующей подшкале KOOS: индивидуальные значения, M±SEM, медиана и интерквартильный диапазон (в скобках).

Note. *, the data are presented as normalized values, calculated as a percentage of the maximum possible score for each KOOS subscale: individual values, M±SEM, median and interquartile range (in brackets).

свидетельствовали об отсутствии симптомов, 0 баллов — об их резкой выраженности. Полученные данные суммированы в таблице 2.

Видно, что исходно пациенты с ДОО характеризовались наличием выраженного болевого синдрома (Me 7 по ВАШ), а также значительным снижением функций коленных суставов, вовлеченных в патологический процесс, что вызывало существенные затруднения в выполнении повседневной деятельности и приводило к снижению качества жизни пациентов, связанного с пораженным суставом.

Данные физикального обследования и анкетирования дополнялись ультразвуковым исследованием коленных суставов, которое позволяло оценить состояние мягких тканей (наличие или отсутствие отека), гиалинового хряща (толщина, равномерность толщины, структура, поверхность), изменения синовиальной оболочки (утолщение, наличие разрастаний), состояние суставных сумок, заворотов и суставной полости (наличие выпота), суставные поверхности (появление краевых костных остеофитов). Как видно из данных таблицы 3, пациенты с ДОО характеризовались выраженным снижением толщины гиалинового хряща (в норме 3-4 мм), очаговым утолщением синовиальной оболочки (от 1,3 до 3,2 мм) и наличием множественных остеофитов. Кроме того, регистрировалась значительная деформация суставных поверхностей и наличие выпота в незначительном количестве в суставной полости либо в суставных сумках и заворотах.

Оценка безопасности клеток СВФ

Пациентам с ДОО было выполнено однократное внутрисуставное введение аутологичных клеток СВФ в средней дозе $16,8 \pm 0,9 \times 10^6$ (Me $16,4 \times 10^6$; IQR $13-20 \times 10^6$ /сустав) в 3 мл физиологического раствора в один (у одного пациента) или оба (у 5 из 6 пациентов) пораженных сустава. Введение клеток не вызывало развития каких-либо серьезных нежелательных явлений, включая аллергические, токсические или воспалительные реакции. Практически все пациенты отмечали чувство дискомфорта в области коленных суставов через 6-7 часов после введения клеток. В 30% случаев наблюдалось повышение температуры до субфебрильных цифр ($37,2-37,6^\circ\text{C}$). Эти явления проходили самостоятельно в течение первых суток или купировались нестероидными противовоспалительными препаратами. Оценка параметров общего и биохимического анализов крови также не выявила различий с исходными показателями (данные не представлены).

Клиническая эффективность клеток СВФ

Все пациенты, включенные в исследование, были обследованы через 1, 3 и 6 мес. после введения СВФ. Однократное внутрисуставное введение клеток СВФ сопровождалось постепенным снижением болевого синдрома, оцениваемого по шкалам ВАШ и KOOS (подшкала «Боль») (рис. 1). При этом 5 из 6 пациентов отметили уменьшение болевых ощущений уже через 1 мес. после введения клеток ($p < 0,05$ по KOOS), кото-

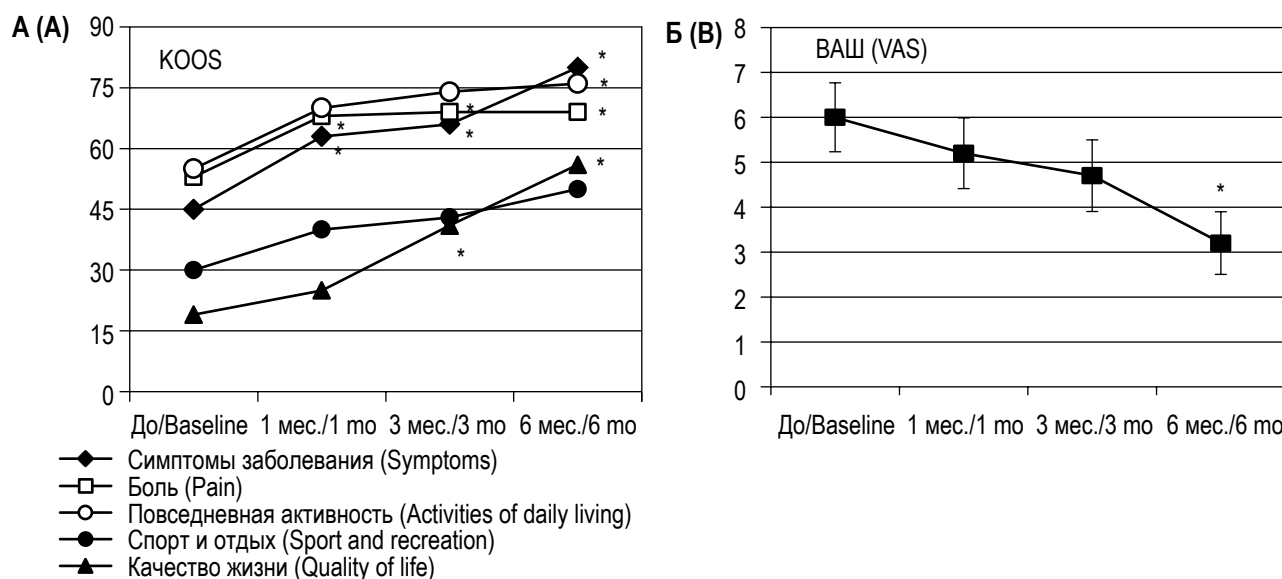


Рисунок 1. Динамика показателей по шкале KOOS и ВАШ при наблюдении до 6 мес. после введения клеток СВФ

Примечание. Данные представлены в виде медианных значений для каждой из подшкал KOOS («Симптомы заболевания», «Боль», «Повседневная активность», «Спорт и отдых», «Качество жизни») и в виде средних значений со стандартной ошибкой для ВАШ. p – достоверность различий по сравнению с исходными значениями (U-критерий Манна-Уитни).

Figure 1. The changes in KOOS and VAS scores from baseline to 6 months

Note. Data are presented as median values for each of the subscales KOOS ("Symptoms", "Pain", "Activities of daily living", "Sport and recreation", "Quality of life") and as mean and standard error for the VAS. * p , significance of changes compared to baseline values (Mann-Whitney U-test).

рое сохранялось до 6 мес. наблюдения. По ВАШ выраженность болевого синдрома постепенно снижалась в течение всего периода наблюдения, достигая двукратного уменьшения к 6 мес. ($p < 0,05$). Анкетирование пациентов по шкале KOOS продемонстрировало также снижение выраженности основных симптомов заболевания (в 1,8 раза, $p < 0,05$), уменьшение затруднений в выполнении повседневной деятельности (в 1,4 раза, $p < 0,05$), повышение возможности занятий спортом (в 1,7 раза) и улучшение качества жизни, связанного с пораженным суставом (в 2,9 раза, $p < 0,05$). При этом клиническое улучшение сопровождалось положительной динамикой по данным УЗИ суставов. Действительно, через 3 мес. после введения клеток СВФ у 5 из 6 пациентов регистрировалось увеличение толщины гиалинового хряща в пораженных суставах (Me с 1,0 мм до 1,5 мм, $p = 0,09$).

Обсуждение

Ядродержащие клетки СВФ, выделенные из жировой ткани, находят все более широкое использование в клинической практике. Терапевтический потенциал клеток СВФ связывают, прежде всего, с высоким содержанием стволовых/стромальных клеток, в частности МСК, которые обладают выраженным трофическим действием благодаря секреции широкого спектра ростовых факторов, цитокинов и хемокинов, необходимых для репарации. Значительная часть клинических

исследований основана на использовании культивированных *in vitro* МСК жировой ткани [11], однако нативная СВФ – как «терапевтическое средство», а не как источник для получения МСК – имеет ряд преимуществ. Одним из основных преимуществ СВФ по сравнению с «чистыми» популяциями стволовых/стромальных клеток, полученных в результате культивирования *in vitro*, является гетерогенность этой фракции. Действительно, наряду с МСК, в образцах СВФ присутствуют различные типы клеток, оказывающих стимулирующий эффект на процессы регенерации и ревазуляризации и обладающих противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами (преадипоциты, предшественники эндотелиальных клеток, макрофаги второго типа и Т-регуляторные клетки) [4, 14, 27]. Согласно критериям, разработанным International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) и International Society for Cellular Therapy (ISCT), клетки СВФ должны иметь жизнеспособность не ниже 70% и экспрессировать следующий иммунофенотип: CD13⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺ (> 40%), CD34⁺ (> 20%), CD31⁺ (< 20%) и CD45⁺ (< 50%) [4].

В нашем исследовании липоаспиранты были получены у всех пациентов из однотипного анатомического региона (передняя брюшная стенка), клетки СВФ выделяли стандартно с помощью коллагеназы I типа, при этом итоговая популяция ядродержащих клеток СВФ по сво-

ТАБЛИЦА 3. УЗИ КОЛЕННЫХ СУСТАВОВ У ПАЦИЕНТОВ ДОО

TABLE 3. ULTRASOUND EXAMINATION OF KNEES IN OA PATIENTS

№	Гиалиновый хрящ Hyaline cartilage		Синовиальная оболочка, мм Synovium, mm	Остеофиты, мм Osteophytes, mm
	Толщина, мм Thickness, mm	Плотность Density		
1	1,2/1,4 1.2/1.4	Плотный/плотный* Dense/dense	3,2/1,9 3.2/1.9	До 1/нет Up to 1/no
2	1,0/1,0 1.0/1.0	Плотный/плотный Dense/dense	1,5/1,7 1.5/1.7	До 2,6/до 3 Up to 2.6/up to 3
3	1,2/1,2 1.2/1.2	Плотный/плотный Dense/dense	1,5/1,3 1.5/1.3	До 5,5/до 4,5 Up to 5.5/up to 4.5
4	1,0/1,0 1.0/1.0	Плотный/плотный Dense/dense	1,6/2,0 1.6/2.0	До 4/до 2,7 Up to 4/up to 2.7
5	1,0/1,0 1.0/1.0	Не изменен/не изменен Not changed/ Not changed	1,9/2,0 1.9/2.0	До 6/до 2,7 Up to 6/up to 2.7
6	1,0/1,0 1.0/1.0	Плотный/плотный Dense/dense	1,9/2,2 1.9/2.2	До 5,5/до 6 Up to 5.5/up to 6

Примечание. * – правый/левый сустав.

Note. *, right/left joint.

им характеристикам соответствовала общепринятым критериям: высокая жизнеспособность наряду с высоким содержанием предшественников МСК и вариабельной экспрессией CD34 (данные не представлены).

Следует отметить, что именно в лечении пациентов с дегенеративными заболеваниями суставов терапевтическая «ценность» клеток жировой ткани выше по сравнению, например, с костным мозгом, поскольку МСК жировой ткани отличаются от костномозговых МСК более высоким хондрогенным потенциалом [24]. При этом безопасность и хорошая переносимость продемонстрированы для разных путей введения, включая системный [26, 28] и локальный (внутрисуставной) [7, 12]. Тем не менее у пациентов с ДОО внутрисуставное введение является предпочтительным — не только в силу «адресной» доставки клеток, но и вследствие способности синовиальной жидкости пациентов при контакте с МСК усиливать хондрогенный потенциал последних [24].

Особенностью нашего исследования можно считать рекрутирование пациентов с длительно текущим ДОО, преимущественно III рентгенологической стадии; при этом мы не исключали из исследования пациентов с высоким индексом массы тела (> 30), как это делается рядом авторов. Близким нам по исполнению является сообщение Correa и соавт., представляющее описание

клинического случая, в котором характер изменений и их динамика схожи с полученными нами результатами [7]. В клиническом исследовании Jo и соавт. сообщается об отсутствии побочных реакций и значительном улучшении по шкале WOMAC через 6 мес. после введения 1×10^8 клеток у 18 пациентов с ДОО [16]. Рак и соавт. продемонстрировали значительное клиническое улучшение у нескольких пациентов через 2 года после введения клеток по сравнению с данными на 12 мес. [25].

С целью усиления эффектов СВФ некоторые авторы дополняют клетки СВФ различными факторами. Например, Вуй и соавт для лечения 21 пациента с ДОО II-III использовали клетки СВФ в комбинации с аутологичной плазмой, обогащенной тромбоцитами (platelet-rich plasma, PRP) [6]. Авторы сообщили о двух основных позитивных эффектах — снижении боли через 3–6 мес. и стимуляции роста хряща. При этом оба эти эффекта приписываются PRP, поскольку, во-первых, PRP подавляет NF-κB каскад, активированный в хондроцитах пациентов с ДОО [33] и, во-вторых, PRP подавляет продукцию VEGF стромальными/стволовыми клетками жировой ткани, который является ингибитором роста хрящевой ткани [20], тем самым облегчается прохондрогенное действие стволовых клеток жировой ткани. Важно отметить, что в нашем исследовании купирование болевого синдрома достигалось

трансплантацией клеток СВФ без использования PRP, и статистически значимые изменения при этом регистрировались уже через 1 мес. после введения клеток.

В литературе имеются также данные многоцентрового нерандомизированного клинического исследования, в которое были рекрутированы 1128 пациентов с ОА крупных суставов [21]. Согласно представленным данным, лечение ОА с использованием аутологичной СВФ жировой ткани приводило к значительному клиническому улучшению у подавляющего числа больных. Более того, при длительном — до 4,5 лет — наблюдении за пациентами ни в одном из случаев не были зарегистрированы такие тяжелые нежелательные последствия или побочные эффекты, связанные с лечением, как инфекционные осложнения, онкологические или аутоиммунные заболевания.

