

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

Том 20, № 1. С. 1-144

2018

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

KEDRION

BIOPHARMA

Keep Life Flowing

И.Г.Вена

ИММУНОГЛОБУЛИН ЧЕЛОВЕКА НОРМАЛЬНЫЙ
РАСТВОР ДЛЯ ИНФУЗИЙ

ВЫСОКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ПЕРЕНОСИМОСТЬ

АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ ВСЕМ НУЖНЫ



www.kedrion.com

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

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

январь-февраль

2018, том 20

№ 1

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

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

Кетлинский Сергей Александрович – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, 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@spb.aaci.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»

199178, Россия, Санкт-Петербург, 5-я линия В.О., 68, корп. 2, оф. 238

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 27.12.2017 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 18. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.)

Напечатано в ООО «ИПК Береста».

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

Тел.: (812) 388-90-00

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

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

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

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

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

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

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

January-February

2018, volume 20

No. 1

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

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

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

199178, Russian Federation, St. Petersburg, 5th line Vasilevsky Island, 68, bldg 2, office 238.

E-mail: mail@mirmed.ru

Phone/fax: (812) 325-25-64.

Passed for printing 27.12.2017. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 18. 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

Лугачева Л.И., Мусатов М.И.

СТРУКТУРА ПУБЛИКАЦИЙ РОССИЙСКОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ И АЛЛЕРГОЛОГИИ (НАУЧНЫЕ СТАТЬИ, КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ, МЕТААНАЛИЗЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РУКОВОДСТВА) В СРАВНЕНИИ С ДРУГИМИ СТРАНАМИ БРИКС В 2008-2015 ГГ 7

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

ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА 19

Оригинальные статьи

Данилова И.Г., Емельянов В.В., Гетте И.Ф., Медведева С.Ю., Булавинцева Т.С., Черешнева М.В., Сидорова Л.П., Черешнев В.А., Соколова К.В.

ЦИТОКИНОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС И ЕГО КОРРЕКЦИИ СОЕДИНЕНИЕМ РЯДА 1,3,4-ТИАДИАЗИНА И ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ 35

Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С.

ЭФФЕКТЫ γ -ЦИТОКИНОВ (IL-2, IL-7 И IL-15) НА СОЗРЕВАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ CD45RO⁺CD4⁺CD8⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ IN VITRO 45

Раджаббадиев Р.М., Ригер Н.А., Никитюк Д.Б., Галстян А.Г., Петров А.Н., Евсюкова А.О., Ханферьян Р.А.

СОПОСТАВЛЕНИЕ УРОВНЯ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ И НЕКОТОРЫХ АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ 53

Савченко А.А., Каспаров Э.В., Арутюнян С.С., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В.

ВЗАИМОСВЯЗЬ СОДЕРЖАНИЯ Th- И Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В КРОВИ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ И АДНЕКСИТОМ 61

Шмидт Е.А., Бернс С.А., Жидкова И.И., Макеева О.А., Гончарова И.А., Нагирняк О.А., Клименкова А.В., Литвинова М.Н., Барбараш О.Л.

СВЯЗЬ ВАРИАБЕЛЬНОГО САЙТА rs1041981 ГЕНА ЛИМФОТОКСИНА- α С РАЗВИТИЕМ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ИСХОДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ БЕЗ ПОДЪЕМА СЕГМЕНТА ST В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ 73

Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Шершнев В.Н.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НОРМАТИВНЫХ ЗНАЧЕНИЙ ТРЕС И КРЕС В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ РАЗНОГО СРОКА ГЕСТАЦИИ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ 85

Карпук И.Ю.

ТРИПТАЗА РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ И IgE-АНТИТЕЛА КАК МАРКЕР АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА 99

Краткие сообщения

Жаркова М.С., Копейкин П.М., Афиногенов Г.Е., Орлов Д.С., Артамонов А.Ю., Сафиуллина К.Э., Сухарева М.С., Цветкова Е.В., Мильман Б.Л., Афиногенова А.Г., Шамова О.В.

ДЕЙСТВИЕ ПРОЛИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА НА АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ 107

Лапштаева А.В., Евсегнеева И.В., Новиков В.В., Сычев И.В., Караулов А.В.

СЫВОРОТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 α , ПОЛИМОРФИЗМ ЕГО ГЕНА И РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДОМ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПОЛОДОТВОРЕНИЯ 115

Герцев А.В., Ищук В.Н.

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ИМПУЛЬСНОЙ ЭЛЕКТРОТЕРАПИИ (ЭЛЕКТРОСОНТЕРАПИИ) НА НЕЙРОПЕПТИДНО-ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ НА ФОНЕ АСТЕНО-НЕВРОТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, У МУЖЧИН МОЛОДОГО ВОЗРАСТА ИЗ ГРУППЫ НАПРЯЖЕННЫХ ПРОФЕССИЙ 123

Назаров В.Д., Лапин С.В., Добронравов В.А., Смирнов К.А., Майер Д.А., Мужецкая Т.О., Тотолян Арег А.

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ АНТИТЕЛА К ЭРИТРОПОЭТИНУ СВЯЗАНЫ СО СНИЖЕНИЕМ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ АНЕМИИ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ЭРИТРОПОЭТИНАМИ У ПАЦИЕНТОВ НА ГЕМОДИАЛИЗЕ 129

Смирнова О.В., Цуканов В.В., Титова Н.М., Губанов Б.Г.

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ГЕНЕЗА 135

Правила для авторов 141

Авторский указатель 144

Предметный указатель 144

CONTENTS

Reviews

Lugacheva L.I., Musatov M.I.

STRUCTURE OF RUSSIAN PUBLICATIONS IN CLINICAL IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY (JOURNAL ARTICLES, CLINICAL TRIALS, META-ANALYSES AND PRACTICE GUIDELINES) IN COMPARISON WITH OTHER BRICS COUNTRIES IN 2008-20157

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

IMMUNOPATHOGENETIC ASPECTS OF ISCHEMIC STROKE 19

Original articles

Danilova I.G., Emelianov V.V., Gette I.F., Medvedeva S.Yu., Bulavintseva T.S., Chereshneva M.V., Sidorova L.P., Chereshnev V.A., Sokolova K.V.

CYTOKINE REGULATION OF REGENERATIVE PROCESSES IN PANCREATIC GLAND IN ALLOXAN-INDUCED DIABETIC RATS, AND IT CORRECTION BY 1,3,4-THIADIAZINE COMPOSITION AND LIPOIC ACID35

Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Litvinova L.S.

EFFECTS OF γ C-CYTOKINES (IL-2, IL-7 AND IL-15) UPON *IN VITRO* MATURATION AND DIFFERENTIATION OF CD4⁺CD45RO⁺/CD8⁺CD45RO⁺ T CELLS.....45

Radzhabkadiyev R.M., Riger N.A., Nikityuk D.B., Galstyan A.G., Petrov A.N., Evsyukova A.O., Khanferyan R.A.

COMPARISON OF THE LEVEL OF IMMUNOREGULATORY CYTOKINES AND SOME ANTHROPOMETRIC PARAMETERS OF HIGHLY SKILLED ATHLETES53

Savchenko A.A., Kasparov E.V., Arutyunyan S.S., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V.

RELATIONSHIP BETWEEN THE TH AND T REGULATORY CELLS IN BLOOD, AND CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS AND ADNEXITIS.....61

Shmidt E.A., Berns S.A., Zhidkova I.I., Makeeva O.A., Goncharova I.A., Nagirnyak O.A., Klimenkova A.V., Litvinova M.N., Barbarash O.L.

ASSOCIATION OF A LYMPHOTOXIN- α VARIABLE SITE rs1041981 WITH DEVELOPMENT OF LONG-TERM UNFAVORABLE OUTCOMES IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME WITHOUT ST-SEGMENT ELEVATION73

Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Shershnev V.N.

DETERMINATION OF REFERENCE VALUES FOR TREC AND KREC IN DRY BLOOD SPOTS OF NEWBORNS FROM DIFFERENT GESTATION AGES IN SVERDLOVSK REGION.....85

Karpuk I.Yu.

TRYPTASE OF ORAL LIQUID AND IGE-ANTIBODIES AS A MARKER OF ALLERGIC INFLAMMATION IN THE ORAL MUCOSA99

Short communications

Zharkova M.S., Kopeykin P.M., Afinogenov G.E., Orlov D.S., Artamonov A.Yu., Safiullina K.E., Sukhareva M.S., Tsvetkova E.V., Milman B.L., Afinogenova A.G., Shamova O.V.

EFFECTS OF PROLINE-RICH PEPTIDES OF THE INNATE IMMUNE SYSTEM ON DRUG-RESISTANT BACTERIAL STRAINS 107

Lapshtaeva A.V., Evsegneeveva I.V., Novikov V.V., Sychev I.V., Karaulov A.V.

SERUM LEVEL AND GENE POLYMORPHISM OF INTERLEUKIN-1 α , AND EFFICIENCY OF INFERTILITY TREATMENT BY *IN VITRO* FERTILIZATION..... 115

Gertsev A.V., Ischuk V.N.

CHARACTERISTIC INFLUENCE OF PULSE ELECTROTHERAPY (ELECTRICAL SLEEP) AT A NEUROPEPTIDE-CYTOKINE LINKS IN ARTERIAL HYPERTENSION ACCOMPANIED BY A ASTHENONEUROTIC DISTURBANCES IN YOUNG MEN EMPLOYED IN STRESSFUL PROFESSIONS..... 123

Nazarov V.D., Lapin S.V., Dobronravov V.A., Smirnov K.A., Mayer D.A., Muzhetskaya T.O., Totolian Areg A.

CIRCULATING ANTIBODIES TO ERYTHROPOIETIN ARE ASSOCIATED WITH LOWER EFFICACY OF RECOMBINANT EPOETIN TREATMENT IN PATIENTS UNDERGOING HAEMODIALYSIS 129

Smirnova O.V., Tsukanov V.V., Titova N.M., Gubanov B.G.

FEATURES OF CYTOKINE REGULATION IN PATIENTS WITH MECHANICAL JAUNDICE OF MALIGNANT GENESIS 135

Instructions to Authors 141

Author index 144

Subject index..... 144

СТРУКТУРА ПУБЛИКАЦИЙ РОССИЙСКОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ И АЛЛЕРГОЛОГИИ (НАУЧНЫЕ СТАТЬИ, КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ, МЕТААНАЛИЗЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РУКОВОДСТВА) В СРАВНЕНИИ С ДРУГИМИ СТРАНАМИ БРИКС В 2008-2015 гг.

Лугачева Л.И.^{1, 2}, Мусатов М.И.^{1, 3}

¹ ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

² ФГБУН «Институт организации экономики и промышленного производства» СО РАН, г. Новосибирск, Россия

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Очевидно, что любое развивающееся научное медицинское направление представляет собой динамическую систему, которая не может задерживаться на этапе накопления первичной информации и неизбежно переходит к этапам клинических испытаний, обобщению полученной информации в метаанализах и завершает исследование созданием практических руководств. Целью настоящего исследования был количественный анализ опубликованного массива данных в области клинической иммунологии в России в 2008-2015 гг. с выявлением в нем доли клинических испытаний, метаанализов и практических руководств и ее оценки путем сравнения с данными других стран БРИКС. Дизайн исследования — ретроспективное библиометрическое. Выявлено, что в России на 1000 оригинальных статей приходилось 16 клинических испытаний, 3 метаанализа и 1 практическое руководство. Соответственно, в Китайской Народной Республике это соотношение составило 34/25/4; в Федеративной Республике Бразилия — 42/87/7; в Республике Индия — 76/58/34 и в Республике Южная Африка — 134/43/36. Наряду с этим получены данные, позволяющие считать, что перспективы развития научной клинической иммунологии в России выглядят достаточно оптимистично.

Ключевые слова: библиометрика, клинические испытания, метаанализы, практические рекомендации

Адрес для переписки:

Мусатов Михаил Иванович
ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет»
630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2.
Тел.: 8 (913) 703-40-49.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: lugamus@yandex.ru

Address for correspondence:

Musatov Mikhail I.
Novosibirsk State University
630090, Russian Federation, Novosibirsk, Pirogov str., 2.
Phone: 7 (913) 703-40-49.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: lugamus@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.И. Лугачева, М.И. Мусатов «Структура публикаций российской клинической иммунологии и аллергологии (научные статьи, клинические испытания, метаанализы и практические руководства) в сравнении с другими странами БРИКС в 2008-2015 гг.» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 7-18.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-7-18
© Лугачева Л.И., Мусатов М.И., 2017

For citation:

L.I. Lugacheva, M.I. Musatov "Structure of Russian publications in clinical immunology and allergology (journal articles, clinical trials, meta-analyses and practice guidelines) in comparison with other BRICS countries in 2008-2015", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 7-18.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-7-18
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-7-18

STRUCTURE OF RUSSIAN PUBLICATIONS IN CLINICAL IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY (JOURNAL ARTICLES, CLINICAL TRIALS, META-ANALYSES AND PRACTICE GUIDELINES) IN COMPARISON WITH OTHER BRICS COUNTRIES IN 2008-2015

Lugacheva L.I.^{a, b}, Musatov M.I.^{a, c}

^a Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

^b Institute of Economics and Industrial Engineering, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

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

Abstract. It is obvious that any evolving scientific medical field is a dynamic system that cannot stay at the stage of accumulation of primary information, and inevitably goes to the stages of clinical trials, generalization of information in meta-analyses and completes the study by creation of practical guidelines. The purpose of this study was a quantitative analysis of publicly available data in the field of clinical immunology in Russia during 2008-2015, identifying the ratios of clinical trials, meta-analyses, and practical guidelines, as well as evaluating the results by comparison with other BRICS countries. Study design was performed by retrospective bibliometric methods. It is revealed, that, in Russia, 16 clinical trials, 3 meta-analyses and 1 practice guideline were issued per 1000 original journal articles. Accordingly in the People's Republic of China this ratios have made 34/25/4; in Federal Republic of Brazil, 42/87/7; in Republic of India, 76/58/34, and in Republic of Southern Africa, 134/43/36. Moreover, we have obtained evidence which suggests optimistic prospectives for scientific clinical immunology in Russia.

Keywords: *bibliometrics, clinical trials, meta-analyses, practice guideline*

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке Российского гуманитарного научного фонда (проект № 16-03-00345 «Научометрическая оценка качества отечественных исследований в клинической иммунологии»).

Введение

Выражение «золотой стандарт» применительно к рандомизированным клиническим испытаниям (РКИ) уже давно перестало быть образным и используется как обозначение самого высокого уровня оценки эффективности технологий здравоохранения [7]. Очевидно, что любое развивающееся научное медицинское направление представляет собой динамическую саморегулирующуюся систему, которая не может задерживаться на этапе накопления первичной информации, получаемой в экспериментальных и клинических исследованиях, и неизбежно переходит к этапам клинических испытаний (КИ), обобщению полученной информации в метаанализах (МетаА) и систематических обзорах и за-

вершает исследование созданием практических руководств (ПР) [6]. Этот процесс должен отражаться в структуре публикаций научного направления — определенными количественными соотношениями публикаций о КИ, МетаА и ПР, и эти соотношения, с другой стороны, будут являться объективной мерой эффективности данного направления.

К 2000 г. среди отечественных публикаций по клинической иммунологии было выявлено 17 отчетов о КИ [2]. По-видимому, это отражало инициативную активность части иммунологического сообщества, поскольку «Национальный стандарт Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика» ГОСТ Р 5239-2005 был издан в 2005 г. и введен в действие в апреле 2006 г.

Данные о частоте КИ, МетаА и ПР в какой-либо стране не имеют самостоятельного количественного аспекта, их можно оценить только в сравнении. Сопоставление с другими странами БРИКС выбрано не случайно — в рамках данной организации развивается сотрудничество в обла-

сти здравоохранения, где страны БРИКС имеют общие приоритеты. Кроме того, страны БРИКС имеют сопоставимый (кроме Индии) уровень расходов на здравоохранение [1].

В связи с этим представлялось актуальным провести сравнительное исследование уровня прогресса в отечественной клинической иммунологии в последние годы — оценить структуру публикаций, отражающую уровень реальной эффективности исследований.

Целью настоящего исследования был количественный анализ опубликованного массива данных в области клинической иммунологии в России в 2008-2015 гг. с выявлением в нем доли КИ, Мета, ПР и ее оценка путем сравнения с данными других стран БРИКС.

Материалы и методы

Дизайн исследования. Наукометрическое (библиометрическое) ретроспективное исследование

Формирование информационной базы. Учитывались четыре категории публикаций: журнальная статья (ЖС), статья с описанием результатов клинического испытания (КИ), статья с результатами метаанализа (Мета), практические руководства (ПР).

Использовались три массива информации: полиграфические версии российских иммунологических журналов, база данных PubMed Национальной медицинской библиотеки США (НМБ) и данные о регистрации КИ: реестр выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов (РФ), регистр Национальных институтов здоровья (США), регистр BioMedCentral (США) и регистр ВОЗ.

В полиграфических версиях журналов проводился «ручной поиск» (hand search) за 2008-2015 гг. Анализировались следующие издания: «Аллергология и иммунология», «Иммунология», «Иммунология гемопоеза», «Иммунопатология, аллергология, инфектология», «Инфекция и иммунитет», «Медицинская иммунология», «Российский аллергологический журнал», «Российский иммунологический журнал». В журналах «ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии» и «Аллергология и иммунопатология в педиатрии» использовался поиск по названиям и рефератам публикаций в отдельных выпусках с помощью системы поиска научной электронной библиотеки eLIBRARY.ru с возможностью обращения при необходимости к полиграфическим версиям

журналов. Во всех вышеперечисленных журналах при включении публикаций в выборку не проводилось их дифференцирование на принадлежность к «иммунологии» или «аллергологии».

Поиск публикаций в российских журналах, приобретаемых НМБ, а также публикаций российских авторов в международных изданиях производился в базе PubMed с помощью расширенной системы поиска: в запросах оператором “AND” объединялись названия медицинской подрубрики “Immunology” или Mesh-термина “Allergy”, тип публикации (Journal article, Clinical trial или Meta analysis), временной период и указание российской аффилиации. Для поиска публикаций о практических рекомендациях использовалось включение текстовых терминов “guidelines” или “practical guidelines” в название или реферат публикации.

Поиск в НМБ публикаций других стран-членов БРИКС — Федеративной Республики Бразилия, Китайской Народной Республики, Республики Индия и Республики Южная Африка — осуществлялся аналогично с указанием соответствующей аффилиации.

Поскольку в подрубку “Immunology” формально не должны включаться статьи, относящиеся к диагностике, профилактике и лечению, то для российских публикаций был дополнительно проведен также поиск с включением в запрос подрубик “diagnosis”, “prevention and control”, “therapy”.

Критерии включения

При анализе полиграфических версий российских журналов в выборку как ЖС включались только публикации (статьи, краткие сообщения, публикации Всероссийского иммунологического форума на Урале), в целом соответствующие по структурированности критериям “Journal Article” в НМБ. В качестве контент-критерия использовалась принадлежность статьи к объекту исследования «человек» (при поиске в PubMed использовался фильтр “human”). Публикации с результатами КИ, Мета и ПР включались в выборку на основании данных названия и реферата статьи. КИ авторы считали статью, соответствующую определению: “‘Trial’ refers to a prospective controlled or uncontrolled research study evaluating the effects of one or more health-related interventions assigned to human participants. For example, a trial may investigate interventions related to one or more of the following: prevention, health promotion, screening, diagnosis, treatment, rehabilitation, or

organisation and financing of care” [5] и “A clinical trial is a prospective study in which 1 or more interventions are assigned to human participants to assess the effects on health-related outcomes” [4]. Включались также публикации, в которых не был указан тип исследования, не приводилось данных о регистрации, но сообщалось об использовании рандомизации при формировании групп исследования.

Критерии исключения

Не включались обзорные статьи, редакционные комментарии, лекции, публикации из рубрик «В помощь практическому врачу», «Случай из практики» и т.п. Исключались публикации иностранных авторов, а также авторов из ныне независимых стран, ранее входивших в состав СССР (Армения, Беларусь, Грузия, Молдова, Узбекистан).

Все результаты поиска российских публикаций в PubMed подвергались пересмотру (т.н. «мануальный» поиск — несмотря на фильтр “human”, запрашиваемый тип публикации и время публикации, все равно было необходимо исключать статьи, не соответствующие критериям включения (обзоры, статьи на животных, статьи нероссийских авторов), статьи, не являющиеся публикациями КИ в результатах поиска именно КИ и т.п. Исключались также ЖС и отчеты о многоцентровых КИ с российским участием, но не российским финансированием, которым всем без исключения компьютерная система НМБ присваивала российскую аффилиацию.

Результаты поиска в PubMed данных о КИ, Мета и ПР Бразилии, Индии и Южной Африки пересматривались в полном объеме. Данные о ЖС этих стран, а для Китая данные о ЖС, КИ и Мета пересматривались выборочно: анализировалось по 200 публикаций в начале и конце выборки (итого 400), рассчитывалась доля статей, подлежащих исключению, и в соответствии с ней корректировалось общее число публикаций соответствующей категории.

Статистическая обработка данных

Для подтверждения корректности размера использованной выборки использовалась программа Statcalc (версия 7.2.0.1, 2016 г.) — программа, входящая в состав свободно распространяемого комплекса программ для эпидемиологов Epi Info. Ее использование обосновано тем, что единицей учета в нашем исследовании являлся один случай среди множества других (например, одно КИ среди множества ЖС), как и в эпидемиологии, где

единицей учета также является один случай (учет заболеваемости, распространенности и т.п.). С помощью данной программы также проводился анализ Хи-квадрат для выявления линейного тренда (расширенный метод Mantel–Haenszel).

Свободно распространяемая программа Winperp версия 11.5, 2015 г. («Программы для эпидемиологов для Windows») [3] использовалась для определения доверительного интервала для пропорций, а также анализа таблиц сопряженности 2 × 2 для оценки абсолютных частот — использовался (по «рекомендации» программы) критерий Хи-квадрат в модификации Upton (Upton’s Chi-square N-1).

Доли публикаций (ЖС, КИ, Мета, ПР) приводятся в виде относительных частот (в %) с 95% доверительным интервалом. Отношения долей также приводятся с 95% доверительным интервалом.

Уровень альфа-ошибки более 0,05 принимался как пороговый для сохранения нулевой гипотезы.

Результаты

Распределение российских ЖС, КИ, Мета и ПР по журналам

В российских журналах, не приобретаемых НМБ, было опубликовано 1935 ЖС. Они распределились следующим образом: «Медицинская иммунология» 23%, «Иммунология» 19%, «Российский иммунологический журнал» 16%, «Иммунология, аллергология, инфектология» 16%, «Российский аллергологический журнал» 7%, «Аллергология и иммунология» 7%, «Инфекция и иммунитет» 5%, прочие журналы 7%.