Интересно, что терапевтический эффект клеток СВФ не ограничивается позитивными изменениями в целевом органе, но является более широким. Так, в исследовании Bright было обнаружено, что внутривенное введение СВФ пациентам с ДОО сопровождалось неожиданным снижением частоты и интенсивности мигренозных приступов [5]. Авторы предполагают, что этот

эффект связан с противовоспалительной и иммуномодулирующей активностью МСК и М2-макрофагов.

Результаты проведенного нами пилотного исследования свидетельствуют о безопасности и хорошей переносимости внутрисуставного введения аутологичных клеток СВФ жировой ткани у пациентов с ДОО коленных суставов. Данный подход можно рассматривать как один из методов, предупреждающих дальнейшую прогрессию заболевания, а в случае тяжелых повреждений подобная терапия может помочь уменьшить боль и другие проявления артрита и облегчить тем самым пациенту период до имплантации искусственного сустава. Однако для проверки этих предположений необходимы дальнейшие исследования, предусматривающие проведение контролируемых, рандомизированных клинических испытаний с продолжительным проспективным наблюдением. Кроме того, с целью доказательства прямого противовоспалительного эффекта клеток СВФ в дальнейшем предполагается изучить биомаркеры воспалительного процесса как на локальном (в синовиальной жидкости), так и на системном уровне (в сыворотке крови пациентов с ДОО).

Список литературы / References

1. Денисов-Никольский Ю.И., Миронов С.П., Омеляненко Н.П., Матвейчук И.В. Актуальные проблемы теоретической и клинической остеоартрологии. М., 2005. С. 302-324. [Denisov-Nikolsky Yu.I., Mironov S.P., Omelyanenko N.P., Matveichuk I.V. Actual problems of theoretical and clinical osteoarthrology]. Moscow, 2005, pp. 302-324.
2. Aust L., Devlin B., Foster S., Gimble J.M. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*, 2004, Vol. 6, no. 1, pp. 7-14.
3. Black L.L., Gaynor J., Gahring D., Adams C., Aron D., Harman S., Gingerich D.A., Harman R. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet. Ther.*, 2007, Vol. 8, pp. 272-284.
4. Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L., Dominici M., Katz A.J., March K.L., Redl H., Rubin J.P., Yoshimura K., Gimble J.M. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 2013, Vol. 15, no. 6, pp. 641-648.
5. Bright R., Bright M., Bright P., Hayne S., Thomas W.D. Migraine and tension-type headache treated with stromal vascular fraction: a case series. *Journal of Medical Case Reports*, 2014, Vol. 8, p. 237.
6. Bui K.H., Duong T.D., Nguyen T.N., Nguyen T.D., Le V.T., Mai V.T., Phan N.L., Le D.M., Ngoc N.K., Phan P.V. Symptomatic knee osteoarthritis treatment using autologous adipose derived stem cells and platelet-rich plasma: a clinical study. *Biomed. Res. Ther.*, 2014, Vol. 1, pp. 2-8.
7. Correa D., Gomez A., Vargas C., Turner E., Carstens M.H. Adipose-derived stromal vascular fraction (SVF) for the treatment of osteoarthritis of the knee, functional outcome and anatomic recovery of the cartilage: a case report. *CellRA*, 2016, Vol. 4, no. 1, e1768.
8. D'souza N., Rossignoli F., Golinelli G., Grisendi G., Spano C., Candini O., Dominici M. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies. *BMC Medicine*, 2015, Vol. 13, no. 1, p. 186.
9. El-Badawy A., Amer M., Abdelbaset R., Sherif S.N., Abo-Elela M., Ghallab Y.H., Abdelhamid H., Ismail Y., El-Badri N. Adipose stem cells display higher regenerative capacities and more adaptable electro-kinetic properties compared to bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, p. 37801.

10. Ennis W.J., Sui A., Bartholomew A. Stem cells and healing: impact on inflammation. *Advances in Wound Care*, 2013, Vol. 2, no. 7, pp. 369-378.
11. Filardo G., Perdisa F., Roffi A., Marcacci M., Kon E. Stem cells in articular cartilage regeneration. *J. Orthop. Surg. Res.*, 2016, Vol. 11, p. 42.
12. Fodor P.B., Paulseth S.G. Adipose derived stromal cell (ADSC) injections for pain management of osteoarthritis in the human knee joint. *Aesthetic Surgery Journal*, 2015, Vol. 36, no. 2, pp. 229-236.
13. Gimble J.M., Guilak F., Bunnell B.A. Clinical and preclinical translation of cell/based therapies using adipose tissue/derived cells. *Stem Cell Res. Ther.*, 2010, Vol. 1, no. 2, p. 19.
14. Han J., Koh Y.J., Moon H.R., Ryoo H.G., Cho C.H., Kim I., Koh G.Y. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 5, pp. 957-964.
15. Hematti P., Keating A. Mesenchymal stromal cells in regenerative medicine: A Perspective. Ed. Hematti P., Keating A. New York: Humana Press, 2013, pp. 3-16.
16. Jo C.H., Lee Y.G., Shin W.H., Kim H., Chai J.W., Jeong E.C., Kim J.E., Shim H., Shin J.S., Shin I.S., Ra J.C., Oh S., Yoon K.S. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: A proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells*, 2014, Vol. 32, no. 5, pp. 1254-1266.
17. Kapoor M., Martel-Pelletier J., Lajeunesse D., Pelletier J.-P., Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2011, Vol. 7, no. 1, pp. 33-42.
18. Koga H., Shimaya M., Muneta T., Nimura A., Morito T., Hayashi M., Suzuki S., Ju Y.J., Mochizuki T., Sekiya I. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res. Ther.*, 2008, Vol. 10, no. 4, R84.
19. Koh Y.G., Choi Y.J., Kwon S.K., Kim Y.S., Yeo J.E. Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, 2015, Vol. 23, no. 5, pp. 1308-1316.
20. Lee C.S., Burnsed O.A., Raghuram V., Kalisvaart J., Boyan B.D., Schwartz Z. Adipose stem cells can secrete angiogenic factors that inhibit hyaline cartilage regeneration. *Stem Cell Res. Ther.*, 2012, Vol. 3, no. 4, p. 35.
21. Michalek J., Moster R., Lukac L., Proefrock K., Petrasovic M., Rybar J., Capkova M., Chaloupka A., Darinskas A., Michalek J. Sr., Kristek J., Travník J., Jabandziev P., Cibulka M., Holek M., Jurik M., Skopalik J., Kristkova Z., Dudasova Z. Autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells application in patients with osteoarthritis. *Cell Transplant.*, 2015.
22. Mizuno H., Tobita M., Uysal A.C. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*, 2012, Vol. 30, no. 5, pp. 804-810.
23. Murphy J.M., Fink D.J., Hunziker E.B., Barry F.P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 2003, Vol. 48, no. 12, pp. 3464-3474.
24. Pagani S., Borsari V., Veronesi F., Ferrari A., Cepollaro S., Torricelli P., Filardo G., Fini M. Increased chondrogenic potential of mesenchymal cells from adipose tissue versus bone marrow-derived cells in osteoarthritic *in vitro* models. *J. Cell. Physiol.*, 2016.
25. Pak J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. *J. Med. Case Rep.*, 2011, Vol. 5, p. 296.
26. Ra J.C., Shin I.S., Kim S.H., Kang S.K., Kang B.C., Lee H.Y., Kim Y.J., Jo J.Y., Yoon E.J., Choi H.J., Kwon E. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev.*, 2011, Vol. 20, no. 8, pp. 1297-1308.
27. Riordan N.H., Ichim T.E., Min W.P., Wang H., Solano F., Lara F., Alfaro M., Rodriguez J.P., Harman R.J., Patel A.N., Murphy M.P., Lee R.R., Minev B. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J. Transl. Med.*, 2009, Vol. 7, p. 29.
28. Rodriguez J.P., Murphy M.P., Hong S., Madrigal M., March K.L., Minev B., Harman R.J., Chen C.S., Timmons R.B., Marleau A.M., Riordan N.H. Autologous stromal vascular fraction therapy for rheumatoid arthritis: rationale and clinical safety. *Int. Arch. Med.*, 2012, Vol. 5, p. 5.
29. Sato M., Uchida K., Nakajima H., Miyazaki T., Guerrero A.R., Watanabe S., Roberts S., Baba H. Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2012, Vol. 14, no. 1:R31.
30. Sellam J., Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2010, Vol. 6, no. 11, pp. 625-635.
31. Strioga M., Viswanathan S., Darinskas A., Slaby O., Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.*, 2012, Vol. 21, no. 14, pp. 2724-2752.
32. Ude C.C., Sulaiman S.B., Min-Hwei N., Hui-Cheng C., Ahmad J., Yahaya N.M., Saim A.B., Idrus R.B.H. Cartilage regeneration by chondrogenic induced adult stem cells in osteoarthritic sheep model. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 6, e98770. doi: 10.1371/journal.pone.0098770.

33. van Buul G.M., Koevoet W.L., Kops N., Bos P.K., Verhaar J.A., Weinans H., Bernsen M.R., van Osch G.J. Platelet-rich plasma releasate inhibits inflammatory processes in osteoarthritic chondrocytes. *The American Journal of Sports Medicine*, 2011, Vol. 39, no. 11, pp. 2362-2370.

34. Zingler C., Carl H.-D., Swoboda B., Krinner S., Hennig F., Gelse K. Limited evidence of chondrocyte outgrowth from adult human articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2016, Vol. 24, no. 1, pp. 124-128.

Авторы:

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

Ница Н.А. — врач-терапевт клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

Баранов С.И. — врач ультразвуковой диагностики клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Кожеевников Ю.А. — к.м.н., заведующий отделением хирургии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Попова Н.Д. — клинический ординатор 2-го года обучения ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

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

Authors:

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

Nitsa N.A., Physician (Therapy), Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Baranov S.I., Doctor of Ultrasonic Diagnostics, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kozhevnikov Yu.A., PhD (Medicine), Head, Surgical Department, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Popova N.D., Clinical Intern (2nd year of study), Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

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

Поступила 10.02.2017
Принята к печати 22.02.2017

Received 10.02.2017
Accepted 22.02.2017

ОСОБЕННОСТИ IgE-ПОЛИКЛОНАЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ НАРУШЕНИЯХ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АНТИГЕНОВ ГРУППЫ КРОВИ

Телесманич Н.Р., Коновальчик М.А., Микашинович З.И.,
Криволапова Э.Г.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Исследованы показатели IgE-опосредованной иммунологической реакции людей с нарушениями углеводного обмена и при диабете, имеющих разные группы крови 0(I), A(II), B(III) (n = 93). Определены: общий IgE; уровень глюкозы и процент гликозилированного гемоглобина (HbA1c) в сыворотке крови; группы крови (в системе АВ0). Анализ этих параметров в 0(I) и A(II), B(III) группах крови продемонстрировал разную реактогенность в зависимости от степени нарушения углеводного обмена и группоспецифичности антигенных детерминант гликопротеинов крови. Наблюдалась сильная прямая корреляционная зависимость ($r = 0,8$) антигенов 0(I) группы крови и заболеваемости сахарного диабета 2 типа. Наибольшая степень корреляции прослеживалась между группой крови A(II) и возникновением диабета 1 типа ($r = 1,0$). Наименьший процент СД и наименьшая корреляционная зависимость ($r = 0,67$) наблюдались у пациентов, имеющих B(III) группу крови. При выраженном нарушении углеводного обмена представители 0(I) и A(II) групп крови имели показатели общего IgE $43,61 \pm 15,12$ кМЕ/л и $86,2 \pm 42,61$ кМЕ/л соответственно, что в среднем в 4 раза ниже, чем представители B(III) группы крови, у которых общий IgE при диабете 2 типа увеличивался в 2 раза верхней границы нормы и составлял $209,65 \pm 52,5$ кМЕ/л.

Ключевые слова: иммуноглобулин E, группы крови (AB0), сахарный диабет, нарушения углеводного обмена, иммунологические маркеры, антитела

BLOOD GROUP ANTIGEN-DEPENDENT FEATURES OF POLYCLONAL IgE-RESPONSE IN CARBOHYDRATE METABOLIC DISORDERS

Telesmanich N.R., Konovalchik M.A., Mikashinovich Z.I.,
Krivolapova E.G.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Laboratory parameters of IgE-mediated immunological reaction (total IgE) were studied. Subjects with impaired carbohydrate metabolism and persons with diabetes mellitus were classified for blood groups

Адрес для переписки:

Коновальчик Мария Алексеевна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29
Тел.: 8 (928) 763-63-20.
E-mail: mariya_konovalchik@mail.ru

Address for correspondence:

Konovalchik Maria A.
Rostov State Medical University
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don,
Nakhichevanskiy lane, 29
Phone: 7 (928) 763-63-20.
E-mail: mariya_konovalchik@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Р. Телесманич, М.А. Коновальчик, З.И. Микашинович, Э.Г. Криволапова «Особенности IgE-поликлонального ответа при нарушениях углеводного обмена в зависимости от антигенов группы крови» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 789-796.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-789-796

© Телесманич Н.Р. и соавт., 2017

For citation:

N.R. Telesmanich, M.A. Konovalchik, Z.I. Mikashinovich, E.G. Krivolapova "Blood group antigen-dependent features of polyclonal IgE-response in carbohydrate metabolic disorders", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 789-796.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-789-796

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-789-796

0(I), A(II), B(III) ($n = 93$). We determined total IgE, glucose levels and percentage of glycosylated hemoglobin (HbA1c) in blood serum; as well ABO blood groups. Comparison of these parameters in patient cohorts with 0(I) and A(II), B(III) blood groups showed different reactogenicity, depending on the degree of carbohydrate metabolism disturbance and ABO group specificity of antigenic determinants of blood glycoproteins. There was a strong direct correlation ($r = 0.8$) between blood group 0(I) antigens, and incidence of type 2 diabetes mellitus (DM). The highest correlation degree was observed between the blood group A(II) and type 1 diabetes onset of ($r = 1.0$). The smallest percentage of DM and the smallest correlation ($r = 0.67$) were observed in patients, B(III) blood group is located. In cases of sufficiently altered carbohydrate metabolism, the blood group 0(I) and A(II) carriers had total IgE of 43.61 ± 15.12 kIU/L, and 86.2 ± 42.61 kIU/L, respectively, thus being, on average, 4-times lower than in B(III) blood group in whom total IgE in type 2 diabetes was 2-fold higher than normal values, being 209.65 ± 52.5 kIU/L.