В базе PubMed из публикаций российских авторов, соответствующих критериям включения, было 692 ЖС, 19 КИ и 2 Мета. 218 публикаций находились в российских журналах, больше половины из них приходилось на журналы «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, БЭБиМ» (38%) и «Биохимия» (19%), остальные публикации распределились по журналам «Ангиология и сосудистая хирургия» (0,5%), «Биомедицинская химия» (2%), «Биоорганическая химия» (0,5%), «Доклады академии наук (Biological Sciences и Biochemistry and Biophysics — 12%)», «Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова» (1%), «Молекулярная биология» (1%), «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» (1%), «Терапевтический архив» (2%).

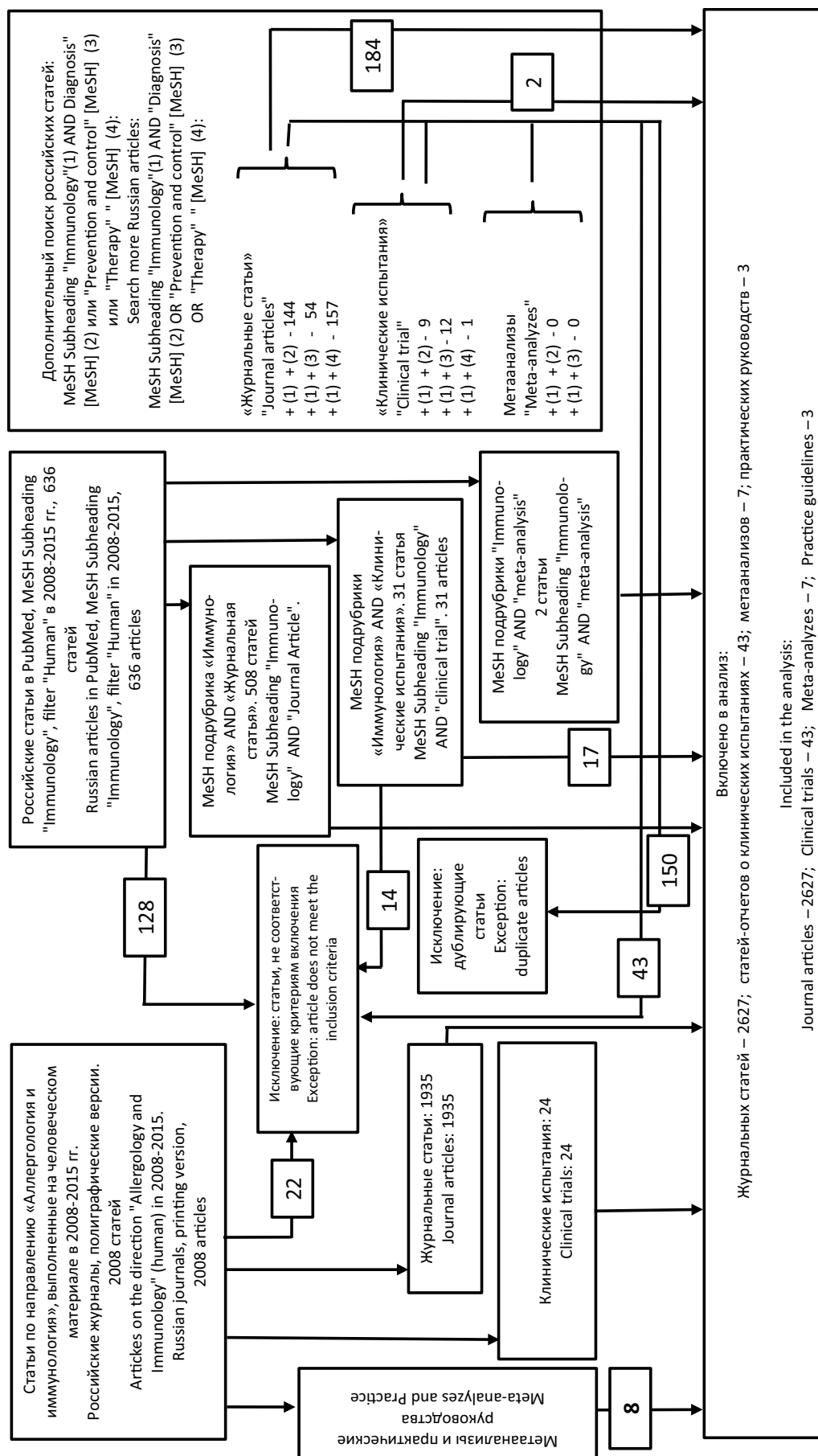


Рисунок 1. Схема формирования информационной базы для выявления структуры российских публикаций (число журнальных статей, статей с описаниями результатов клинических испытаний и результатов метаанализа) в клинической иммунологии и аллергологии за 2008-2015 гг.

Figure 1. Flow chart showing how the Russian papers in clinical immunology and allergology for 2008-2015 entered the study. Number of journal articles, clinical trials and meta-analyses

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО ЖУРНАЛЬНЫХ СТАТЕЙ, СТАТЕЙ О КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЯХ, МЕТААНАЛИЗАХ И ПРАКТИЧЕСКИХ РУКОВОДСТВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ И АЛЛЕРГОЛОГИИ В СТРАНАХ БРИКС ЗА 2008-2015 гг.

TABLE 1. NUMBERS OF JOURNAL ARTICLES, CLINICAL TRIALS, META-ANALYZES, PRACTICE GUIDELINES IN CLINICAL IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY IN THE COUNTRIES BRICS FOR 2008-2015

Страна Country	Количество статей Number of articles			
	Журнальные статьи Journal articles	Клинические испытания Clinical trials	Метаанализы Meta-analyzes	Практические руководства Practical guidelines
Российская Федерация Russian Federation	2627	43	7	3
Республика Индия Republic of India	2064	156	12	70
Республика Южная Африка Republic of South Africa	1041	140	45	38
Федеративная Республика Бразилия Federative Republic of Brazil	3912	163	34	29
Китайская Народная Республика People's Republic of China	17117	582	424	72

Примечание. По России приведены данные по российским журналам и скорректированным данным PubMed, по Индии, Бразилии, Китаю и Южной Африке – скорректированные данные PubMed.

Note. For Russia the data on Russian journals and corrected PubMed data; for India, Brazil, China and South Africa corrected PubMed data.

474 ЖС российские авторы опубликовали в международных журналах.

Схема исследования по формированию российской части информационной базы приведена на рисунке 1.

Оценка объема выборки российских и иностранных журналов

Оценка репрезентативности использованной выборки статей из российских журналов проводилась в процессе набора первичного материала и была завершена на уровне 2627 ЖС. Априорные оценки до начала исследования в данном случае неприменимы, поскольку неизвестны «популяционные» частоты изучаемых признаков. Оценка объема выборки с помощью подпрограммы Population survey, калькулятора Statcalc, показала, что, принимая размер популяции округленно за 3000 (число ЖС на человеческом материале), наименьшую наблюдаемую частоту явления

в 0,26% (относительная частота Мета) и нижнюю границу ее доверительного интервала за 0,1% (как наименее приемлемый результат), мы смогли бы подтвердить величину относительной частоты Мета с ошибкой в 5%, если бы использовали выборку статей на человеческом материале в выбранных журналах размером в 2306 статей, а с ошибкой в 0,1% при выборке в 2555 статей.

Аналогичные оценки для других стран БРИКС показали, что для достижения уровня доверительной вероятности в 99% было бы достаточно использовать 1651 ЖС Индии, 1369 ЖС Бразилии, 238 ЖС ЮАР и 345 ЖС КНР.

Оценка необходимости расширенного поиска в PubMed с включением в запрос подrubрик “diagnosis”, “prevention and control”, “therapy”.

В итоге, по результатам поиска в российских журналах и базе PubMed, было выявлено 43 публикации о проведенных КИ, чья относительная

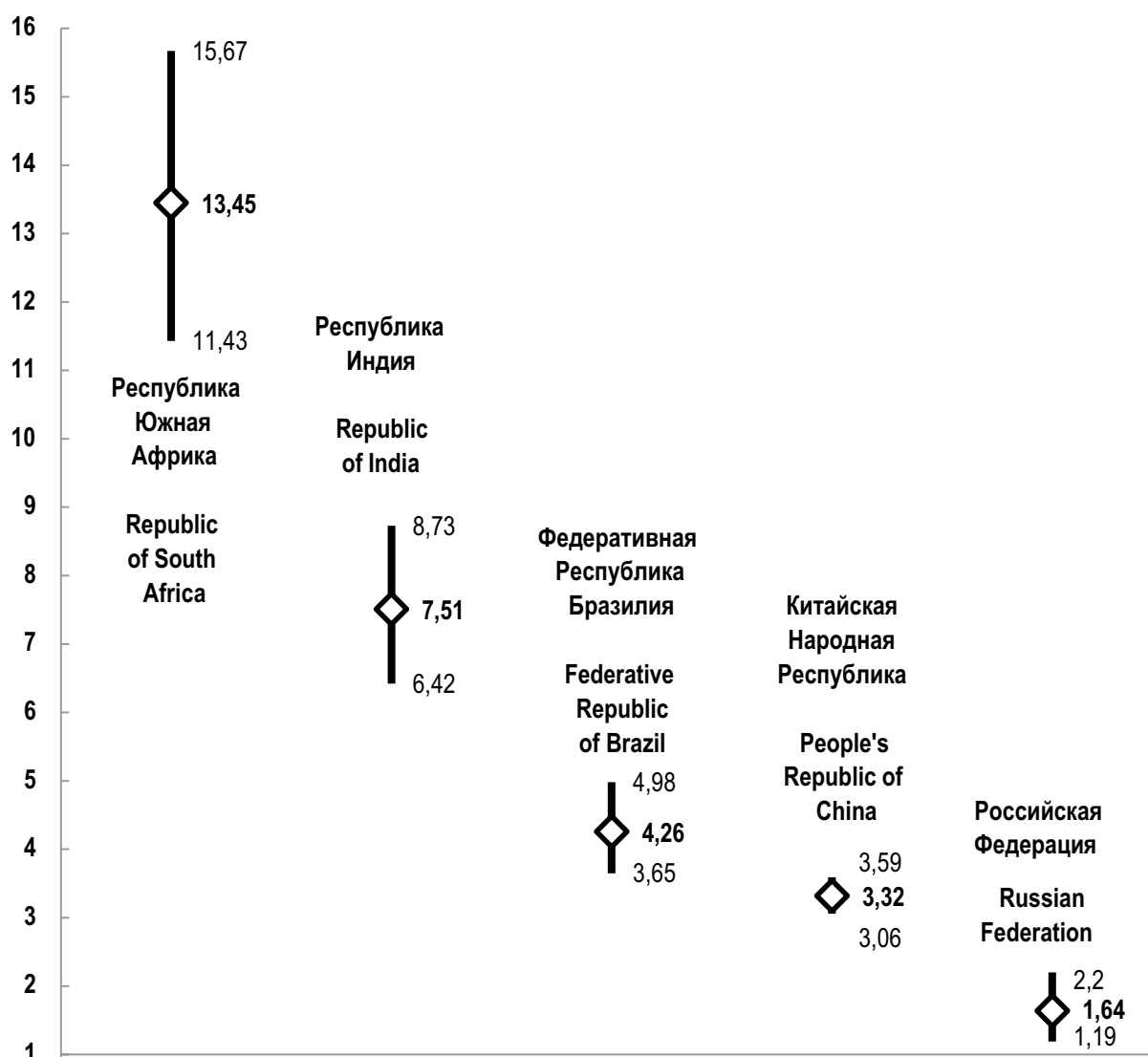


Рисунок 2. Относительные частоты клинических испытаний в странах БРИКС за 2008-2015 гг.