Keywords: blood group (ABO), diabetes, disorders of carbohydrate metabolism, immunologic markers, antibodies

Введение

Вопрос о роли реагинов, в частности общего IgE, в патогенезе разных форм нарушений углеводного обмена остается практически открытым. В настоящее время известно, что низкоаффинный рецептор IgE CD23, или Fc-эпсилон-RII, является гликопротеиновым, лектиновым рецептором типа C, содержит домен, характерный для Са-зависимых углеводсвязывающих белков, а также содержит 1 потенциальный сайт N-гликозилирования [6]. Анализ уже известного биохимического строения этого рецептора позволяет с высокой степенью вероятности предположить его метаболическое участие в углеводном обмене. Экспрессия рецепторов для IgE на клетках островков Лангерганса, в частности FCeRI; CD14; FCeRII (CD23), и участие этих рецепторов в созревании клеток островков Лангерганса [6, 13] свидетельствуют, что они могут быть опосредованными маркерами нарушений углеводного обмена разной степени тяжести и отражают роль IgE в формировании полноценности клеток, отвечающих за продукцию инсулина. Последнее делает актуальным исследование в подтверждение данной гипотезы.

Единичными работами показано, что люди с группой крови 0(I) намного устойчивее к стрессу, чем A(II)-люди, однако, если последние попадают в травмирующую ситуацию, то выход из нее и восстановление организма обычно занимает больше времени, чем у обладателей других групп крови [4, 8]. Подмечено, что для обладателей группы крови A(II) характерно наибольшее содержание инсулина и кортизола в сыворотке крови, а метаболический профиль лиц с AB(IV) группой крови может характеризоваться наибольшим содержанием глюкозы в крови.

В последние годы показана роль провоспалительных цитокинов в патогенезе инсулин-зависимого диабета и их участие в развитии инсулинрезистентности при инсулиннезависимом диабете. К иммунологическим маркерам СД относятся: антитела к островковым клеткам; антитела к инсулину и проинсулину, антитела к глутамат-декарбоксилазе. Однако сведения о значимости иммунологических маркеров сахарного диабета противоречивы и их патогенетическая роль требует уточнения [1]. Уже известно, что особенности обмена веществ могут влиять на интенсивность и спектр цитокинов [9]. Показано, что СД 1 и 2 типов сопровождается развитием субклинического воспаления, ассоциированного с увеличением продукции ряда провоспалительных медиаторов. Однако до настоящего времени не установлены точные механизмы и особенности развития цитокинового дисбаланса у пациентов с СД 2 [2].

Цель — анализ уровня общего IgE у людей с различными типами нарушений углеводного обмена, имеющих разные группы крови (AB0).

Материалы и методы

Исследования проводили с ноября 2015 по октябрь 2016 г. Всего было обследовано 102 человека разных возрастов от 19 лет до 90 лет.

У всех обследованных определяли группу крови (AB0), уровень глюкозы, гликозилированного гемоглобина, общего IgE.

Из 102 обследованных только у 9 человек определилась AB(IV) группа крови, поэтому для анализа были взяты 0(I), A(II), B(III) группы крови, в которых определялась достаточная статистическая выборка: 0(I) группа — 32 человека, A(II) — 27 человек, B(III) — 34, всего 93 человека.

Из них с нарушениями углеводного обмена 82, которые были разделены на 4 подгруппы.

Подгруппа № 0 — контрольная группа; подгруппа № 1 — с показателями глюкозы и процента гликозилированного гемоглобина (HbA1c) по нижней границе нормы и ниже нормы (глюкоза 2,2-4,1 ммоль/л; HbA1c — 3,7-5,0%); подгруппа № 2 — показатели глюкозы и гликозилированного Hb по верхней границе нормы и тенденции к превышению нормы (глюкоза 6,2-7,8 ммоль/л; HbA1c 5,9-6,9%); подгруппа № 3 — выраженное нарушение толерантности к глюкозе (глюкоза 8,0-20,3 ммоль/л; HbA1c 6,7-13,6%).

Для определения групп крови человека системы АВ0 использовали моноклональные антитела класса IgM мышинных гибридом анти-А, анти-В, анти-АВ в реакции прямой гемагглютинации на плоскости «ЭритроТест™ — цоликлоны» (производство ООО «Гематолог», Москва).

Общий IgE в сыворотке крови определяли методом «сэндвич-вариант» одностадийного твердофазного ИФА «ДС-ИФА-IgE общий» (НПО «Диагностические системы», г. Нижний Новгород).

Концентрацию глюкозы в сыворотке крови определяли энзиматическим колориметрическим методом, использовали набор реагентов (производитель ООО «Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург).

Процентное содержание гликогемоглобина (HbA1c) в крови определяли с помощью аффинной хроматографии в микроколонке («Гликогемотест», Москва).

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программного пакета Statistica версии 6,0 (StatSoft Inc., Tulsa, США). Коэффициент парной корреляции (r) рассчитывали в программе Exceltip — степень взаимосвязи — в диапазоне 0-1 (сильная отрицательная связь) до +1 (сильная положительная связь). При $r = 0$ между переменными x и y — у показателей нет связи.

Результаты и обсуждение

В исследовании участвовали 93 человека с 0(I), А(II), В(III) группами крови.

0(I) группа крови составила 32 человека. Нарушение углеводного обмена наблюдалось у 21 человека (глюкоза выше нормы) — подгруппа № 2, $n = 11$; подгруппа № 3, $n = 10$ — 63% и 4 человека (глюкоза ниже нормы) — 12,5% (подгруппа № 1; $n = 4$). С диагнозом «сахарный диабет 2» (СД 2) — 12 человек (47%) в возрасте от 48 до 79

лет; сахарный диабет 1 (СД 1) в возрасте 19-34 лет — 3 человека (9%).

А(II) группа крови составила 27 человек. Нарушение углеводного обмена — 16 человек (глюкоза выше нормы), подгруппа № 2, $n = 9$; подгруппа № 3, $n = 7$ — 59% и 5 человек (глюкоза ниже нормы) — 18,5% (подгруппа № 1, $n = 5$); СД 2 типа — 11 человек в возрасте 45-78 лет — 41%; СД 1 типа в возрасте 26-27 лет — 2 человека (7%).

В(III) группа крови составила 34 человека, из них 19 с нарушениями углеводного обмена (глюкоза выше нормы) подгруппа № 2, $n = 9$; подгруппа № 3, $n = 10$ — 53%, 2 человека (глюкоза ниже нормы) — 5,8% (подгруппа № 1, $n = 2$); СД 2 типа — 10 человек в возрасте 24-74 лет — 29%; СД 1 типа 0%.

Результаты корреляционного анализа показали наличие сильной прямой взаимосвязи между 0(I) группой крови и риском развития диабета 2 типа ($r = 0,8$) и А(II) группой крови и риском заболевания СД 1 ($r = 1,0$). Антигены В(III) группы крови имели наименьший коэффициент корреляции ($r = 0,67$) с риском возникновения СД 2 и отсутствие пациентов с СД 1.

Соотношение показателей гликозилированного гемоглобина и общего IgE совпадало с соотношением показателей глюкозы и общего IgE у всех групп крови.

Средние значения общего IgE у 0(I) и А(II) группы крови были соотносимы и существенно отличались от общего IgE у В(III) группы (табл. 1, 2, 3). Так, максимальный всплеск общего IgE у 0(I) и А(II) групп крови наблюдался в подгруппе № 2 (среднее значение глюкозы $6,88 \pm 0,15$) (табл. 1, 2). Общий IgE составлял $261,88 \pm 86,8$ кМЕ/л для 0(I) группы крови, а для А(II) — $209,19 \pm 103,57$ кМЕ/л. Несмотря на то, что 0(I) и А(II) группы крови «вели себя» очень похоже, реактогенность 0(I) группы крови в индукции общего IgE была сильнее по среднему показателю, чем А(II). Соответственно — $261,88 \pm 86,8$ кМЕ/л для 0(I) и $209,19 \pm 103,57$ кМЕ/л для А(II). У В(III) группы крови (среднее значение глюкозы $6,5 \pm 0,09$ ммоль/л) в подгруппе № 2 общий IgE был равен $131,4 \pm 46,6$ кМЕ/л, что в два раза ниже, чем у 0(I) и А(II) групп крови.

У подгруппы № 3 с нарушением толерантности к глюкозе у 0(I) группы крови (среднее значение $11,49 \pm 1,28$ ммоль/л) и А(II) ($11,21 \pm 0,96$ ммоль/л), показатели общего IgE резко падали: у 0(I) до $43,61 \pm 15,12$ кМЕ/л (табл. 1), а у А(II) до $86,2 \pm 42,61$ кМЕ/л (табл. 2), в отличие от В(III) группы крови, где IgE общий в подгруп-

ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЯ ОБЩЕГО IgE И ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА (HbA1c) У ЛЮДЕЙ 0(I) ГРУППЫ КРОВИ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (X±m)

TABLE 1. VALUES OF TOTAL IgE AND GLYCOSYLATED HEMOGLOBIN (HbA1c) IN HUMANS WITH 0(I) BLOOD GROUPS WITH DIFFERENT LEVELS OF SERUM GLUCOSE (X±m)

Показатель Index	Контрольная группа (n = 7) глюкоза (4,3-6,0 ммоль/л) Control group (n = 7) glucose (4.3-6.0 mmol/l) HbA1c (4,9-5,7%)	Подгруппа 1 (n = 4) глюкоза (3,0-4,1 ммоль/л) Subgroup 1 (n = 4) glucose (3.0-4.1 mmol/l) HbA1c (4,2-5,0%)	Подгруппа 2 (n = 11) глюкоза (6,2-7,6 ммоль/л) Subgroup 2 (n = 11) glucose (6.2-7.6 mmol/l) HbA1c (5,9-6,8%)	Подгруппа 3 (n = 10) глюкоза (8,0-20,3 ммоль/л) Subgroup 3 (n = 10) glucose (8.0-20.3 mmol/l) HbA1c (6,8-13,6%)
Глюкоза (4,2-6,1 ммоль/л) Glucose (4.2-6.1 mmol/l)	5,07±0,20	3,8±0,27 p < 0,05	6,88±0,15 p < 0,05	11,49±1,28 p < 0,05
HbA1c (4,0-6,2%)	5,29±0,09	4,7±0,18 p < 0,05	6,43±0,08 p < 0,05	8,8±0,7 p < 0,05
Общий IgE (25-100 кМЕ/л) Total IgE (25-100 kIU/L)	102,4±45,98	38,78±15,92 p > 0,05	261,88±86,8 p < 0,05	43,61±15,12 p > 0,05

Примечание. p – достоверно относительно контрольной группы.

Подгруппа № 0 – контрольная группа; № 1 – нижняя граница нормы, ниже нормы; № 2 – верхняя граница нормы и тенденция к превышению нормы; № 3 – выраженное нарушение толерантности к глюкозе.

Note. p, significant difference from control group.

Subgroup № 0, control group; № 1, the lower limit of normal, below normal; № 2, upper limit of normal, and a tendency for exceeding normal levels; № 3, marked glucose intolerance.

пе № 3 составлял 209,65±52,5 кМЕ/л (табл. 3), что в 2,4 и 4,8 раз выше, чем у 0(I) и A(II) групп крови соответственно.

Закономерность, выявленная в B(III) группе крови (подгруппе № 2), существенно отличалась от первых двух. При среднем значении глюкозы 6,5±0,09 ммоль/л, гликозилированном гемоглобине 6,2±0,07%, общий IgE был значительно ниже – 131,4±46,6 кМЕ/л, чем у первых двух групп крови (табл. 3). По сравнению с 0(I) – ниже в 2 раза, с A(II) – в 1,5. Однако при выраженном повышении уровня глюкозы до 10,11±0,92 ммоль/л, (подгруппа № 3) общий IgE превышал верхнюю границу нормы в 2 раза (209,65±52,2 кМЕ/л). Следует отметить, что тенденция к повышению общего IgE начиналась у B(III) группы крови уже с низких значений глюкозы (2,7±0,5 ммоль/л) и составляла нижнюю границу нормы общего IgE 103,2±64,1 кМЕ/л. Таким образом, у B(III) группы крови повышение уровня глюкозы соотносилось с повышением IgE (среднее значение глюкозы 2,7±0,5 ммоль/л – общий IgE 103,2±64,1 кМЕ/л; среднее значение глюкозы 6,5±0,09 ммоль/л –

общий IgE 131,4±46,6 кМЕ/л; среднее значение глюкозы 10,11±0,92 ммоль/л – общий IgE 209,65±52,2 кМЕ/л) соответственно.