Примечание. Приведены относительные частоты с 95% доверительным интервалом. По вертикальной оси – проценты.

Figure 2. Relative frequencies of clinical trials in the countries BRICS for 2008-2015

Note. Relative frequencies with 95% confidence interval. The vertical axis is the percent.

частота составила 1,64% (1,19-2,2). Если не использовать результаты расширенного поиска, тогда была бы выявлена 41 публикация о КИ, но при этом окончательные различия в абсолютных частотах статистически незначимы ($\chi^2_{\text{U}} = 0,01$, $p = 0,92$) и сама величина относительной частоты изменяется незначительно – 1,67% (1,2-2,3). В силу этого такое расширение поиска, увеличивающее трудоемкость, но не повышающее его результативность, мы посчитали нецелесообразным для анализа показателей других стран БРИКС.

Количество ЖС, КИ, МетА и ПР по клинической иммунологии и аллергологии в странах БРИКС за 2008-015 гг. приведено в таблице 1.

Сравнение абсолютных значений, представленных в таблице 1, может выявить статистически значимые различия в частоте отдельных типов публикаций, но не даст числовой меры, которая бы позволяла непосредственно сравнивать между собой показатели разных стран. Таким показателем является относительная частота изучаемого явления. Относительные частоты КИ в России и других странах БРИКС показаны на рисунке 2.

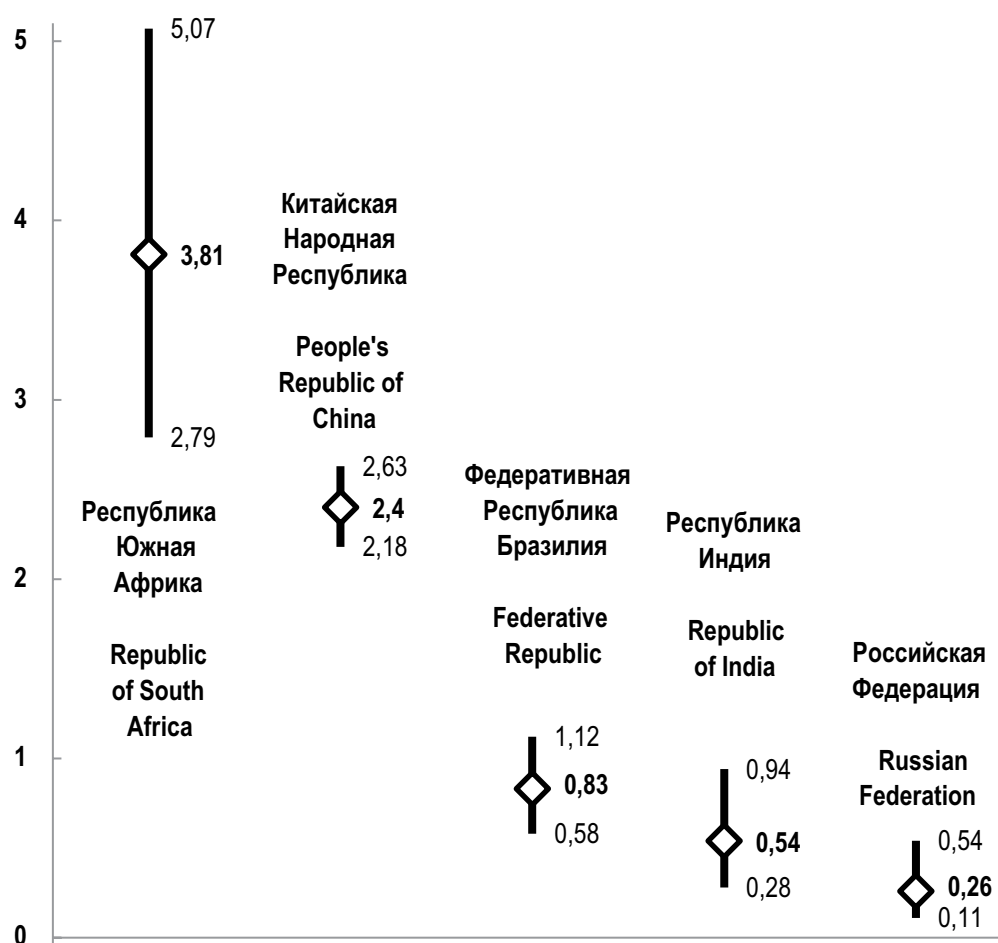


Рисунок 3. Относительные частоты метаанализов в странах БРИКС за 2008-2015 гг.

Примечание. Приведены относительные частоты с 95 % доверительным интервалом. По вертикальной оси – проценты.

Figure 3. Relative frequencies of meta-analyses in the countries BRICS for 2008-2015

Note. Relative frequencies with 95% confidence interval. On a vertical axis – percent.

За период 2008-2015 гг. в РФ КИ проводились реже, чем в Китае, в 1,99 (1,47-2,72) раза ($\chi^2_U = 20,62$, $p = 5,6 \times E^{-6}$); реже, чем в Бразилии, в 2,47 (1,77-3,44) раза ($\chi^2_U = 8,64$, $p = 0,003$); реже, чем в Индии, в 4,35 (3,12-6,07) раза ($\chi^2_U = 90,66$, $p = 1,7 \times E^{-21}$) и реже, чем в Южной Африке, в 7,11 (5,09-9,94) раза. В последнем случае точное значение Хи-квадрат и значение альфа-ошибки могут быть рассчитаны только по методу Вальда: $\chi^2 = 134,71$, $p = 3,8 \times E^{-31}$.

Относительные частоты опубликованных в 2008-2015 гг. Мета в странах БРИКС показаны на рисунке 3.

Относительная частота Мета в РФ статистически значимо не отличалась от таковой в Индии ($\chi^2_U = 2,407$, $p = 0,121$); была меньше, чем в Бразилии, в 3,18 (1,39-8,52) раза ($\chi^2_U = 6,645$,

$p = 0,003$); меньше, чем в Китае, в 8,95 (4,24-18,86) раза ($\chi^2_U = 49,63$, $p = 1,9 \times E^{-12}$) и меньше, чем в Южной Африке, в 2,32 (1,53-3,50) раза ($\chi^2_U = 16,81$, $p = 4 \times E^{-5}$).

В таблице 2 приведены скорректированные данные о числе КИ, Мета и ПР по всем исследованным странам. Произведен расчет числа публикаций этих типов на 1000 ЖС. Такой подход принят в оценке эпидемиологических и демографических показателей, когда, например, заболеваемость чем-либо выражается в абсолютных цифрах на определенную долю населения. Авторы полагают, что такая форма представления данных является информативной и привычной для читателей-медиков. Данные о КИ, Мета и ПР округлены до целых, поскольку, например, 8,5 КИ быть не может.

ТАБЛИЦА 2. ДОЛЯ ПУБЛИКАЦИЙ (НА 1000 ЖУРНАЛЬНЫХ СТАТЕЙ) О КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЯХ, МЕТААНАЛИЗАХ И ПРАКТИЧЕСКИХ РУКОВОДСТВАХ В КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ И АЛЛЕРГОЛОГИИ В СТРАНАХ БРИКС ЗА 2008-2015 гг.

TABLE 2. ADJUSTED NUMBER OF PUBLICATIONS (ON 1000 JOURNAL ARTICLES) ABOUT CLINICAL TRIALS, META-ANALYZES, PRACTICE GUIDELINES IN CLINICAL IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY IN THE BRICS COUNTRIES FOR 2008-2015

Страна Country	Доля публикаций Adjusted number of publications		
	Клинические испытания Clinical trials	Метаанализы Meta-analyzes	Практические руководства Practice guidelines
Российская Федерация Russian Federation	16	3	1
Китайская Народная Республика People's Republic of China	34	25	4
Федеративная Республика Бразилия Federative Republic of Brazil	42	87	7
Республика Индия Republic of India	76	58	34
Республика Южная Африка Republic of South Africa	134	43	36

Для выяснения наличия временной динамики и ее характера в массиве статей о КИ в России и других странах БРИКС использовался метод Хи-квадрат для тенденции. Результаты представлены на рисунке 4.

Динамика накопления публикаций о клинических испытаниях в России статистически значимо зависит от времени ($\chi^2 = 12,49$, $p = 0,0004$). За счет публикаций, вышедших в 2013-2015 гг., формируется восходящая часть тренда.

В Южной Африке тренд за весь период исследования восходящий ($\chi^2 = 14,95$, $p = 0,00011$). Индия и Бразилия между собой показывают очень сходную динамику, после 2011 г. тренд устойчиво восходящий (соответственно, $\chi^2 = 9,62$, $p = 0,0019$ и $\chi^2 = 10,24$, $p = 0,0014$). В Китае временная зависимость также статистически значима ($\chi^2 = 6,78$, $p = 0,0092$), но тренд падающий на протяжении всего периода исследования.

Относительная частота опубликованных ПР в России составила 0,11% (0,02-0,38), в Китае

0,42% (0,31-0,5), в Бразилии 0,71% (0,47-1,01), Индии 3,14 % (2,45-3,95), ЮАР 3,1% (2,2-4,23). Относительная частота ПР в России меньше, чем в Китае, в 3,53 (1,11-11,21) раза, меньше, чем в Бразилии, в 6,26 (1,91-20,53) раза, меньше, чем в Индии, в 27,16 (8,57-86,11) раза и меньше, чем в ЮАР, в 26,86 (8,31-86,84) раза.

Обсуждение

Размер использованной нами выборки российских журнальных статей мы считаем репрезентативным, поскольку для выявления редко встречающегося типа публикаций (Мета, реже их встречались только ПР) с доверительной вероятностью в 99% можно было бы сократить использованную выборку на 3%, а для оценки с доверительной вероятностью в 95% — на 13%.