Вместе с тем у 0(I) и A(II) группы крови – при «низкой» глюкозе (подгруппа № 1), общий IgE падал в 3 раза ниже верхней границы нормы (25-100 кМЕ/л), так же как и при диабете 2 типа (подгруппа № 3). При глюкозе, равной 11,49±1,28 ммоль/л (подгруппа № 3), у людей с 0(I) группой крови уровень IgE падал в 2 раза ниже верхней границы нормы (43,61±15,12 кМЕ/л), что ниже в 4 раза, чем у людей с B(III) группой крови в подгруппе № 3, а у группы крови A(II) в этой же подгруппе содержание IgE составляло 86,2±42,61 кМЕ/л, что ниже в 2 раза, чем у диабетиков B(III) группы крови.

Олигосахаридные компоненты гликопротеинов мембран клеток выполняют роль информационных структур или антигенных детерминант, обеспечивающих передачу сигнала в клетку при помощи рецепторов-лектинов. Так, групповая специфичность крови определяется составом антигенных детерминант, сосредоточенных

ТАБЛИЦА 2. ЗНАЧЕНИЯ ОБЩЕГО IgE И ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА У ЛЮДЕЙ А(II) ГРУППЫ КРОВИ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ($\bar{x} \pm m$)

TABLE 2. VALUES OF TOTAL IgE AND GLYCOSYLATED HEMOGLOBIN IGE IN HUMANS WITH A (II) BLOOD GROUPS SHOWING DIFFERENT LEVELS OF SERUM GLUCOSE ($\bar{x} \pm m$)

Показатель Index	Контрольная группа (n = 6) глюкоза (4,2-6,0 ммоль/л) Control group (n = 6) glucose (4.2-6.0 mmol/l) HbA1c (4,8-5,7%)	Подгруппа 1 (n = 5) глюкоза (2,9-4,0 ммоль/л) Subgroup 1 (n = 5) glucose (2.9-4.0 mmol/l) HbA1c (4,2-4,8%)	Подгруппа 2 (n = 9) глюкоза (6,2-7,8 ммоль/л) Subgroup 2 (n = 9) glucose (6.2-7.8 mmol/l) HbA1c (5,9-6,9%)	Подгруппа 3 (n = 7) глюкоза (8,2-16,0 ммоль/л) Subgroup 3 (n = 7) glucose (8.2-16.0 mmol/l) HbA1c (7,0-11,3%)
Глюкоза (4,2-6,1 ммоль/л) Glucose (4.2-6.1 mmol/l)	4,9±0,28	3,42±0,18 p < 0,05	6,9±0,2 p < 0,05	11,21±0,96 p < 0,05
HbA1c (4.0-6.2%)	5,2±0,14	4,42±0,11 p > 0,05	6,4±0,13 p < 0,05	8,67±0,52 p < 0,05
Общий IgE (25-100 кМЕ/л) Total IgE (25-100 kIU/L)	106,82±64,48	42,68±12,4 p < 0,05	209,19±103,57 p > 0,05	86,2±42,61 p > 0,05

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As in Table 1.

на внешней поверхности мембран эритроцитов, что свидетельствует о важной информационной роли углеводов в обеспечении иммунитета организма [4, 5].

Известно, что 0(I) группа крови имеет на своей поверхности простейший набор углеводов, представленных только фукозой, поэтому первооткрыватели ее назвали «нулевой» 0(I), имея в виду отсутствие дополняющих антигенов [4, 8]. Группа крови А(II) представлена углеводными детерминантами фукозы и N-ацетилгалактозамина; В(III) – фукозы и D-галактозы; АВ(IV) – фукозы N-ацетилгалактозамина и D-галактозы. Можно предположить, что фукоза и экранируемость ее N-ацетилгалактозамином обуславливает формирование толерантных к глюкозе и инсулину состояний и не обеспечивает чувствительность клеток к инсулину. Не экранируемая D-галактоза на поверхности клеток В(III) может гидролизоваться 3 ферментами в организме человека: галактокиназой, галактозо-1-фосфатом уредил-трансферазой и УДФ-галактозо-4-эпимеразой, легко превращаясь в глюкозу [4].

Судя по полученным результатам, нарушения углеводного обмена и возникновение диабета 2 типа наиболее выражены у людей с 0(I) группой

крови ($r = 0,8$), в которой 47% людей имели сахарный диабет 2 типа, а 9% составила группа с сахарным диабетом 1 типа ($r = 0,6$). Второе место по степени нарушений углеводного обмена заняла А(II) группа крови – 41% СД 2 типа ($r = 0,7$), 7% – СД 1 типа ($r = 1,0$). Интересным является тот факт, что для выявления антител к антигенам островков Лангерганса используют ткань поджелудочной железы именно 0(I) донора [6, 7], что косвенно подтверждает результаты наших исследований о наибольшей подверженности СД у индивидов этой группы. Наименьший риск для возникновения осложнений, связанных с нарушениями углеводного обмена, продемонстрировала В(III) группа крови, СД 2 типа 29% и 0% СД 1 типа. Подгруппа № 2 В(III) группы крови, имеющая повышенные значения уровня глюкозы ($> 6,1$ ммоль/л), характеризовалась более низким средним показателем уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина ($6,5 \pm 0,09$ ммоль/л и $6,2 \pm 0,07\%$ соответственно). Рост уровня общего IgE у людей с В(III) группой крови не носил характер «скачков» в ответ на изменение глюкозы, демонстрируя планомерное повышение уровня IgE. Очевидно, что комплекс реагинов в виде

ТАБЛИЦА 3. ЗНАЧЕНИЯ ОБЩЕГО IgE И ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА (HbA1c) У ЛЮДЕЙ В(III) ГРУППЫ КРОВИ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ($X \pm m$)

TABLE 3. VALUES OF TOTAL IgE AND GLYCOSYLATED HEMOGLOBIN (HbA1c) IN HUMANS WITH B(III) BLOOD GROUPS AND DIFFERENT LEVELS OF SERUM GLUCOSE ($X \pm m$)

Показатель Index	Контрольная группа (n = 13) глюкоза (4,2-6,1 ммоль/л) Control group (n = 13) glucose (4.2-6.1 mmol/l) HbA1c (4,8-5,9%)	Подгруппа 1 (n = 2) глюкоза (2,2-3,2 ммоль/л) Subgroup 1 (n = 2) glucose (2.2-3.2 mmol/l) HbA1c (3,7-4,3%)	Подгруппа 2 (n = 9) глюкоза (6,2-6,9 ммоль/л) Subgroup 2 (n = 9) glucose (6.2-6.9 mmol/l) HbA1c (5,9-6,5%)	Подгруппа 3 (n = 10) глюкоза (7,4-17,5 ммоль/л) Subgroup 3 (n = 10) glucose (7.4-17.5 mmol/l) HbA1 (6,7-12,0%)
Глюкоза (4,2-6,1 ммоль/л) Glucose (4.2-6.1 mmol/l)	4,9±0,2	2,7±0,5 p < 0,05	6,5±0,09 p < 0,05	10,11±0,92 p < 0,05
HbA1c (4.0-6.2 %)	5,2±0,09	4,0±0,30 p < 0,05	6,2±0,07 p < 0,05	8,05±0,49 p < 0,05
Общий IgE (25-100 кМЕ/л) Total IgE (25-100 kIU/L)	100,48±22,97	103,2±64.1 p > 0,05	131,4±46,6 p < 0,05	209,65±52,2 p < 0,05

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As in Table 1.

общего IgE играет адаптивную роль при возникновении нарушений углеводного обмена.

Известно, что уровень сывороточного IgE является маркером генетически обусловленного типа иммунной реактивности, который отражает вероятный баланс Th1/Th2 [16]. Усиление поликлонального IgE-ответа считают маркером экспансии Th2 [10]. Переключающими на синтез IgE-цитокинами, влияющими на уровень общего IgE и на развитие Th2-клеток, являются IL-4; IL-13 [12]. Известно, что в регуляции синтеза IgE участвуют гормоны. Кортизол, инсулиноподобный фактор роста I действуют как сигналы для переключения В-лимфоцитов на синтез IgE [11, 14]. По данным зарубежных исследователей [15], существует связь между IgE-опосредованной аллергизацией и сахарным диабетом 1 типа. Ряд авторов утверждают, что СД 1 характеризуется иммунологической реакцией, в которой доминируют Th1-клетки, в то время как IgE-опосредованная аллергия связана с Th2-клетками. Известно, что Th1-эффекторы CD4⁺ играют существенную роль в противовирусном иммунитете. В соответствии с Th1/Th2-гипотезой, иммунная система развивается либо через Th1-клетки, либо через Th2-клетки. Это бу-

дет означать, что развитие IgE-опосредованной аллергии будет понижать риск развития СД 1 [3].

Заключение

Анализ уровня общего IgE, уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина в 0(I), A(II), B(III) группах крови демонстрировал разную реактогенность в зависимости от степени нарушения углеводного обмена. Наблюдалась сильная прямая корреляционная зависимость ($r = 0,8$) от антигенов 0(I) группы крови и заболеваемости сахарного диабета 2 типа. Наибольшая степень корреляции прослеживалась между группой крови A(II) и возникновением диабета 1 типа ($r = 1,0$). Наименьший процент СД и наименьшая корреляционная зависимость ($r = 0,67$) наблюдались у пациентов, имеющих B(III) группу крови.

Подгруппа людей с нарушением углеводного обмена (глюкоза 6,2-7,8 ммоль/л; гликозилированный гемоглобин 5,9-6,9 %), не имеющих диагноза «диабет» (подгруппа № 2), характеризовалась резким повышением общего IgE в 2 раза выше верхней границы нормы у 0(I) и A(II). Однако при глюкозе 8,2-16,0 ммоль/л, гликозилированном гемоглобине 7,0-11,3% общий IgE

падал на 1,5-2 раза ниже верхней границы нормы (100 кМЕ/л), что ниже, чем у В(III) группы крови этой подгруппы, в 4 раза

Можно предположить, что всплеск общего IgE у людей с пограничным уровнем глюкозы (6,2-7,8 ммоль/л), гликозилированного гемоглобина (5,9-6,9%) в 0(I) и А(II) группах крови может являться предиктором возникновения сахарного диабета у 0(I) и А(II) групп крови и отражать состояние механизмов компенсации при

нарушении толерантности к глюкозе, что демонстрируется у В(III) группы крови, которая наименее подвержена возникновению диабета и имеет высокие цифры уровня общего IgE при выраженной толерантности к глюкозе.

Продолжает оставаться открытым вопрос: в каких случаях высокий уровень глюкозы и высокий уровень общего IgE являются антагонистами и какое патогенетическое значение имеет это явление при нарушениях углеводного обмена.

Список литературы / References

1. Байбурина Г.Г. Иммунологические маркеры сахарного диабета при различных клинических типах заболевания // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 6. С. 623-626. [Baiburina G.G. Immunological markers of diabetes mellitus in various clinical variants of the disorder. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, Vol. 13, no. 6, pp. 623-626. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2011-6-623-626.
2. Кологривова И.В., Суслова Т.Е., Кошельская О.А., Винницкая И.В., Трубочева О.А., Влияние глюкозы и инсулина на секрецию цитокинов мононуклеарами периферической крови *in vitro* // Иммунопатология и клиническая иммунология, 2013. Т. 5. С. 267-270. [Kologrivova I.V., Suslova T.E., Koshelskaya O.A., Vinnitskaya I.V., Trubacheva O.A. Influence of insulin and glucose on cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Immunopatologiya i klinicheskaya immunologiya = Immunopathology and Clinical Immunology*, 2013, Vol. 5, pp. 267-270. (In Russ.)]
3. Роев В.О. Роль Т-клеток в патогенезе сахарного диабета 1 типа: от причин до лечения // Диабетология, 2003. Т. 46. С. 305-321. [Roer V.O. Role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologiya = Diabetology*, 2003, Vol. 46, pp. 305-321. (In Russ.)]
4. Слесарев В.И. Химия. Основы химии живого. Учебник для вузов. СПб.: Химиздат, 2007. 784 с. [Slesarev V.I. Chemistry. Fundamentals of chemistry of life. Textbook for high schools]. St. Petersburg: Chemical Publishing, 2009. 784 p.
5. Телесманич Н.Р., Колякина А.В., Ломов Ю.М., Меньшикова Е.А., Миронова А.В. Характеристика адгезивной активности холерных вибрионов на эритроцитах млекопитающих для выбора дополнительного ориентировочного теста их эпидемической значимости // Клиническая лабораторная диагностика, 2008. Т. 7. С. 45-48. [Telesmanich N.R., Kolyakina A.V., Lomov Yu.M., Menshikova E.A., Mironova A.V. The Characterization of the adhesive activity of cholera vibrios on mammalian red blood cells for choice of an additional orientative test of their epidemic significance. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2008, Vol. 7, pp. 45-48. (In Russ.)]
6. Хаитов Р.М. Система маркерных антигенов CD. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 280 с. [Khaitov R.M. System CD marker antigens]. Moscow: GEOTAR-Media, 2013. 280 p.
7. Arias M., Rey Nore J., Vita N., Stelter F., Borysiewicz L., Ferrara P., Labeta M. The mechanisms controlling activation of naive B cells, their proliferation, Ag receptor affinity maturation, isotype switching, and their fate as memory or plasma cells is not fully elucidated. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, pp. 3480-3486.
8. D'Adamo P.G., Whitney C. Eat right 4 your type (The individualized diet Solution to Stayng Healthy, living longer and Achieving your ideal weight). G.P. Putnam's Sons, 2002. 416 p.
9. Donath M.Y., Shoelson S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Natur Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, pp. 98-107.
10. Ehigiator H., Stadnyk A., Lee T. Extract of *Nippostrongylus brasiliensis* stimulates polyclonal type-2 immunoglobulin response by inducing de novo class switch. *Infect. Immunol.*, 2000, Vol. 68, pp. 4913-4922.
11. Jabara H., Loh R., Ramesh N., Fuleihan R., Rosen R.S., Chatila T., Fu S.M., Stamenkovic I., Geha R.S. Sequential switching from μ to ϵ via $\gamma 4$ in human B cells stimulated with IL-4 and hydrocortisone. *J. Immunol.*, 1993, Vol. 151, pp. 4528-4533.
12. Jelinek D. Regulation of B lymphocyte differentiation. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2000, Vol. 84, pp. 375-385.
13. Katoh N., Kraft S., Wessendorf J., Bieber T. The high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) blocks apoptosis in normal human monocytes. *J. Clin. Invest.*, 2000, Vol. 105, no. 2, pp. 183-190.
14. Kimata H., Fujimoto M. Growth hormone and insulin-like growth factor 1 induce IgE and IgG4 production by human B cells. *J. Exp. Med.*, 1994, Vol. 180, pp. 727-732.