Данные расширенного поиска в PubMed с включением в запрос под рубрик “diagnosis”, “prevention and control”, “therapy” в исходный массив российских публикаций были включены,

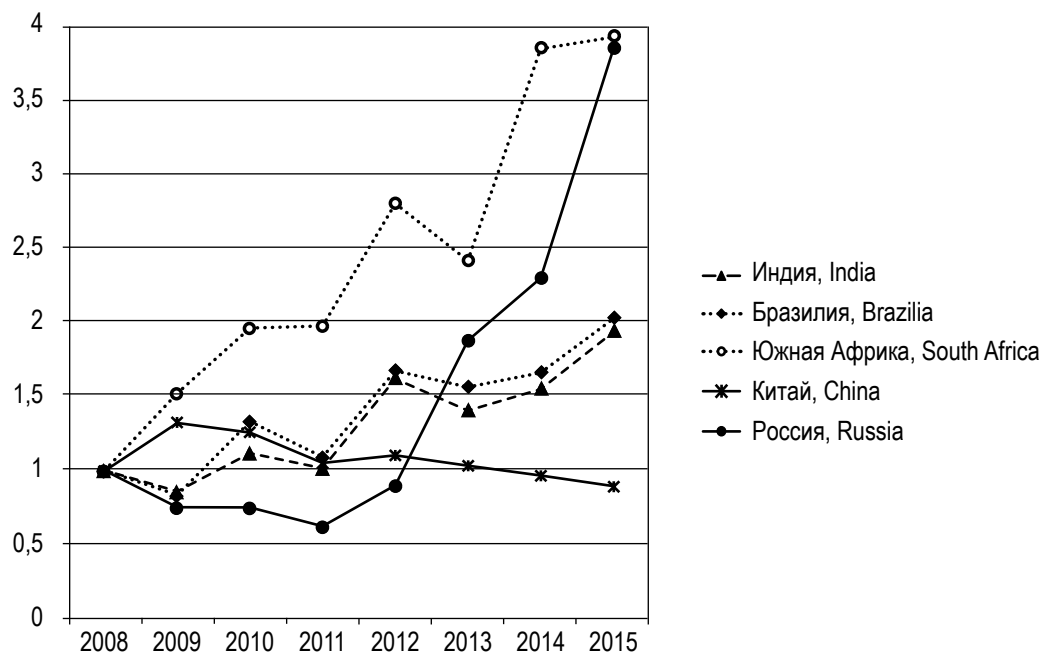


Рисунок 4. Временная динамика роста частот публикаций о клинических испытаниях за период 2008-2015 гг. в странах БРИКС

Примечание. По вертикальной оси – значения отношения шансов.

Figure 4. Temporal dynamics of increase in frequency of publications about clinical trials or the period 2008-2015 in the countries BRICS

Note. On a vertical axis – values of the odds ratio.

хотя достоверность результатов они не увеличили. Тем не менее без поиска основного массива российских публикаций в базе PubMed обойтись было нельзя, поскольку без его результатов величина относительной частоты КИ была бы в 1,3 раза меньше, а если ограничиться только этой базой, то относительная частота КИ была бы в 2 раза больше.

Стоит отметить, что среди российских публикаций о КИ в международных изданиях в пяти сообщалось об их регистрации в регистре Национальных институтов здоровья (ClinicalTrials.gov).

Таким образом, результаты, полученные в результате обработки первичных данных, не являются смещенными из-за их недостаточного объема или систематических ошибок при отборе первичных данных.

Проведение КИ, их обобщение в виде Мета и создание ПР – это отражение принятия медициной научной (доказательной) методологии. В последние годы российская клиническая иммунология в этом отношении не вышла на уровень стран, своих партнеров по БРИКС.

В основном проведенное нами исследование является одномоментным анализом за определенный период времени. Тем не менее динамический компонент в виде анализа линейного тренда выхода в свет публикаций о КИ (рис. 4) показывает: по сравнению с 2008 г. в 2013-2015 гг. в России доля публикаций о КИ выросла в 3,8 раза и по скорости роста сравнялась с таковой в ЮАР, статистически значимо превысив значения Индии, Бразилии и Китая.

Критерий Хи-квадрат для линейного тренда для исходной точки в ряду динамики принимает отношение шансов (ОШ) за единицу. В нашем случае это значит, что в 2008 г. в каждой из анализируемых стран вероятность выхода в свет публикаций о КИ была равна вероятности того, что эти публикации в свет не вышли. Значение ОШ в 3,8 показывает, что в 2015 г. в России вероятность выхода в свет новых КИ, чем вероятность их невыхода, была в 3,8 раза выше по сравнению с 2008 г.

ОШ используется для оценки событий, которые уже произошли. Личный опыт авторов настоящей статьи показывает, что в мировой ли-

температуре значения ОШ трактуются, может быть, и упрощенно, но более понятно: во сколько раз какое-то событие было чаще (или реже) по сравнению с некоторой точкой отсчета или группой сравнения. Использование ОШ для анализа линейного тренда позволяет определить его направление. Критерий Хи-квадрат для линейного тренда сообщает, что, например, в КНР есть статистически значимая линейная тенденция за период 2008–2015 гг. в выходе в свет публикаций о КИ, но направления тренда Хи-квадрат не показывает. Значения ОШ по годам позволяют определить направление движения показателей. В КНР ОШ для КИ в 2009 г. составил 1,33, а затем постепенно снижался почти до единицы к 2013 г. и затем продолжил падение до 0,89 в 2015 г. Иными словами, в КНР в 2015 г. отчеты о КИ публиковались реже, чем в 2008 г., на 11% (рис. 4).

Используя профессиональную терминологию фондового рынка, можно сказать, что в 2011 г. частота выхода в свет КИ в России достигла «дна», от которого она «оттолкнулась» и стремительно

пошла на повышение. В настоящее время не видится причин, которые могли бы изменить направление наблюдаемого тренда.

На сайте Института иммунологии ФМБА России (<http://nrcii.ru/>) размещены 14 проектов Федеральных клинических рекомендаций по направлению «Клиническая иммунология и аллергология» (<http://nrcii.ru/specialistam/klinrecommend/>). Если бы эти ПР были все опубликованы в период 2008–2015 гг., то тогда относительная частота ПР в российской клинической иммунологии увеличилась бы в 5,7 раз и статистически значимо не отличалась бы от таковой в Бразилии и Китае.

Таким образом, перспективы развития научной клинической иммунологии в России выглядят достаточно оптимистично.

Благодарности

Авторы приносят искреннюю благодарность за действенную помощь заведующей библиотекой НИИФКИ И.А. Гусенко.

Список литературы / References

1. Ларионова М.В., Рахмангулов М.Р., Шелепов А.В., Сахаров А.Г. Формирование повестки дня для БРИКС в сфере здравоохранения // Вестник международных организаций, 2014. Т. 9, № 4. С. 102–125. [Larionova M.V., Rakhmangulov M.R., Shelepov A.V., Sakharov A.G. BRICS: Emergence of health agenda. *Vestnik mezhdunarodnykh organizatsiy = International Organisations Research Journal*, 2014, Vol. 9, no. 4, pp. 102–125. (In Russ.)]
2. Ширинский В.С., Старостина Н.М., Сенникова Ю.А., Ширинский И.В., Соловьева Н.Ю., Малышева О.А., Круглеева О.Л., Непомнящих В.М. Проблемы иммуностимулирующей терапии с позиций доказательной медицины // Медицинская иммунология, 2000. Т. 2, № 1. С. 17–24. [Shirinsky V.S., Starostina N.M., Sennikova Yu.A., Shirinsky I.V., Solovyova N.Yu., Malysheva O.A., Krugleyeva O.L., Nepomnyashchikh V.M. Immunostimulating drugs abilities from viewpoint of evidence based medicine. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, Vol. 2, no. 1, pp. 17–24. (In Russ.)]
3. Abramson J.H. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol. Perspect. Innov.*, 2011, Vol. 8, no. 1, p. 1.
4. Chan A.W., Tetzlaff J.M., Altman D.G., Laupacis A., Gøtzsche P.C., Krleža-Jerić K., Hróbjartsson A., Mann H., Dickersin K., Berlin J.A., Doré C.J., Parulekar W.R., Summerskill W.S.M., Groves T., Schulz K.F., Sox H.C., Rockhold F.W., Rennie D., Moher D. SPIRIT 2013 Statement: Defining Standard Protocol Items for Clinical Trials. *Ann Intern. Med.*, 2013, Vol. 158, no. 3, pp. 200–207.
5. Krleža-Jerić K., Chan A.W., Dickersin K., Sim I., Grimshaw J., Gluud C. Principles for international registration of protocol information and results from human trials of health related interventions: Ottawa statement (part 1). *BMJ*, 2005, Vol. 330, no. 7497, pp. 956–958.

6. Krleža-Jerić K., Gabelica M., Banzi R., Krnić-Martinić M., Pulido B., Mahmić-Kaknjo M., Reveiz L., Šimić J., Utrobičić A., Hrgović I. IMPACT Observatory: tracking the evolution of clinical trial data sharing and research integrity. *Biochemia Medica*, 2016, Vol. 26, no. 3, pp. 308-317.

7. Sully B.G., Julious S.A., Nicholl J. A reinvestigation of recruitment to randomised, controlled, multicenter trials: a review of trials funded by two UK funding agencies. *Trials*, 2013, Vol. 14, p. 166.

Авторы:

Лугачева Л.И. — к.э.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела анализа и прогнозирования развития отраслевых систем ФГБУН «Институт организации экономики и промышленного производства» СО РАН; доцент кафедры экономического управления ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Мусатов М.И. — д.м.н., профессор кафедры фундаментальной медицины ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет»; научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Lugacheva L.I., PhD (Economy), Associate Professor, Leading Research Associate, Department of Analysis and Forecasting in Sectoral Systems, Institute of Economics and Industrial Engineering, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Economic Management, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Musatov M.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Faculty of Fundamental Medicine, Novosibirsk State University; Research Associate, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 16.01.2017
Отправлена на доработку 26.01.2017
Принята к печати 18.07.2017

Received 16.01.2017
Revision received 26.01.2017
Accepted 18.07.2017

ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

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

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

Резюме. Иммунная система играет ключевую роль в патогенезе ишемического инсульта. Ишемическое поражение головного мозга приводит к разрушению клеток и белков внеклеточного матрикса и высвобождению молекул «опасности», которые вызывают быструю активацию врожденного иммунитета и индуцируют реакции адаптивного иммунитета с аутоиммунной направленностью. Клетки врожденного иммунитета ответственны за элиминацию клеточного и внеклеточного детрита и тканевую репарацию, однако также вовлечены в запуск постишемического воспаления, вызывающего повреждение мозговой ткани. Развивающиеся через несколько дней реакции адаптивного иммунитета, направленные против собственных антигенов, не имеют отношения к повреждению нервной ткани в остром периоде. Клетки адаптивного иммунитета способны регулировать активность микроглии и стимулировать процессы восстановления в центральной нервной системе. Тем не менее длительная персистенция сенсibilизированных к мозгоспецифическим антигенам лимфоцитов может быть причастна к атрофии коры головного мозга и развитию деменции в отдаленном периоде инсульта. Иммунный ответ на ишемическое поражение мозга имеет как локальные, так и системные проявления. При этом, в отличие от продолжительного интрацеребрального воспаления в зоне инфаркта и окружающих тканях, системный воспалительный ответ на периферии быстро сменяется развитием иммуносупрессии, что подтверждается лимфопенией, атрофией лимфоидных органов и дефектом функциональной активности иммунных клеток. Иммуносупрессия во многом обусловлена активацией симпатoadrenalовых системы и направлена на ограничение воспаления и аутоиммунных реакций. Тем не менее, избыточные проявления иммуносупрессии приводят к развитию инфекционных осложнений, часто являющихся причиной летального исхода, а также могут негативно сказываться на эффективности репаративных процессов. В настоящем обзоре представлены экспериментальные и клинические данные, характеризующие реакции врожденного и приобретенного иммунитета в ответ на церебральную ишемию. Кроме того, в обзоре обсуждается патогенетическая значимость иммунных клеток и опосредованных ими позитивных и негативных эффектов, осмысление которых позволит разработать новые подходы к лечению ишемического инсульта.