15. Klamt S., Vogel M., Hiemisch A., Prensel F., Zachariae S., Ceglari U., Thiery I., Kiess W. Association between IgE mediated allergies and diabetes mellitus type 1 in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*, 2015, Vol. 16, pp. 493-503.
16. Sandford A., Weir T., Pare P. The genetics of Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, Vol. 153, pp. 1749-1765.

Авторы:

Телесманич Н.Р. — д.б.н., профессор кафедры общей и клинической биохимии № 1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Коновальчик М.А. — аспирант кафедры общей и клинической биохимии № 1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Микашинович З.И. — д.б.н., профессор, заведующая кафедрой общей и клинической биохимии № 1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Криволапова Э.Г. — ординатор кафедры неврологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Telesmanich N.R., PhD, MD (Biology), Professor, Department of General and Clinical Biochemistry No. 1, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Konovalechik M.A., Graduate Student, Department of General and Clinical Biochemistry No. 1, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Mikashinovich Z.I., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of General and Clinical Biochemistry No. 1, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Krivolapova E.G., Resident, Department of Neurology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 17.03.2017
Отправлена на доработку 02.05.2017
Принята к печати 20.06.2017

Received 17.03.2017
Revision received 02.05.2017
Accepted 20.06.2017

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ У ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Супрун Е.Н.^{1,2}, Супрун С.В.^{1,2}, Гусева О.Е.^{1,2}, Лощенко М.А.¹,
Пивкина Т.В.¹, Савицкая Е.А.¹, Анурьев С.В.¹, Осмолкина В.А.²,
Брага С.С.²

¹. Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» —
Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

² ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Хабаровск, Россия

Резюме. В последние годы отмечен рост распространенности бронхиальной астмы, в связи с чем ее лечение остается актуальной проблемой в аллергологии. Наряду с врожденной атопией, значимую роль в формировании и развитии заболевания играет гиперреактивность бронхов, которая во многом связана с состоянием мембран эпителия бронхов. Однако получение клеток бронхиального эпителия осуществляется путем бронхоскопии с биопсией, это инвазивная процедура, а гиперреактивность бронхов является относительным противопоказанием к ней. В то же время существует метод интегральной оценки клеточных мембран организма посредством анализа трансформации мембран эритроцитов, которые, не имея собственного метаболизма, являются показательной моделью состояния клеточных мембран организма в целом. Нами обследовано 52 человека в возрасте от 2 до 17 лет, из них 20 детей с бронхиальной астмой и группа сравнения составила 32 здоровых ребенка, рандомизированных по возрасту и половому составу. Им проводилась оценка спонтанной трансформации эритроцитов, путем микрофотографирования под световым микроскопом в нативном мазке взвеси цельной крови. Выявлена более частая встречаемость деструктивных форм эритроцитов у детей с бронхиальной астмой (2,6%) в сравнении со здоровыми (0,8%) ($p < 0,05$), с преобладанием сфероцитов (0,55% и 0,1%), которых более чем в пять раз больше у детей с бронхиальной астмой ($p < 0,05$). Соответственно, переходные формы достоверно чаще ($p < 0,05$) встречаются в группе сравнения (39,9% против 34,12%). Для бронхиальной астмы характерен стоматоцитарный путь трансформации клеток. Интегральным критерием возможностей мембраны вернуться к норме является показатель компенсаторной трансформации (ПКТ) — соотношение переходных и деструктивных форм. В наших исследованиях показано снижение ПКТ у детей, страдающих бронхиальной астмой ($p < 0,05$), в сравнении с практически здоровыми (2,1 и 3,5 соответственно). Как объективный параметр, определяющий степень тяжести бронхиальной астмы, выбрана оценка функции внешнего дыхания. Показана достоверная сильная обратная корреляционная связь ($R = -0,82$) между показателем ОФВ1 и количеством сфероидов (переходные формы), а также достоверная сильная прямая корреляционная связь ($R = 0,76$) между уров-

Адрес для переписки:

Супрун Евгений Николаевич
Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный
научный центр физиологии и патологии дыхания» —
Научно-исследовательский институт охраны
материнства и детства
680021, Россия, г. Хабаровск, ул. Серышева, 74/49.
Тел.: 8 (4212) 25-76-85.
E-mail: evg-suprun@yandex.ru

Address for correspondence:

Suprun Evgeny N.
Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk
Branch
680021, Russian Federation, Khabarovsk,
Serysheva str., 74, apt 49.
Phone: 7 (4212) 25-76-85.
E-mail: evg-suprun@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.Н. Супрун, С.В. Супрун, О.Е. Гусева, М.А. Лощенко,
Т.В. Пивкина, Е.А. Савицкая, С.В. Анурьев,
В.А. Осмолкина, С.С. Брага «Особенности трансформации
эритроцитов у детей, страдающих бронхиальной
астмой» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6.
С. 797-802. doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-797-802

© Супрун Е.Н. и соавт., 2017

For citation:

E.N. Suprun, S.V. Suprun, O.E. Guseva, M.A. Loschenko,
T.V. Pivkina, E.A. Savitskaya, S.V. Anuriev, V.A. Osmolkina,
S.S. Braga "Features of transformations of red blood cells
in children with bronchial asthma", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 6,
pp. 797-802. doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-797-802

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-797-802

нем ОФВ1 и ПКТ. Таким образом, у больных с бронхиальной астмой отмечаются нарушения трансформации эритроцитов по сравнению со здоровыми детьми. Имеется прямая зависимость между степенью тяжести заболевания и выраженностью изменений трансформации мембран эритроцитов.

Ключевые слова: бронхиальная астма, трансформация эритроцитов, дети, функция внешнего дыхания, гиперреактивность бронхов, контроль над бронхиальной астмой

FEATURES OF TRANSFORMATIONS OF RED BLOOD CELLS IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA

Suprun E.N.^{a, b}, Suprun S.V.^{a, b}, Guseva O.E.^{a, b}, Loschenko M.A.^a, Pivkina T.V.^a, Savitskaya E.A.^a, Anuriev S.V.^a, Osmolkina V.A.^b, Braga S.S.^b

^a Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch, Khabarovsk, Russian Federation

^b Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Abstract. Increase prevalence of bronchial asthma (BA) is noted recently. That's why its treatment remains an urgent problem in allergology. Along with congenital atopy, a significant role in formation and development of a disease is given to hyperreactivity of bronchial tubes which is connected with alterations of their epithelial membranes. However, sampling of bronchial epithelium cells is carried out by means of bronchoscopy with a biopsy which is an invasive procedure. Therefore, bronchial hyperreactivity is a relative contraindication for this intervention. Meanwhile, there exists a non-invasive method of integrated cellular membrane assessment. Analysis of membrane transformation in erythrocytes which do not have their own metabolism may be an informative model of cellular membranes in the organism in general. We have examined 52 persons (2 to 17 years old) including 20 children with bronchial asthma and the comparison group comprising 32 healthy age- and sex-matched children. Percentage of spontaneous red blood cells (RBC) transformation in the patients was carried out by means of light microscopy in whole blood smears made of native cell suspension. Children with bronchial asthma (2.6%) exhibited more frequent occurrence of destructive RBC forms than in healthy children (0.8%, $p < 0.05$), with predominance of stomatocytes (0.55% and 0.1%) which were >5 -fold more common in children with bronchial asthma ($p < 0.05$). Respectively, transitional forms were significantly more often encountered in control group (39.9% against 34.12%), $p < 0.05$. Bronchial asthma is characterized by stomatocytic way of RBC transformation.

An indicator of compensatory transformation (a ratio of transitional-to-destructive RBC forms) seems to represent an integrative criterion for membrane ability of reversal to normal state. Children suffering from bronchial asthma ($p < 0.05$) have decreased levels of this compensatory transformation indicator as compared to healthy children (2.1 and 3.5 respectively), as shown in our study. Evaluation of external respiratory function is chosen as the objective parameter defining severity of bronchial asthma.

A strong reverse correlation ($R = -0.82$) is shown between FEV1 index and quantity of spheroids (transitional forms), as well as significant direct correlation ($R = 0.76$) between FEV1 and indicator of compensatory transformation level. Hence, we noted that the patients with bronchial asthma have disturbances of erythrocyte transformation, when compared to healthy children. There is a direct dependence between severity of a disease and expressed changes of RBC membrane transformation.

Keywords: bronchial asthma, erythrocyte transformation, children, lung function, bronchial hyperreactivity, bronchial asthma control

Введение

Согласно современным представлениям, бронхиальную астму рассматривают как самостоятельную нозологическую форму, при которой развивается хроническое аллергическое воспаление, сопровождающееся обратимой

бронхиальной обструкцией и гиперреактивностью бронхов.

Основной механизм развития данного заболевания — аллергологический. Именно на его коррекцию направлены активно применяющиеся в настоящий момент схемы лечения. Их стандартизация и повсеместное применение позво-

лили резко снизить смертность, обусловленную бронхиальной астмой, облегчить течение, снизить частоту и тяжесть приступов бронхиальной обструкции у больных.

Однако доля больных, у которых достигнут полный контроль бронхиальной астмы, согласно современным исследованиям, не превышает пятнадцати процентов среди всех живущих пациентов, страдающих бронхиальной астмой. Даже в наиболее развитых странах, в условиях постоянного профессионального наблюдения и бесплатного снабжения препаратами базисной терапии, она не превышает двух третей больных [2].

В связи с этим разработка новых методов комплексной терапии бронхиальной астмы, направленной на коррекцию не только основного, но и иных звеньев патогенеза, остается одной из главных целей аллергологии.

Наряду с врожденной атопией, значимую роль в формировании и развитии заболевания играет гиперреактивность бронхов, как врожденная, так и приобретенная. В свою очередь гиперреактивность бронхов во многом связана с состоянием мембран эпителия бронхов. Изменения этих мембран не только активно развиваются в ходе патологического процесса, но и предшествуют ему, снижая барьерную функцию бронхов, обеспечивая облегченный доступ ксенобиотиков, физических и химических раздражителей.

Таким образом, изучение состояния мембраны клеток эпителия бронхов могло бы позволить оценить вероятность развития бронхиальной астмы и характер ее течения [5]. Однако получение клеток бронхиального эпителия подразумевает проведение диагностической бронхоскопии с биопсией, это сложная инвазивная процедура, требующая квалифицированного персонала. Кроме того, гиперреактивность бронхов является относительным противопоказанием к ней, поэтому в широкой клинической практике такое исследование неприменимо.

В то же время существует метод интегральной оценки клеточных мембран организма посредством анализа трансформации мембран эритроцитов. Эта клетка не имеет собственного метаболизма, в связи с чем является показательной моделью состояния клеточных мембран организма в целом [3]. Ранее этот метод применялся у детей с бронхиальной астмой, однако не были выявлены взаимосвязи изменения трансформации эритроцитарных мембран и особенностей течения бронхиальной астмы, а также связь компенсаторных возможностей клеточных мембран и выраженности основного заболевания [1].

Исходя из вышеизложенного, нами была поставлена **цель** — изучить особенности трансформации эритроцитов у детей, страдающих

бронхиальной астмой, и выявить зависимости с течением заболевания.

Материалы и методы

Нами обследовано 20 детей с бронхиальной астмой в возрасте от 2 до 17 лет, группа сравнения составила 32 здоровых ребенка, рандомизированных по возрасту и половому составу.

Состояние детей, страдающих бронхиальной астмой, оценивалось согласно стандартам GINA-2015 [7, 8]. Всем детям проводилась оценка спонтанной трансформации эритроцитов путем микроскопирования под световым микроскопом в нативном мазке взвеси цельной крови.

Основным показателем, характеризующим трансформацию эритроцитов, является количество дискоцитов, переходных (сфероиды, ямочные, эхиноциты, стоматоциты) и дегенеративных (сфероциты, шизоциты, пойкилоциты) форм [3].

У практически здоровых людей количество эритроцитов правильной формы (дискоцитов) находится в пределах $75,2 \pm 1,3\%$. Число переходных форм, способных при благоприятных условиях вновь принимать правильную форму, составляет около $12,86 \pm 0,38\%$. На долю эритроцитов, утративших способность принимать необходимую для нормального функционирования форму, приходится $1,2 \pm 0,6\%$. При различной патологии этот показатель может достигать 11,2–26,0%.

Изменение формы эритроцитов может быть результатом нарушения состояния клеточной мембраны под действием всего спектра эндо- и экзогенных факторов, т.е. клетки могут подвергаться различным обратимым и необратимым трансформациям и идти 2-мя путями: эхиноцитарным и стоматоцитарным.

На настоящий момент выявлен ряд эхиноцитогенных и стоматоцитогенных агентов. Прогрессирующие снижение способности эхино-

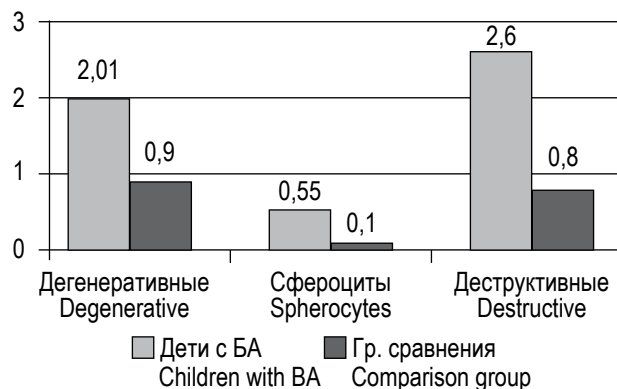


Рисунок 1. Соотношение деструктивных форм эритроцитов

Figure 1. Ratio of destructive erythrocyte forms

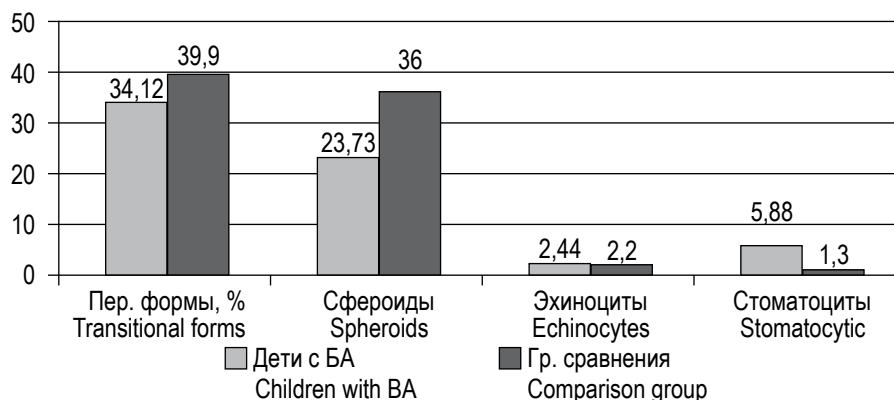


Рисунок 2. Соотношение переходных форм эритроцитов

Figure 2. Ratio of transitional erythrocyte forms

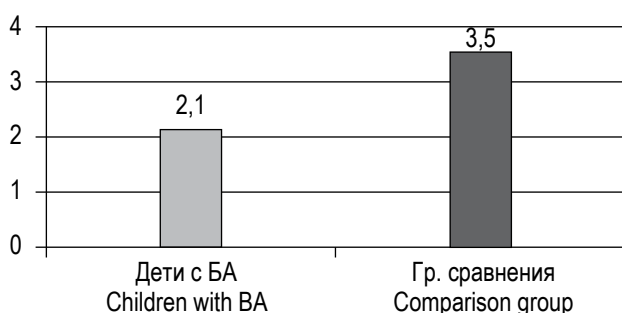


Рисунок 3. Показатель компенсаторной трансформации

Figure 3. Index of compensatory transformation

цитов к деформации происходит параллельно с уменьшением АТФ, накоплением кальция и изменением формы эхиноцита. Стоматоцитарный путь обусловлен снижением трансмембранного градиента рН, что может ингибировать кальциевый насос и вызывать характерные изменения формы клеток по кальций-зависимому механизму [6].

Результаты и обсуждение

В ходе исследования нами выявлена (рис. 1) достоверно ($p < 0,05$) более частая встречаемость деструктивных форм эритроцитов у детей с бронхиальной астмой (2,6%) в сравнении со здоровыми (0,8%) с преобладанием сфероцитов (0,55% и 0,1% соответственно).

В свою очередь переходные формы в целом достоверно ($p < 0,05$) чаще встречаются в группе сравнения (39,9% против 34,12%), однако стоматоциты почти в пять раз чаще ($p < 0,05$) отмечены в крови у детей с бронхиальной астмой (рис. 2), то есть для этой нозологии характерен стоматоцитарный путь трансформации, что делает маловероятным объяснение этих изменений как вторичных, вызванных гипоксией.

Интегральным критерием возможностей мембраны вернуться к норме является показатель компенсаторной трансформации (ПКТ) – соотношение переходных и деструктивных форм, он отражает возможности адаптации клеточных мембран без гибели самой клетки. В наших исследованиях показано (рис. 3) достоверное ($p < 0,05$) снижение ПКТ у детей, страдающих бронхиальной астмой, в сравнении с практически здоровыми (2,1 и 3,5 соответственно).

В качестве наиболее объективного параметра, определяющего степень тяжести бронхиальной астмы, нами выбрана оценка функции внешнего дыхания. В ходе анализа данных исследования показана достоверная сильная обратная корреляционная связь ($R = -0,82$) между показателем ОФВ1 и количеством сфероидов, а также достоверная сильная прямая корреляционная связь ($R = 0,76$) между уровнем ОФВ1 и ПКТ.

Выводы

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. У больных с бронхиальной астмой отмечаются изменения трансформации эритроцитов по сравнению со здоровыми детьми.

2. Имеется прямая зависимость между степенью тяжести заболевания и выраженностью изменений трансформации мембран эритроцитов.

Вышеизложенное ставит вопрос об использовании показателей трансформации эритроцитов для скрининговой оценки состояния клеточных мембран у детей с высоким риском бронхиальной астмы и эффективности компонента комплексной терапии при данной патологии, направленных на уменьшение гиперреактивности бронхов путем стабилизации клеточной мембраны.

Список литературы / References

1. Глазова Т.Г., Рывкин А.И., Побединская Н.С. Морфофункциональное состояние эритроцитов при персистирующем течении бронхиальной астмы у детей // Педиатрия, 2012. № 2. С. 19-23. [Glazova T.H., Rivkin A.I., Pobedinskaya N. With. Morpho-functional state of erythrocytes in persisti-rousham for bronchisentatives of asthma in children. *Pediatriya = Russian Pediatrics*, 2012, no. 2, pp. 19-23. (In Russ.)]
2. Григорьева В.Н., Пунин А.А., Федоров Г.Н., Захарова Ю.В. Комплексная оценка уровней достижения контроля над бронхиальной астмой, по критериям GINA, тесту АСТ и показателям клеточного иммунитета // Пульмонология, 2010. № 2. С. 71-75. [Grigorieva V.N., Punin A.A., Fedorov G.N., Zakharov Yu.V. A comprehensive assessment of levels of achievement of control of bronchial hialnyh asthma, according to GINA criteria, the test AST and indicators of cellular immunity. *Pulmonologiya = Russian Pulmonology*, 2010, no. 2, pp. 71-75. (In Russ.)]
3. Козинец Г.И. Клетки крови и костного мозга. М.: МИА, 2004. 203 с. [Kozinets G.I. Blood cells and bone marrow]. Moscow: MIA, 2004. 203 p.
4. Козинец Г.И., Макарова В.А. Исследование системы крови в клинической практике. М.: Триада-Х, 1998. 480 с. [Kozinets G.I., Makarov V.A. Study of the blood system in clinical practice]. Moscow: Triada-X, 1998. 480 p.
5. Рябова Л.В., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. Местные и системные иммунные механизмы хронического воспаления у больных бронхиальной астмой легкой степени тяжести // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 2-3. С. 169-176. [Ryabova L.V., Zurochka A.V., Khaidukov S.V. Local and systemic immune mechanisms of chronic inflammation in the patients with mild bronchial asthma. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 2-3, pp. 169-176. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2009-2-3-169-176.
6. Супрун С.В., Козлов В.К. Анемические состояния у беременных женщин (клинико-патогенетические аспекты, исходы). Хабаровск: Арно, 2013. 305 с. [Suprun S.V., Kozlov V.K. Anemia status in pregnant women (clinical and pathogenetic aspects, outcomes)]. Khabarovsk: Arno, 2013. 305 p.
7. Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с бронхиальной астмой. Министерство здравоохранения РФ, 2016. 33 с. [Federal clinical practice guidelines for the care of children with bronchial asthma. The Ministry of health of the Russian Federation, 2016. 33 p.
8. Global strategy for asthma management and prevention (update 2015). http://pharmther.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2015/10/GINA_Report_2015_Aug11.pdf

Авторы:

Супрун Е.Н. — к.м.н., доцент ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник, врач аллерголог-иммунолог, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Супрун С.В. — д.м.н., главный научный сотрудник, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства; профессор ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Хабаровск, Россия

Гусева О.Е. — к.м.н., главный врач, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства; старший научный сотрудник, доцент ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Хабаровск, Россия

Authors:

Suprun E.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Far Eastern State Medical University; Senior Research Associate, Clinical Immunologist, Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch, Khabarovsk, Russian Federation

Suprun S.V., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch; Professor, Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Guseva O.E., PhD (Medicine), Head Physician, Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch; Senior Research Associate, Associate Professor, Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Лощенко М.А. — к.м.н., заведующая лабораторией иммунологии, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Пивкина Т.В. — врач-лаборант, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Савицкая Е.А. — заведующая детским соматическим отделением, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Анурьев С.В. — врач функциональной диагностики, Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Осмолкина В.А. — студент ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Брага С.С. — студент ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Loschenko M.A., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunology, Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch, Khabarovsk, Russian Federation

Pivkina T.V., Laboratory Clinician, Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch, Khabarovsk, Russian Federation

Savitskaya E.A., Head, Pediatric Somatic Department, Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch, Khabarovsk, Russian Federation

Anuriev S.V., Doctor for Functional Diagnostics, Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk Branch, Khabarovsk, Russian Federation

Osmolkina V.A., Student, Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Braga S.S., Student, Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Поступила 30.03.2017
Отправлена на доработку 02.05.2017
Принята к печати 03.05.2017

Received 30.03.2017
Revision received 02.05.2017
Accepted 03.05.2017

КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ПАРОДОНТИТЕ

Полушина Л.Г., Светлакова Е.Н., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В.,
Базарный В.В.

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Патогенез пародонтита большинство авторов связывают с нарушением микробиоты ротовой полости и механизмов местного иммунитета. Можно полагать, что успехи в развитии концепции патогенеза, диагностики и лечения заболевания могут быть связаны с иммунологическими исследованиями ротовой жидкости. Цель — дать характеристику цитокинового статуса ротовой жидкости у больных хроническим пародонтитом.

Работа основана на исследовании 101 человека, которые на основании ретроспективного анализа были распределены на две группы: основная группа — 69 больных с пародонтитом средней и тяжелой степени, контрольная группа — 32 практически здоровых добровольца.

В контрольной группе уровни цитокинов соответствовали значениям нормы. У больных пародонтитом концентрация IL-2, IL-4 повышалась. Это дает основание предположить, что цитокиновый баланс при пародонтите характеризуется преобладанием Th2 продуцируемых факторов, то есть активация «противовоспалительных» иммуноопосредованных механизмов. Поскольку в патогенезе пародонтита наряду с иммунными сдвигами важны и нарушения микроциркуляторного русла, в ротовой жидкости определяли уровень VEGF. Его содержание в ротовой жидкости также имело тенденцию к повышению. Нами было установлено, что наиболее высокую диагностическую ценность имеет уровень IL-4 в ротовой жидкости при пародонтите: диагностическая чувствительность 88%, диагностическая специфичность 99%, AUC = 0,95.

Получены данные, соответствующие представлениям о том, что развитие хронического пародонтита сопровождается нарушением локальных иммунных механизмов. Это проявляется дисбалансом продукции цитокинов, прежде всего — активацией продукции IL-4. Можно полагать, что данный цитокин реализует свои патогенетические (иммуноопосредованная деструкция тканей) и протективные эффекты (стимуляция противомикробного иммунитета) при пародонтите. Их соотношение определяет, скорее всего, скорость прогрессирования и развитие осложнений заболевания. Определение содержания IL-4 в РЖ может рассматриваться как потенциальный инструмент лабораторной диагностики заболеваний тканей пародонта в качестве маркера активности патологического процесса.

Ключевые слова: пародонтит, ротовая жидкость, цитокины, диагностическая эффективность

CLINICO-PATHOGENETIC VALUE OF SOME CYTOKINES IN PERIODONTITIS

Polushina L.G., Svetlakova E.N., Sementsova E.A., Mandra Yu.V.,
Bazarny V.V.

Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Most authors ascribe pathogenesis of parodontitis to alterations of oral microbiota and mechanisms of local immunity. One may therefore assume that of the concepts of pathogenesis, diagnosis and treatment of

Адрес для переписки:

Полушина Лариса Георгиевна
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3.
Тел.: 8 (343) 214-85-56.
E-mail: polushina-larisa@bk.ru

Address for correspondence:

Polushina Larisa G.
Ural State Medical University
620028, Russian Federation, Ekaterinburg, Repina str., 3.
Phone: 7 (343) 214-85-56.
E-mail: polushina-larisa@bk.ru

Образец цитирования:

Л.Г. Полушина, Е.Н. Светлакова, Е.А. Семенцова,
Ю.В. Мандра, В.В. Базарный
«Клинико-патогенетическое значение некоторых
цитокинов при пародонтите» // Медицинская
иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 803–806.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-803-806
© Полушина Л.Г. и соавт., 2017

For citation:

L.G. Polushina, E.N. Svetlakova, E.A. Sementsova,
Yu.V. Mandra, V.V. Bazarny "Clinico-pathogenetic value
of some cytokines in periodontitis", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 6,
pp. 803–806.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-803-806
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-803-806

the disease may be successfully developed when implementing immunological studies of oral fluid. The aim of present study was to characterize cytokine status of the oral fluid in patients with chronic periodontitis. The study included 101 subjects who were divided into two groups, according to results of retrospective analysis, i.e., study group (69 patients) with moderate or severe periodontitis, and control group (32 virtually healthy volunteers).