Ключевые слова: ишемический инсульт, врожденный иммунитет, адаптивный иммунитет, аутоиммунитет, нейровоспаление, нейропротекция, системный иммунный ответ, локальный иммунный ответ, инсульт-индуцированный иммунодефицит

IMMUNOPATHOGENETIC ASPECTS OF ISCHEMIC STROKE

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

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

Abstract. Immune system plays a key role in pathogenesis of ischemic stroke. Ischemic brain injury causes destruction of cells and extracellular matrix proteins, and the release of „danger“ molecules that cause rapid

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Е.Р. Черных, Е.Я. Шевела, С.А. Морозов, А.А. Останин
«Иммунопатогенетические аспекты ишемического
инсульта» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1.
С. 19-34.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-19-34
© Черных Е.Р. и соавт., 2018

For citation:

E.R. Chernykh, E.Ya. Shevela, S.A. Morozov, A.A. Ostanin
“Immunopathogenetic aspects of ischemic stroke”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,
Vol. 20, no. 1, pp. 19-34.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-19-34
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-19-34

activation of innate immunity, and induce adaptive autoimmune reactions. The cells of innate immunity are responsible for elimination of cellular and extracellular debris and tissue repair, being, however, involved in post-ischemic inflammation causing brain injury. An adaptive immune response which develops within a few days is directed against self-antigens, being not related to nervous tissue damage in acute phase of stroke. The cells of adaptive immunity are able to regulate microglial activity and promote repair processes in the central nervous system. However, long-term persistence of lymphocytes with reactivity for brain-derived antigens may be involved into the atrophy of cerebral cortex, and development of dementia in remote post-stroke period. Immune response following ischemic brain stroke is manifesting by local and systemic reactions. Nevertheless, in contrast to prolonged local intracerebral inflammation in infarction area, and peri-infarction region, a systemic inflammatory response is quickly replaced by development of immunosuppression, as evidenced by lymphopenia, lymphoid organ atrophy and defective functions of immune cells. Immunosuppression is largely due to activation of sympathoadrenal system, aiming for limitation of inflammatory and autoimmune reactions. However, excessive immunosuppression leads to development of infectious complications, which may often cause lethal outcomes, and also may have a negative impact on efficiency of repair processes. The present review provides experimental and clinical data describing the innate and adaptive immune reactions in response to cerebral ischemia. Moreover, this review discusses possible pathogenetic importance of immune cells and their positive or negative effects, thus allowing further development of new therapeutic approaches for treatment of ischemic stroke.

Keywords: ischemic stroke, innate immunity, adaptive immunity, autoimmunity, neuroinflammation, neuroprotection, systemic immune response, local immune response, stroke-induced immunodeficiency

Введение

Ишемический инсульт остается глобальной медико-социальной проблемой, будучи одной из ведущих причин летальности и инвалидизации взрослого населения в экономически развитых странах [102]. Тромболизис с использованием тканевого активатора плазминогена признается единственным методом лечения с доказанной эффективностью, однако в силу узкого терапевтического окна менее 5% пациентов получают такое лечение [33].

Иммунная система играет ключевую роль в патогенезе ишемического инсульта. Недавние исследования показали, что клетки иммунной системы вовлечены во все стадии ишемического каскада, начиная от острых внутрисосудистых нарушений кровоснабжения до процессов повреждения паренхимы мозга и последующих этапов репарации. Высвобождение из поврежденной вследствие ишемии нервной ткани «молекул опасности» вызывает быструю (начиная с первых минут) активацию врожденного иммунитета с последующим запуском реакций адаптивного иммунитета. Клетки врожденного иммунитета ответственны за элиминацию погибших клеток и тканевую репарацию. Однако, продуцируя провоспалительные медиаторы и обеспечивая рекрутирование циркулирующих лейкоцитов, они также вовлечены в запуск и поддержание пост-ишемического воспаления, вызывающего вторичные повреждения [134].

Воспаление, являясь ключевым звеном патогенеза цереброваскулярной патологии, ассоциировано с тяжестью инсульта и детерминирует

развитие вторичных повреждений [79]. Активация клеток врожденного иммунитета необходима для запуска репаративных процессов [71]. Тем не менее избыточная выраженность или персистенция воспалительной реакции оказывает негативный эффект на восстановление поврежденной нервной ткани [47].

Реакции адаптивного иммунитета, развертывающиеся через несколько дней после инсульта и направленные против собственных антигенов, имеют отношение к повреждению нервной ткани в остром периоде и, более того, способны стимулировать процессы репарации и регенерации в центральной нервной системе [109]. Однако сенсибилизированные к мозгоспецифическим антигенам лимфоциты могут быть причастны к атрофии коры головного мозга и развитию деменции в отдаленном периоде инсульта [65].

Иммунный ответ проявляется как на локальном, так и системном уровне, но, в отличие от продолжительного интрацеребрального воспаления в зоне инфаркта и окружающих тканях (зона пенумбры), системный воспалительный ответ на периферии быстро сменяется развитием иммуносупрессии, проявляющейся лимфопенией и дефектом функциональной активности иммунных клеток [76]. Это обусловлено тем, что ишемическое повреждение мозга через активацию симпатoadреналовой системы оказывает выраженное ингибирующее действие на лимфоидные органы и иммунные клетки. Данная реакция, направленная на ограничение воспаления и ауто-иммунных реакций, носит адаптивный характер, однако при избыточной выраженности приводит к развитию инфекционных осложнений, явля-

ющихся причиной летального исхода, а также может негативно сказываться на эффективности репаративных процессов [122].

Таким образом, иммунная система тесно взаимосвязана с критическими событиями, определяющими тяжесть инсульта и эффективностью неврологического восстановления, и модуляция иммунного ответа открывает новые возможности в лечении церебральной ишемии.

Инициация иммунного ответа

Нейровоспалительная реакция в раннем периоде инсульта является проявлением иммунного ответа на повреждения мозговой ткани, вызванные локальной ишемией мозга. Этот процесс характеризуется рядом последовательных событий, вовлекающих головной мозг, церебральные сосуды, циркулирующую кровь и лимфоидные органы. Причиной воспаления является ишемическое поражение мозговой ткани. Исследования последних лет четко продемонстрировали, что иммунная система может активироваться не только в ответ на патогенные стимулы, но и эндогенные медиаторы, образующиеся при разрушении клеток и внеклеточного матрикса. Гибнущие в условиях церебральной ишемии нейроны и другие клетки высвобождают сигналы «опасности», которые получили название «ассоциированных с опасностью молекулярных паттернов» (DAMPs), или аларминов. Сигналы опасности включают различные белки (HMGB1 — high mobility group box 1; белки теплового шока, S100B), аденозинтрифосфат (АТФ), ДНК, РНК, сульфат гепарина, окисленные липопротеиды низкой плотности, β -амилоид, гиалуронан и некоторые другие молекулы. Эти алармины взаимодействуют с теми же рецепторами на иммунных клетках, которые распознают структуры патогенов, и активируют клетки врожденного иммунитета к продукции провоспалительных медиаторов (цитокинов, хемокинов, нитрооксида, свободных радикалов кислорода), запуская воспалительный каскад [17]. При взаимодействии с антигенпрезентирующими клетками «молекулы опасности» стимулируют продукцию хемокинов, вызывающих хемотаксис лейкоцитов, что обеспечивает связь между врожденным и приобретенным иммунитетом [89]. При этом нарушение гематоэнцефалического барьера под действием медиаторов воспаления способствует транслокации циркулирующих иммунных клеток в мозговую ткань [73].

Среди различных аларминов наиболее хорошо при ишемии охарактеризован ядерный белок HMGB1, уровень которого значительно повышается в сыворотке крови пациентов с ишемическим инсультом [107] и является предиктором 12-месячного исхода [49]. HMGB1 взаимодействует

с Toll-подобными рецепторами (TLR2 и TLR4) и RAGE-рецепторами (Receptors Advanced Glycation End products) и в остром периоде индуцирует воспалительный ответ [95]. В то же время в более отдаленном периоде HMGB1 может способствовать репарации за счет усиления нейропластичности и стимуляции нейрогенеза [43]. Разнонаправленные эффекты HMGB1 отчасти объясняются вовлечением различных сигнальных путей при взаимодействии с TLR2 и TLR4. Так, мыши с нокаутом гена TLR4 при моделировании церебральной ишемии имеют меньшие размеры инфаркта, тогда как нокаут по TLR2 приводит к большему размеру инфаркта, более высокой летальности и худшему неврологическому восстановлению. Эти данные указывают на вовлечение TLR4-сигнального пути в развитие ишемически-индуцированных поражений головного мозга и нейропротективную роль TLR2 при церебральной ишемии [48].

Другим важным алармином, активирующим врожденный иммунный ответ через взаимодействие с TLR2 и TLR4, является компонент внеклеточного матрикса — гиалуроновая кислота (гиалуронан), концентрация которой также возрастает в остром периоде [2]. Стимуляция иммунных клеток АТФ осуществляется через пуриnergгические рецепторы с вовлечением инфламмасом [38].

Врожденный иммунный ответ

Иммунный ответ на ишемическое поражение головного мозга, индуцированный клетками врожденного иммунитета, манифестирует признаками активации клеток микроглии, усилением продукции провоспалительных цитокинов/хемокинов и рекрутированием лейкоцитов в зону ишемии [54].

Активация клеток микроглии

В физиологических условиях клетки врожденного иммунитета в паренхиме мозга представлены микроглией. Клетки микроглии находятся в покоем состоянии за счет взаимодействия CD200 рецептора с его лигандом на нейронах и поддерживают нейрогенез, функционирование синапсов и нейронов [84]. Нарушение взаимодействия нейронов и микроглии при церебральной ишемии и продукция провоспалительных медиаторов способствуют активации микроглии. Активированная микроглия может приобретать M1 провоспалительный фенотип и вовлекаться в воспалительный каскад, либо M2 противовоспалительный/репаративный фенотип и участвовать в подавлении воспаления и восстановлении поврежденных тканей. Клетки с M2-фенотипом получили название «заживляющих клеток». Их участие в репарации повреждений мозговой ткани опосредуется продукцией противовоспалитель-

ных медиаторов — интерлейкина-10, (IL-10), трансформирующего фактора роста β (TGF- β), IL-4, IL-13, а также инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) и различных нейротрофических факторов [119]. При очаговой церебральной ишемии микроглия в раннем периоде экспрессирует M2-фенотип, однако впоследствии подвергнутые ишемии нейроны проградIENTно индуцируют поляризацию микроглии в M1-клетки, усиливающие гибель нейронов [46]. При этом пролонгированное подавление активности M1-микроглии, начиная с подострого периода с помощью селективного ингибитора (миноциклина), усиливает нейрогенез и улучшает неврологическое восстановление при экспериментальном инсульте [70].

Продукция провоспалительных медиаторов

Исследования в модели ишемического инсульта показали усиление экспрессии воспалительных цитокинов и хемокинов — IL-6, фактора некроза опухоли- α (TNF α), IL-1, моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) в мозговой ткани и на периферии [63, 114]. Признаки системного воспаления в виде возрастания в сыворотке крови различных и, в первую очередь, провоспалительных цитокинов и хемокинов в остром периоде инсульта выявлено и у человека. При этом показано, что концентрация IL-6 и TNF α , отражающая выраженность воспалительной реакции, коррелирует с размерами инфаркта, тяжестью инсульта и его исходами [31, 128].