In control group of patients, cytokine levels corresponded to normal values. In the patients with periodontitis, we have revealed increased IL-2, IL-4 levels. This finding suggests that the cytokine balance in periodontitis is characterized by predominance of Th2 produced factors, i.e., activation of “anti-inflammatory” immune-mediated mechanisms. We have also determined VEGF levels in oral fluid, since disturbances of microcirculatory bed seem to be important in evolving periodontitis, along with immune shifts. The VEGF content in oral fluid also tended to increase in the patients. We have found that the IL-4 level in the oral fluid is of high diagnostic value in periodontitis, with diagnostic sensitivity of 88%, and diagnostic specificity of 99% (AUC = 0.95).

In our study, we have obtained data corresponding to general view on altered local immune mechanisms in developing chronic periodontitis. This shift manifests as imbalance in cytokine production, especially, by activated IL-4 production. One may assume that this cytokine exerts both pathogenetic effect (immuno-mediated destruction of tissues) and protective action (stimulation of antimicrobial immunity) in periodontitis. Prevalence and ratio of these effects seems to determine progression rates and development of complications in the disease. Determination of IL-4 content in oral fluid can be considered a potential quantitative tool for laboratory diagnosis of periodontal tissue diseases, being a marker of activity in this pathological process.

Keywords: periodontitis, oral fluid, cytokines, diagnostic efficacy

Болезни пародонта характеризуются широкой распространенностью, тяжестью течения, негативным влиянием на здоровье человека и качество его жизни. Несмотря на определенные достижения в разработке методов профилактики и лечения данного заболевания, в настоящее время еще существует проблема в поиске объективных способов диагностики пародонтита, оценки активности процесса и прогноза прогрессирования заболевания. В частности, традиционное инструментальное исследование состояния пародонта не дает возможности выявлять восприимчивых к данной патологии лиц или осуществлять диагностику на ранних этапах ее формирования [5, 14].

Учитывая, что патогенез пародонтита большинство авторов связывают с нарушением микробиоты ротовой полости и механизмов местного иммунитета, можно полагать, что успехи в развитии концепции патогенеза, диагностики и лечения заболевания могут быть связаны с иммунологическими исследованиями иммунологии полости рта и оценкой свойств ротовой жидкости (РЖ) [6, 9]. Это связано с тем, что по мере прогрессирования пародонтита происходит разрушение мягких тканей, деструкция костной ткани и высвобождение биологически активных веществ, которые могут быть определены в РЖ и затем рассматриваться как кандидаты на роль биомаркеров этого заболевания.

К настоящему времени накоплены данные о наличии в РЖ маркеров воспалительного процесса — кальпротектина, С-реактивного белка, макрофагального воспалительного белка (MIP-1a) и других [1, 2, 4, 14]. При воспалении тканей пародонта уровень факторов иммунной защиты в РЖ повышается, например, лактоферрина, секреторного иммуноглобулина А [2, 3]. Огромное число исследований посвящено изучению цитокинового статуса, играющего ключевую

роль в патогенезе пародонтита, но их результаты отличаются крайней противоречивостью [7, 8, 9, 12], что затрудняет применение полученных результатов в дальнейших изысканиях и их внедрение в клиническую практику. Это определило **цель данного исследования** — дать характеристику цитокинового статуса ротовой жидкости у больных хроническим пародонтитом.

Материалы и методы

Работа основана на исследовании 101 человека, которые на основании ретроспективного анализа были распределены на две группы. Основная группа — 69 больных с пародонтитом средней и тяжелой степени. Диагноз хронического пародонтита был установлен на основании стандартных критериев. Клиническое обследование, наряду со стандартным стоматологическим осмотром, включало дополнительные методы: подсчет индекса интенсивности кариеса зубов (КПУ), определение значения упрощенного индекса гигиены (OHS) и папиллярно-маргинально-альвеолярного индекса (РМА) [5]. Контрольная группа — 32 практически здоровых добровольца.

Нестимулированную ротовую жидкость (РЖ) получали не ранее чем через 3 часа после приема пищи и полоскания полости рта, собирали в пробирки SalivaCapsSet. Пробы замораживали и хранили при температуре -20 °С. Перед исследованием образцы размораживались, хорошо перемешивались и центрифугировались. Содержание интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-17 (IL-17) и васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF) определяли методом твердофазного гетерогенного ИФА с использованием тест-систем «Вектор-Бест» и регистрацией на фотометре Multiscan.

Статистическая обработка результатов проводилась на основании принципов вариационной

статистики с использованием программы Gretl. Переменные с непараметрическим распределением сравнивались при помощи критерия Манна–Уитни, данные представлены как медиана ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для оценки диагностической эффективности лабораторных тестов проводили ROC-анализ [9].

Результаты и обсуждение

Объективными показателями состояния полости рта являются стоматологические индексы КПУ, ОНС, РМА [5]. Все они были повышены у пациентов с пародонтитом, что доказывает адекватность отбора пациентов и отражает тяжесть патологического процесса (табл. 1).

В контрольной группе уровни цитокинов соответствовали значениям, которые многие авторы считают нормой [3, 7, 11]. У больных пародонтитом концентрация IL-2 повышалась на 31,1% ($p < 0,05$). У этих же пациентов наблюдалось значительно повышение уровня IL-4 в 26 раз ($p = 0,001$). Это дает основание предположить, что цитокиновый баланс при пародонтите характеризуется преобладанием Th2-продуцируемых факторов, то есть активацией «противовоспалительных» иммуноопосредованных механизмов.

Концентрация IL-17 у пациентов обеих групп существенно не различалась.

Поскольку в патогенезе пародонтита, наряду с иммунными сдвигами, важны и нарушения микроциркуляторного русла, в РЖ определяли уровень VEGF. Его содержание в РЖ имело тенденцию к повышению (в 2,6 раза, $p = 0,08$), что соответствует представлениям о нарушенной реактивности эндотелия при воспалительном процессе [14].

Для оценки диагностических критериев изучаемых показателей использован ROC анализ с определением площади под ROC кривой (AUC – Area Under Curve), которая характеризует диагностическую эффективность лабораторного теста. Он позволил определить, что наиболее высокую диагностическую эффективность имеет уровень IL-4 в РЖ при пародонтите: диагностическая чувствительность 88%, диагностическая специфичность 99%, AUC = 0,95 (табл. 2).

Заключение

В нашем исследовании получены данные, соответствующие представлениям о том, что развитие хронического пародонтита сопровождается нарушением локальных иммунных механизмов [1, 2, 4, 15]. Это проявляется дисбалансом продукции цитокинов, прежде всего – активацией продукции IL-4. Можно полагать, что данный цитокин реализует свои патогенетические (иммуноопосредованная деструкция тканей) и протективные (стимуляция противомикробного иммунитета) эффекты при пародонтите. Их соотношение определяет, скорее всего, скорость прогрессирования и развитие осложнений заболевания.

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЖ ПАЦИЕНТОВ С ПАРОДОНТИТОМ
TABLE 1. CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ORAL FLUID FROM THE PATIENTS WITH PERIODONTITIS

Показатель Index	Группа сравнения Comparison group	Больные пародонтитом Patients with periodontitis
КПУ, усл. ед CPE, conventional units Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	8,0 (9; 14,5)	15,5 (12; 19)*
ОНС Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	1 (0,6; 1)	2 (1,6; 2,4)
РМА Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	10 (2; 15)	48 (38; 69)*
IL-2, пг/мл IL-2, pg/ml Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	10,0 (8,5; 28,5)	14,5 (5,5; 16,5)*
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	2,3 (1; 8,5)	59,7 (19; 71)*
IL-17, пг/мл IL-17, pg/ml Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	2,7 (0; 3,7)	4,0 (0; 7,5)
VEGF, мг/мл Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	380 (10; 2000)	1000 (230; 2000)

Примечание. * – $p \leq 0,05$.

Note. *, $p \leq 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИТОКИНОВ

TABLE 2. CLINICAL AND DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF CYTOKINES

Показатель Index	Диагно- стическая чувствитель- ность, % Diagnostic sensitivity, %	Диагностиче- ская специ- фичность, % Diagnostic specificity, %	AUC
IL-2	48,5	81,8	0,64
IL-4	88,2	99,0	0,95
IL-17	51,4	78,7	0,61
VEGF	63,2	63,6	0,57

Определение содержания IL-4 в РЖ может рассматриваться как потенциальный инструмент лабораторной диагностики заболеваний тканей пародонта в качестве маркера активности патологического процесса.

Список литературы / References

1. Базарный В.В., Ваневская Е.А., Полушина Л.Г., Мандра Ю.В., Цвиренко С.В. Характеристика секреторного иммунитета при герпетическом стоматите // Клиническая лабораторная диагностика, 2013. № 9. С. 72. [Bazarny V.V., Vanevskaya E.A., Polyshina L.G., Mandra Yu.V., Tsvirenko S.V. Characteristics of secretory immunity in herpetic stomatitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 9, p. 72. (In Russ.)]
2. Базарный В.В., Журавлев В.П., Мандра Ю.В., Николаева А.А., Ваневская Е.А., Полушина Л.Г. Иммунологические особенности ротовой жидкости у пациентов с герпетической инфекцией // Уральский медицинский журнал, 2013. № 5 (110). С. 5-8. [Bazarny V.V., Zhuravlev V.P., Mandra Yu.V., Nikolaeva A.A., Vanevskaya E.A., Polyshina L.G. Immunological features of oral fluid of patients with herpes virus infection. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2013, no. 5 (110). pp. 5-8. (In Russ.)]
3. Базарный В.В., Журавлев В.П., Мандра Ю.В., Николаева А.А., Ваневская Е.А., Полушина Л.Г. Лактоферрин в ротовой жидкости пациентов с герпесвирусной инфекцией // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2014. № 1. С. 48-49. [Bazarny V.V., Zhuravlev V.P., Mandra Yu.V., Nikolaeva A.A., Vanevskaya E.A., Polyshina L.G. Lactoferrin in the oral fluid of patients with herpes virus infection. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2014, no. 1, pp. 48-49. (In Russ.)]
4. Базарный В.В., Полушина Л.Г., Ваневская Е.А. Иммунологический анализ ротовой жидкости как потенциальный диагностический инструмент // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 769-771. [Bazarny V.V., Vanevskaya E.A., Polyshina L.G. Immunological assay oral fluid as potential diagnostic tool. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 3, pp. 769-771. (In Russ.)]
5. Дмитриева Л.А., Максимовский Ю.М. Терапевтическая стоматология: национальное руководство. М: ГЭОТАР-Медиа, 2009. С. 125-128. [Dmitrieva L.A., Maksimovskiy Yu.M. Therapeutic dentistry: national leadership]. Moscow: GEOTAR-Media, 2009, pp. 125-128.
6. Лепилин А.В., Дубровская М.В. Иммунологические нарушения в формировании заболеваний пародонта у беременных // Саратовский научно-медицинский журнал, 2010. Т. 6, № 2. С. 392-396. [Lepilin A.V., Dubrovskaya M.V. Immunological disorders in formation of periodontal diseases at pregnant women. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2010, Vol. 6, no. 2, pp. 392-396. (In Russ.)]
7. AlMoharib H.S., Mubarak A.A., Rowis R.A., Geevarghese A., Preethanath R.S. Oral Fluid Based Biomarkers in Periodontal Disease: Part 1. Saliva. *J. Int. Oral Health*, 2014, no. 6 (4), pp. 95-103.
8. Ertugrul A.S., Sahin H., Dikilitas A., Alpaslan N., Bozoglan A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 2013, no. 48 (1), pp. 44-51.
9. de Campos B.O., Fischer R.G., Gustafsson A., Figueredo C.M. Effectiveness of non-surgical treatment to reduce il-18 levels in the gingival crevicular fluid of patients with periodontal disease. *J. Braz. Dent.*, 2012, no. 23 (4), pp. 428-432.
10. Fawcett T. ROC graphs: Notes and practical considerations for researchers. Kluwer Academic Publishers, 2004, pp. 2-7.
11. Polepalle T., Moogala S., Boggarapu S., Pesala D.S., Palagi F.B. Acute phase proteins and their role in periodontitis: a review. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2015, no. 9 (11), ZE01-ZE05. doi: 10.7860/JCDR/2015/15692.6728
12. Maney P., Leigh J. Interleukin polymorphisms in aggressive periodontitis: a literature review. *J. Indian Soc. Periodontol.*, 2015, no. 19 (2), pp. 131-141.
13. Suk J., Youngnim C. Point-of-care diagnosis of periodontitis using saliva: technically feasible but still a challenge. *J. List Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2015, Vol. 5.
14. Taylor J. Protein biomarkers of periodontitis in saliva. *ISRN Inflamm.*, 2014, p. 18.
15. Yoshizawa J.M., Schafer C.A., Schafer J.J., Farrell J.J., Paster B.J., Wong D.T. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin. Microbiol.*, 2013, no. 26 (4), pp. 781-791.