Использование животных с нокаутом или гиперэкспрессией генов определенных цитокинов, а также подходы с применением нейтрализующих антител или рецепторных антагонистов свидетельствуют о неоднозначной роли провоспалительных цитокинов при церебральной ишемии. Например, инактивация IL-1 в моделях инсульта и клинических исследованиях оказывает протективное действие [30, 80]. В то же время IL-6 и TNF α играют двойственную роль. С одной стороны, уровень IL-6 коррелирует с размерами инфаркта и тяжестью инсульта [31]. С другой — делеция гена IL-6 не оказывает протективного действия в модели инсульта [22], что, возможно, связано с участием данного цитокина в регуляции нейрогенеза [8]. Аналогичным образом разнонаправленные эффекты показаны для TNF α . Так, повышенная экспрессия TNF α усиливает выраженность поражений при очаговой церебральной ишемии [92]. В то же время в режиме preconditionирования TNF α оказывает нейропротективный эффект при индуцированной церебральной ишемии [36].

Рекрутирование лейкоцитов

Провоспалительные цитокины, продуцируемые активированными клетками микроглии, усиливают экспрессию лейкоцитарных молекул

адгезии на эндотелиальных клетках и повышают проницаемость гематоэнцефалического барьера, что способствует миграции лейкоцитов (нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов) в зону ишемии. В частности, молекулы адгезии на эндотелиальных клетках обеспечивают контакт циркулирующих лейкоцитов с эндотелием, а также роллинг и трансмиграцию иммунных клеток из циркуляции в паренхиму мозга [72].

Первыми в очаг ишемии попадают нейтрофилы. Гранулоциты выявляются в зоне ишемии уже в первые часы при экспериментальном инсульте и в течение 24 часов с момента инсульта у человека [28]. Роль нейтрофилов в патогенезе церебральной ишемии неоднозначна. Нейтрофилы представляют гетерогенную популяцию, среди которых нейтрофилы первого типа способны оказывать повреждающее действие, тогда как нейтрофилы 2-го типа обладают нейропротективной активностью [23]. Тем не менее подавление рекрутирования нейтрофилов у пациентов с инсультом не показало терапевтического эффекта [112].

Рекрутирование циркулирующих моноцитов в зону инфаркта и пенумбры в модели инсульта происходит через 24 часа после окклюзии артерии, и моноциты детектируются в зоне повреждения в течение 14 дней с пиком на 3-7 сутки [11]. Первоначально считалось, что рекрутируемые моноциты/макрофаги усиливают ишемическое повреждение и способствуют прогрессии вторичных повреждений [26]. Однако в настоящее время стало очевидно, что активация макрофагов и последующий запуск нейровоспалительной реакции могут не только вызывать повреждение нервной ткани, но и индуцировать процессы ее восстановления [46, 133]. Двойственную роль макрофагов связывают с их функциональной гетерогенностью, в частности с эффектами как минимум двух функциональных типов макрофагов — M1- и M2-клеток. M1-макрофаги обладают провоспалительными свойствами, обеспечивают защиту от патогенов, однако являются нейродеструктивными и подавляют процессы репарации. M2-клетки участвуют в элиминации клеточного детрита в очаге ишемии [105], обеспечивают нейропротекцию и стимулируют нейрогенез, рост и миелинизацию аксонов, синаптогенез и ангиогенез [47, 57].

Следует отметить, что активация микроглии достигает пика на 2-3 сутки и персистирует несколько недель [25, 119]. В эти сроки (хроническая фаза ишемического инсульта) включаются восстановительные механизмы, направленные на ограничение воспаления и стимуляцию аксонального ремоделирования нервной ткани, требующие участия M2-микроглии [29]. Одна-

ко при церебральной ишемии репаративный потенциал клеток микроглии нарушается, поскольку они прогрессивно приобретают М1 провоспалительный фенотип [46]. В этой ситуации недостаточность нейропротективной активности микроглии восполняется рекрутированием периферических моноцитов и поляризацией их в М2-клетки [25, 71].

В отличие от клеток микроглии, рекрутируемые с периферии макрофаги более резистентны к повреждающему действию ишемии и активно вовлекаются в процессы элиминации клеточного дебриса на протяжении первых 7 дней после инсульта [100]. Учитывая более высокую фагоцитарную активность рекрутируемых макрофагов по сравнению с клетками микроглии [74], эти клетки могут играть более значимую роль в процессах нейрональной пластичности и ремоделирования при церебральной ишемии.

Протективная роль макрофагов, образующихся из циркулирующих моноцитов и имеющих костномозговое происхождение, подтверждается рядом исследований. Chu Н.Х. и соавт. в модели экспериментального инсульта показали, что провоспалительные моноциты (Ly6C^{high}), инфильтрирующие зону ишемии мозга, дифференцируются в М2-макрофаги и способствуют поляризации окружающих клеток микроглии и макрофагов в сторону противовоспалительного фенотипа [21]. Аналогичные данные получены Gliem M. и соавт., которые продемонстрировали, что провоспалительные моноциты быстро рекрутируются в зону ишемии через CCR2-зависимый путь и дифференцируются в макрофаги, обеспечивающие нейропротекцию и нейроваскулярную репарацию в зоне ишемии [37]. Стимулирующий эффект рекрутируемых макрофагов на неврологическое восстановление в отдаленном периоде инсульта продемонстрирован недавно [129]. Авторы показали, что на 7 сутки после инсульта половина рекрутируемых макрофагов экспрессирует М2-, а половина — М1-фенотип. Однако в последующие две недели начинает доминировать М2-фенотип. Блокирование миграции моноцитов с помощью анти-CCR2 антител ухудшает восстановление поведенческих реакций, что ассоциировано со снижением экспрессии М2-ассоциированных противовоспалительных генов (TGF- β , CD163 и Ym1) в поврежденной ткани мозга. Динамическая смена фенотипа инфильтрирующих моноцитов с про- на противовоспалительный в зоне ишемического поражения головного мозга позволяет предполагать, что провоспалительные моноциты (Ly6C^{high}) играют важную роль в элиминации погибших от некроза клеток и поддержании стабильности мозговых микрососудов, тогда как противовоспалительные

(Ly6C^{low}) макрофаги принимают участие в элиминации апоптотических клеток и последующей реконструкции и ремоделировании поврежденной ткани [58]. Эти результаты находятся в противоречии с данными об уменьшении объема инфаркта у животных с дефицитом MCP-1 (хемоаттрактант моноцитов) и увеличении объема поражения у животных с гиперэкспрессией MCP-1 [19, 106], что может, впрочем, объясняться влиянием MCP-1 на миграцию и функциональную активность и других клеточных популяций [106].

Рекрутирование моноцитов в зону повреждения сопряжено с изменением их количества на периферии. Так, в модели инсульта у мышей показано, что возрастание провоспалительных Ly6C^{high} моноцитов в остром периоде (через 3 часа после окклюзии) быстро сменяется снижением их количества в подострую и хроническую фазы (1-7 сутки), а снижение противовоспалительных Ly6C^{low} моноцитов регистрируется во всех периодах — острой, подострой и хронической фазах инсульта [58]. Наряду с периферической кровью существенным резервуаром моноцитов является селезенка. Количество про- и противовоспалительных моноцитов в остром периоде инсульта в селезенке значимо снижается, что ассоциировано с возрастанием моноцитов в мозговой паренхиме [58]. Причем спленэктомия, предшествующая окклюзии мозговой артерии, снижает количество инфильтрирующих моноцитов в мозговой ткани, не сказываясь на размерах ишемического поражения [1].

У человека циркулирующие моноциты включают субпопуляции классических (CD14⁺CD16⁻) и неклассических (CD14⁺CD16⁺) моноцитов [138]. Предполагается, что классические CD14⁺CD16⁻ моноциты дают начало М1-макрофагам, тогда как неклассические CD14⁺CD16⁺ моноциты — репаративным М2-клеткам [35]. Общее количество моноцитов в периферической крови пациентов в остром периоде инсульта возрастает за счет классических моноцитов, тогда как содержание неклассических моноцитов значимо снижается. Причем соотношение классических и неклассических моноцитов в периферической крови пациентов в острую и подострую фазу четко коррелирует с тяжестью и прогрессией ишемического инсульта [55].

Лимфоциты, и в частности Т-клетки, появляются в зоне ишемии и пограничных областях через 24 часа после окклюзии среднемозговой артерии, и их количество достигает пика на 7 сутки. У мышей с дефицитом лимфоцитов размеры инфаркта меньше, а восстановление количества периферических лимфоцитов приводит к увеличению зоны повреждения [50]. Повреждающее действие Т-клеток в модели инсульта

проявляется уже через 24 часа после окклюзии среднемозговой артерии и не связано с антигенной специфичностью, экспрессией ксеноантигенов либо с усилением тромбообразования [59]. Наибольшую популяцию среди рекрутируемых клеток составляют CD8⁺ цитотоксические Т-клетки, оказывающие нейродеструктивный эффект через продукцию интерферона-гамма и высвобождение перфорина. Повреждающий эффект Т-лимфоцитов может быть также обусловлен экспрессией Т-клетками прооксидативных ферментов и повышенной продукцией супероксид радикалов [10]. Деплеция Т-клеток, блокирование их миграции или функциональной активности оказывает протективный эффект в модели очаговой ишемии головного мозга [67]. Относительно гамма-дельта Т-клеток имеются данные, что они рекрутируются под действием продуцируемого макрофагами IL-23, и их повреждающее действие связано с секрецией IL-17. При этом негативный эффект гамма-дельта Т-клеток проявляется в поздней, но не на ранней стадии экспериментального инсульта [113]. Таким образом, повреждающий эффект Т-клеток в остром периоде инсульта обусловлен активацией и инфильтрацией антигеннеспецифических Т-клеток и продукцией ими провоспалительных и цитотоксических медиаторов. Данный эффект не связан с адаптивным иммунным ответом, развитие которого требует 7-10 дней.

Адаптивный иммунный ответ

Повреждение мозговой ткани при инсульте сопровождается высвобождением большого количества аутоантигенов. В сыворотке крови пациентов с ишемическим инсультом обнаруживается повышенный уровень различных мозгоспецифических антигенов — основного белка миелина, креатинкиназы, нейрональной энолазы и белка s100, концентрация которых коррелирует с размерами инфаркта [52]. Мозгоспецифические антигены способны различными путями (через кровь, цереброспинальную жидкость, арахноидальную оболочку обонятельного нерва, а также будучи захваченными антигенпрезентирующими клетками мозговой ткани) попадать в лимфоузлы и активировать лимфоциты. Презентация тканевых антигенов может индуцировать как состояние толерантности, так и иммунный ответ. Однако на фоне повышенного содержания провоспалительных медиаторов, являющихся факторами дифференцировки и созревания дендритных клеток, как правило, индуцируется развитие адаптивных клеточных и гуморальных иммунных реакций [123]. Поскольку таргетными антигенами при церебральной ишемии являются структуры нейрональных, глиальных и эндотелиальных клеток, а также фрагменты внеклеточного ма-

трикса, адаптивный иммунный ответ имеет аутоиммунную направленность и манифестирует появлением на периферии сенсibilизированных к тканевым антигенам аутореактивных Т-клеток и мозгоспецифических аутоантител [51].

Т-клеточный адаптивный ответ

Наличие миелин-реактивных Т-клеток у пациентов с инсультом было выявлено еще в 1991 г. [117]. Впоследствии иммунный ответ Т-клеток к различным мозгоспецифическим антигенам при острой церебральной ишемии был подтвержден в клинике и эксперименте и другими авторами [5, 139]. Презентация антигенов нервной ткани осуществляется презентующими клетками периферической иммунной системы, на что указывает повышенное содержание мозгоспецифических антигенов в дендритных клетках и макрофагах в лимфоузлах, дренирующих ЦНС, у пациентов с инсультом [93].