Авторы:

Полушина Л.Г. — научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Светлакова Е.Н. — к.м.н., ассистент кафедры пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Семенцова Е.А. — к.м.н., ассистент кафедры пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Мандра Ю.В. — д.м.н., профессор, проректор по науке и инновациям, заведующая кафедрой пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Базарный В.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Polushina L.G., Research Associate, Central Research Laboratory, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Svetlakova E.N., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department for Dental Propedeutics and Physiotherapy, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Sementsova E.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department for Dental Propedeutics and Physiotherapy, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Mandra Yu.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Rector for Science and Innovation, Head, Department for Dental Propedeutics and Physiotherapy, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Bazarnyi V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Central research laboratory, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 06.04.2017

Отправлена на доработку 02.05.2017

Принята к печати 20.06.2017

Received 06.04.2017

Revision received 02.05.2017

Accepted 20.06.2017

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-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление. — 2012. — Т. 11, №1. — С. 64–69.

Varjushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbircev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no.1, pp. 64–69.

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. — М.: Анахарсис, 2009. — 328 с.

Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. *Moscow: Anacharsis*, 2009, 328 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503–5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. *Basic and Clinical Immunology*. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Алхазова Б.И.	705	Ишук В.Н.	749	Останин А.А.	779	Степанова Н.Н.	739
Ануриев С.В.	797	Кожевников Ю.А.	779	Островская А.Е.	739	Супрун Е.Н.	797
Арбатский Н.П.	705	Коновальчик М.А.	789	Пашенков М.В.	705	Супрун С.В.	797
Базарный В.В.	803	Криволапова Э.Г.	789	Петрович Д.М.	771	Телесманич Н.Р.	789
Баранов С.И.	779	Крюков П.М.	763	Пивкина Т.В.	797	Тимофеева Т.А.	721
Баторов Е.В.	779	Кундер Е.В.	771	Полосков В.В.	721	Хаитов М.Р.	657
Беркос А.С.	755	Курбачева О.М.	731	Полушина Л.Г.	803	Хаитов Р.М.	657
Бондарева Г.П.	731	Лошенко М.А.	797	Понасенко А.В.	763	Хайдуков С.В.	731
Брага С.С.	797	Львов В.Л.	705	Попова Н.Д.	779	Хворостухина Н.Ф.	739
Бубнова Л.Н.	755	Мандра Ю.В.	803	Руднева И.А.	721	Цепочкина А.В.	763
Ватутина В.А.	755	Матвеева Л.В.	673	Савицкая Е.А.	797	Черных Е.Р.	779
Волкова М.В.	771	Микашинович З.И.	789	Савлевич Е.Л.	731	Шабалдин А.В.	763
Генералов И.И.	771	Морева Л.А.	715	Светлакова Е.Н.	803	Шабалина Е.В.	763
Герцев А.В.	749	Нижегорова Д.Б.	683	Семенцова Е.А.	803	Шачнев К.Н.	731
Гусева О.Е.	797	Никонова А.А.	657	Симбирцев А.С.	731	Шевела Е.Я.	779
Дагиль Ю.А.	705	Ница Н.А.	779	Соколова Т.М.	721	Шмулевич С.А.	763
Довгалюк И.Ф.	755	Новичков Д.А.	739	Соколова Ю.В.	755	Шувалов А.Н.	721
Закревский Ю.Н.	749	Овчинникова Ю.Э.	755	Старостина Н.М.	779	Юрчинский В.Я.	715
Зафранская М.М.	683	Осмолкина В.А.	797	Старшинова А.А.	755	Яблонский П.К.	755

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

абзимы	771	остеоартроз	779
аллели	755	пародонтит	803
антитела	789	позвоночные животные	715
астения	750	полипозный риносинусит	732
атопия	732	поляризация моноцитов	657
бактерии	657	проточная цитометрия	732
бронхиальная астма	657, 732, 798	рассеянный склероз	683
вирус гриппа А (H1N1)pdm09	721	реактивный артрит	771
вирусы	657	ревматоидный артрит	771
воспаление	750	репродуктивные потери	763
врожденные пороки сердца	763	ротовая жидкость	803
генерализованный туберкулез	755	сахарный диабет	789
герпесвирус	673	системный иммунитет	732
гетерогенность	771	сравнительная морфология	715
гиперреактивность бронхов	798	стромально-васкулярная фракция	779
гипертензия	750	Т-лимфоцит	673
группы крови (ABO)	789	Т-лимфоциты	715
дети	755, 798	тимус	715
диагностическая эффективность	803	трансформация эритроцитов	798
доплерометрия	740	туберкулезная инфекция	755
иммуногенетика	755	урогенитальные инфекции	740
иммуноглобулин Е	789	функция внешнего дыхания	798
иммуноглобулины	771	хемилюминесценция	706
иммунологические маркеры	789	ХОБЛ	657
интерлейкин	673, 750	цитокин	750
интерферон	673	цитокины	740, 803
клеточная терапия	683	шкала ВАШ	779
клеточная цитотоксичность	673	шкала KOOS	779
контроль над бронхиальной астмой	798	экспрессия генов TLR7	721
лимфоциты	732	Candida	673
макрофаги	657	CRISPR/Cas9	706
маркеры	657	Helicobacter pylori	673
мезенхимальные стволовые клетки	683	HLA-G 3'UTR 14-bp ins/del	763
мезо-диаминопимелиновая кислота	706	N-ацетилмурамовая кислота	706
миома матки	740	NOD1	706
моноцитарные макрофаги	721	NOD2	706
моноциты	657	RIG1 рецепторы	721
мурамилпептиды	706	β-эндорфин	750
нарушения углеводного обмена	789		
непереносимость НПВП	732		
нуклеазная активность	771		
осложнения гормонотерапии	740		

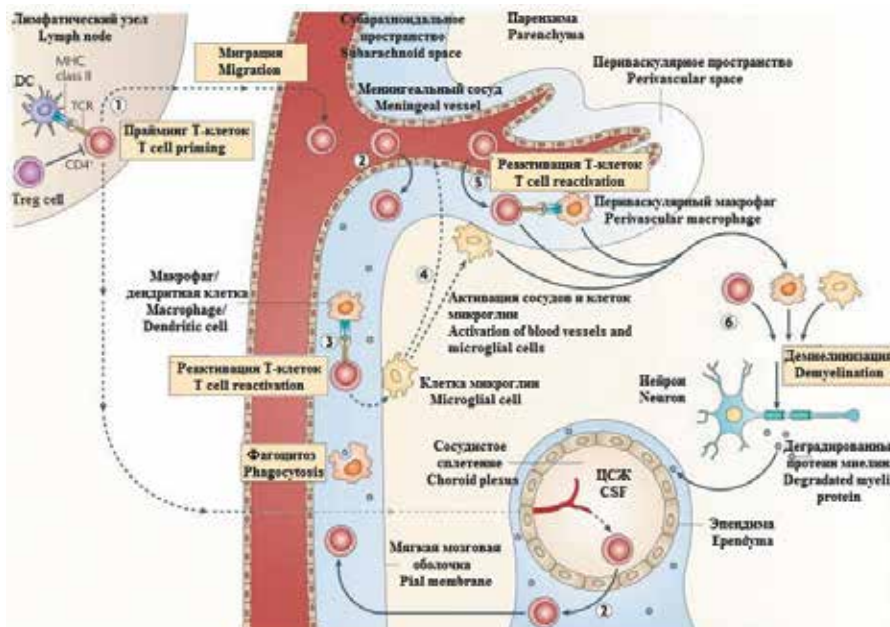


Рисунок 1. Периферическая и центральная активация миелин-специфических лимфоцитов [52]

Примечание. Т-лимфоциты праймируются на периферии дендритными клетками (ДК), презентирующими миелиновые (или кросс-реактивные) эпитопы. Антиген-презентирующие клетки (АПК) в ЦНС поглощают миелиновые Ag *in situ* и мигрируют в цервикальные лимфатические узлы. Кроме того, растворимые миелиновые Ag могут дренироваться из ЦНС в лимфатические узлы, где фагоцитируются локальными АПК (1). Т-клетки проникают в субарахноидальное пространство (2). Т-клетки реактивируются в субарахноидальном пространстве макрофагами и ДК, экспрессирующими миелиновые эпитопы в комплексе с молекулами МНС II (3). Реактивированные Т-лимфоциты стимулируют расположенные под мягкой мозговой оболочкой клетки микроглии, активируя тем самым дистальные клетки микроглии и кровеносные сосуды (4). Активированные Т-клетки прикрепляются и пересекают ГЭБ, проникают в периваскулярное пространство и реактивируются периваскулярными макрофагами и ДК (5). Т-клетки проникают в паренхимы и совместно с активированными макрофагами и клетками микроглии секретируют растворимые медиаторы, индуцирующие механизмы демиелинизации (6). T_{reg} – регуляторные Т-лимфоциты.

Figure 1. Peripheral and central activation of myelin-specific lymphocytes [52]

Note. T cells are primed at the periphery by dendritic cells (DCs) presenting myelin (or myelin crossreactive) epitopes. Antigen-presenting cells (APCs) residing in the CNS can capture myelin antigens *in situ* and migrate to the cervical lymph nodes. Alternatively, soluble myelin antigens can drain from the CNS to lymph nodes to be phagocytized by local APCs (1). T cells enter the subarachnoid space (2); the T cells are re-activated within the subarachnoid space by MHC class II-expressing macrophages and DCs expressing myelin epitopes (3). Reactivated T cells activate microglial cells in the subpial region, triggering activation of distal microglial cells and blood vessels (4). Activated T cells adhere to and cross the activated blood-brain barrier, enter the perivascular space and are reactivated by perivascular macrophages and DCs (5). T cells enter the parenchyma and, together with activated macrophages and microglial cells, secrete soluble mediators that trigger demyelination (6). T_{reg} , regulatory T cells.

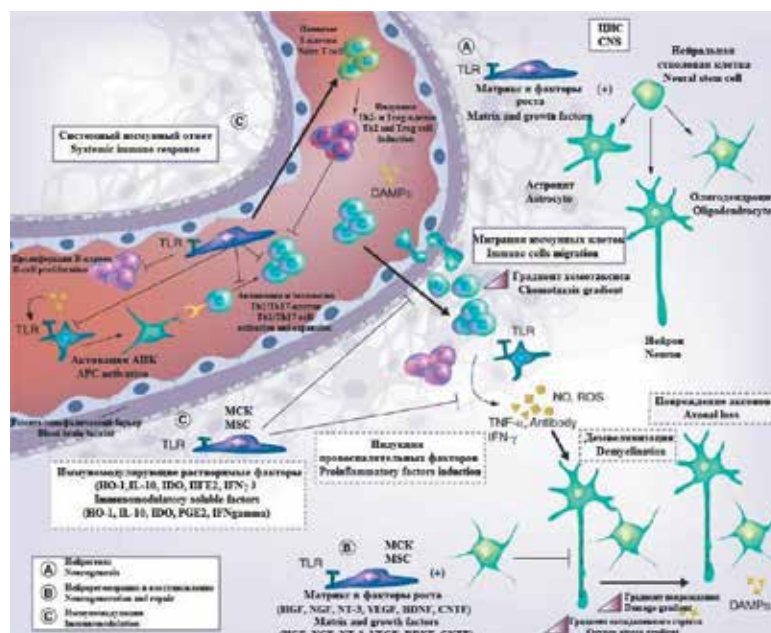


Рисунок 2. Механизмы терапевтического действия МСК [8]

Примечание. Предполагаемые механизмы действия МСК лежат в основе патофизиологии РС и экстраполированы из мышиных моделей ЭАЭ. Сигналы для аутоиммунно-медирированного воспаления продуцируются или аутореактивными лимфоцитами («системный иммунный ответ») или являются результатом повреждения вследствие олигодендроглиальной или аксональной дегенерации. TLRs распознают как DAMPs, так и PAMPs и стимулируют клетки врожденного иммунитета к продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов и к активации потенциальных АПК для взаимодействия с наивными Т-лимфоцитами. Последующая активация и экспансия провоспалительных Th1 и Th17 и их растворимых факторов увеличивает хемотаксический градиент, приводящий к миграции клеток в ЦНС. Цитокины (IFN γ и TNF α), аутоАТ и гипоксия-индуцибельные факторы (NO и ROS [nitrogen and reactive oxygen species]) являются причиной демиелинизации и повреждения/потери аксонов. В дополнение, повреждения аксонов и миелина также индуцируют хемотаксический провоспалительный градиент, что приводит к дополнительной активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета к продукции нейротоксических факторов. Предполагаемые механизмы МСК включают: А) нейрогенез, В) регенерацию и восстановление миелина и аксонов и С) снижение системного и локального воспалительного ответа в ЦНС.

Figure 2. Mechanisms of MSC therapeutic effect [8]

Note. Proposed mechanisms of MSC action underlying the pathophysiology of multiple sclerosis are mainly extrapolated from murine EAE models. Instigating signals for autoimmune-mediated proinflammation arise from either autoreactive lymphocytes in the body ('systemic immune response') or damage gradients caused by oligodendroglial and axonal degeneration within the CNS. Specifically, TLRs recognize both DAMPs and PAMPs and activate innate immune cells to produce proinflammatory cytokines and chemokines, and to serve as potent APCs for naive T cells. Subsequent activation and expansion of proinflammatory Th1 and Th17 cells and their soluble factors increases chemotaxis gradients, ultimately resulting in their emigration into the CNS. Cytokines (IFN γ and TNF α), autoantibodies and hypoxia-inducible factors including NO and ROS cause demyelination and ultimately axonal injury/loss. In addition, damage to myelin and axons can also induce proinflammatory damage gradients, which can activate innate and adaptive immune cells in the CNS to release neurotoxic soluble factors. Proposed effects of MSCs include (A) neurogenesis, (B) regeneration and repair of myelin and axons, and (C) downmodulation of the systemic and CNS inflammatory response.

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