Данные о роли аутореактивных Т-клеток достаточно противоречивы. Учитывая, что миелинизация нервных волокон играет важную роль в обеспечении двигательной активности и нейропластичности [83], аутоиммунное повреждение миелина может негативно влиять на восстановление после инсульта, обуславливая развитие когнитивных расстройств и церебральной атрофии [64]. Действительно, Becker K.J. и соавт. показали, что у пациентов с инсультом, перенесших инфекцию в раннем периоде (на 15 день), к 90 дню выявляется более выраженный Th1-ответ к основному белку миелина, протеолипидному белку миелина и антигену астроцитов (GFAP). Причем сильный Th1-ответ в эти сроки ассоциируется с неблагоприятным прогнозом [5]. В модели окклюзии средней мозговой артерии и реперфузии у мышей с комбинированным иммунодефицитом (SCID) показано, что введение миелин-реактивных спленоцитов сопровождается миграцией клеток в пораженное полушарие, увеличением объема инфаркта и ухудшением неврологического исхода [99]. Усиление Th1-ответа спленоцитов к мозгоспецифическим антигенам (основному белку миелина, нейрональной энолазе, протеолипидному белку) на фоне введения липополисахарида повышает летальность и ухудшает неврологический исход при моделировании ишемического инсульта [139]. Также обсуждается негативное влияние аутореактивных Т-клеток на отдаленные исходы инсульта, поскольку практически у трети выживших после инсульта пациентов развивается деменция, ассоциированная с атрофией мозга [65].

С другой стороны, имеются данные, согласно которым аутореактивные Т-клетки не оказывают негативного эффекта. Так, Romer C. и соавт. не выявили ухудшений неврологического вос-

становления в отдаленном периоде экспериментального инсульта на фоне усиления антигенспецифического Т-клеточного ответа [101]. Более того, показано, что аутореактивные Т-клетки могут оказывать протективный эффект при поражениях ЦНС. Так, модуляция иммунного ответа путем примирования Т-клеток нейральными антигенами оказывает нейропротективный и противовоспалительный эффекты в моделях острого повреждения головного мозга [39]. В других работах показано, что примирование Т-клеток памяти 1 и 2 типа миелиновым гликопротеином олигодендроцитов ускоряет ревакуляризацию и неврологическое восстановление при травматическом поражении мозга [45]. Пассивный перенос миелин-реактивных Т-клеток также защищает нейроны от вторичных дегенеративных изменений [78].

Механизмы позитивного влияния аутореактивных Т-клеток на функциональное восстановление после инсульта остаются во многом неизвестными. Тем не менее фаза регенеративных процессов, которая следует за фазой острого поражения, совпадает по времени с запуском адаптивного иммунного ответа. Необходимое для функционального восстановления создание новой нейральной сети достигается за счет активации нейрогенеза, нейропластичности, синаптогенеза, ангиогенеза и глиогенеза. Предполагается, что Т-клетки, вовлеченные в иммунный ответ, участвуют в запуске и продвижении этих репаративных механизмов преимущественно за счет продукции нейротрофических и регуляторных факторов [9]. Действительно, Т-клетки принимают участие в поддержании нейрогенеза в гиппокампе [131]. Этот эффект обеспечивается антигенспецифическими CD4⁺Т-лимфоцитами и опосредуется продукцией нейротрофических факторов – фактора роста нервов, нейротрофического фактора головного мозга, нейротрофина-3 [77, 140]. Таким образом, индуцированные при ишемическом поражении головного мозга антигенспецифические CD4⁺Т-клетки могут стимулировать неврологическое восстановление через активацию нейрогенеза.

Разнонаправленные эффекты адаптивного иммунного ответа могут быть обусловлены различными факторами, в том числе субпопуляционной принадлежностью Т-клеток, а также направленностью и силой иммунного ответа. Кроме того, определенное значение может иметь специфичность антигенов. Так, более высокая реактивность лимфоцитов Т-клеточной зоны миндалины или лимфоузлов к основному белку миелина коррелирует с исходной тяжестью инсульта, большими размерами инфаркта и худшим исходом. В то же время более высокая реактив-

ность к нейрональным антигенам коррелирует с меньшими размерами инфаркта и лучшими отдаленными исходами [93]. Возможно, это связано с презентацией миелиновых и нейрональных антигенов различными типами дендритных клеток, как это происходит при рассеянном склерозе [125], и активацией соответственно различных типов Т-клеток.

Индукция толерантности и Treg

Одной из популяций, которая генерируется при ишемическом повреждении мозга и мигрирует в зону ишемического повреждения, являются регуляторные CD4⁺Т-клетки с супрессорной активностью (Treg). В модели экспериментального инсульта Treg выявляются с первых дней, накапливаются в зоне ишемии, пролиферируют и сохраняются там до 30 дней [116]. Раннее появление Treg в зоне поражения отражает неспецифическую инфильтрацию Т-клеток на фоне нарушений гематоэнцефалического барьера, тогда как в более поздние сроки возрастание Treg в циркуляции, селезенке и зоне ишемического поражения головного мозга свидетельствует о развитии адаптивного иммунного ответа и, в частности, об индукции периферической толерантности. Обладая супрессорной активностью, Treg через модуляцию воспалительного процесса могут защищать ткани мозга от ишемического повреждения. Так, Treg секретируют противовоспалительные цитокины (TGF- β , IL-10), подавляющие системное и локальное воспаление; ингибируют выработку металлопротеиназы-9, предотвращая нарушения гематоэнцефалического барьера; ингибируют активность Т-клеток в мозговой ткани и на периферии; подавляют активацию микроглии [18, 68]. Усиление активности Treg с помощью ингибитора гистоновой диацетилазы приводит к сокращению размеров поражения мозговой ткани [69]. Протективный эффект наблюдается и при введении экзогенных Treg [66] либо генерации Treg на фоне индукции иммунологической толерантности против основного белка миелина [34]. Данный эффект воспроизводился при переносе спленоцитов или CD4⁺Т-клеток от толерантных мышей интактным животным [4]. Позитивный эффект Treg может быть обусловлен не только их иммунорегуляторной активностью, направленной на подавление воспалительного процесса, но и стимулирующим влиянием на стволовые клетки, поскольку деплеция Treg сопровождается ослаблением нейрогенеза [104]. Другим механизмом Treg может быть стимулирующее действие этих клеток на постишемическую неоваскуляризацию [141].

С другой стороны, Treg могут вызывать повреждение микрососудов и тем самым потенцировать ишемическое поражение головного моз-

га. Действительно, имеются данные, что деплеция CD25⁺Treg в модели инсульта либо не сказывается на неврологическом восстановлении [116], либо оказывает протективный эффект. Причем в последнем случае неврологическое улучшение нивелировалось при восстановлении популяции регуляторных Т-клеток [98]. Введение Treg в остром периоде инсульта оказывает негативный эффект, который является антигеннеспецифическим и связан со способностью Treg усиливать взаимодействие тромбоцитов с эндотелиальными клетками, способствуя образованию тромбов в микрососудах [60].

У пациентов с ишемическим инсультом, особенно у женщин, содержание Treg на периферии повышено, однако эти клетки характеризуются сниженной способностью ингибировать пролиферацию аутологических лимфоцитов [135]. Ruhnau J. и соавт. также выявили снижение супрессорной активности Treg у пациентов с инсультом. При этом авторы отмечали значимое снижение количества FoxP3⁺CD39⁺Treg в периферической крови и подавление их супрессорной активности в течение первых 7 суток после ишемического инсульта [103].

Гуморальный иммунный ответ

Вовлеченность В-клеток в патогенез церебральной ишемии подтверждается появлением в сыворотке пациентов антител со специфичностью к антигенам ЦНС [7]. Хотя значение В-клеток и продуцируемых ими аутоантител при ишемическом инсульте далеко от полного понимания, на сегодняшний день нет данных о негативном влиянии циркулирующих аутоантител на неврологическое восстановление после инсульта. Более того, складывается впечатление о протективной роли гуморального иммунитета. Внутримозговое введение CD19⁺В-клеток селезенки в модели инсульта у мышей с дефицитом В-лимфоцитов приводит к уменьшению размера инфаркта [20]. Возможно, выявленный протективный эффект связан с присутствием среди В-лимфоцитов регуляторных В-клеток, способных подавлять продукцию провоспалительных цитокинов периферическими Т-лимфоцитами. Действительно, перенос регуляторных В-клеток в мозговую ткань в острую фазу экспериментального инсульта подавляет воспалительный ответ и улучшает неврологическое восстановление [97]. Другим объяснением протективной роли В-клеток может быть продукция аутоантител, распознающих молекулу фосфорилхолина, входящую в состав окисленных липидов низкой плотности, мембран апоптотических клеток и клеточной стенки *Streptococcus pneumoniae*. Эти антитела могут участвовать как в элиминации окисленных липопротеидов и апоптотических

клеток, так и защите от пневмококковой инфекции [14]. У человека отмечается выраженное уменьшение циркулирующих и селезеночных В-клеток (атрофия селезенки) при инсульте [87]. Причем количество CD19⁺В-лимфоцитов прямо коррелирует с хорошим неврологическим восстановлением [122]. Соответственно, уменьшение выраженности селезеночной атрофии на фоне приема статинов оказывает нейропротективный эффект [53].

Механизмы подавления нейровоспаления

Воспалительный ответ, индуцированный ишемическим инсультом, включает механизмы обратной регуляции, направленные на ограничение и разрешение воспаления. Подавление воспаления осуществляется посредством взаимодействия большого количества клеток и продуцируемых ими факторов и является критическим условием для предупреждения развития вторичных повреждений и запуска репаративных процессов [51, 85]. При этом важными этапами в подавлении воспаления является удаление погибших клеток, создание противовоспалительного микроокружения и секреция ростовых и нейротрофических факторов, обеспечивающих выживаемость клеток и тканевую реконструкцию [82, 115].

Элиминация мертвых клеток осуществляется клетками микроглии и инфильтрирующими макрофагами [105] путем распознавания сигналов «найди меня» (UTP, ATP) и «съешь меня» (UDP, PtdSer), которые, соответственно, вызывают хемотаксис макрофагов и стимулируют фагоцитоз [61, 81]. Фагоцитоз апоптотических клеток стимулирует секрецию макрофагами IL-10 и TGF-β [82], которые в свою очередь блокируют антигенную презентацию, индуцируют Treg, подавляют экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках и продукцию провоспалительных цитокинов [118]. TGF-β и IL-10 являются плеiotропными цитокинами, которые наряду с противовоспалительной активностью обладают нейропротективным действием [13, 41]. Поэтому усиление их синтеза в процессе фагоцитоза апоптотических клеток может стимулировать тканевую репарацию за счет подавления воспаления и прямого цитопротективного эффекта на клетки, выжившие в условиях церебральной ишемии. Кроме того, важную роль в подавлении постишемического воспаления могут играть метаболиты арахидоновой кислоты и омега-3 жирной кислоты – липоксины, резолвины и протектины [115].

Активация ростовых факторов в постинсультном периоде способствует формированию микроокружения, благоприятствующего спраутингу нейронов, нейрогенезу, глиогенезу, ангиогенезу и образованию аксональных коллатералей [15].

Поэтому ростовые факторы и металлопротеиназы, продуцируемые макрофагами, нейронами, астроцитами, олигодендроцитами и эндотелиальными клетками, обеспечивают процессы восстановления и ремоделирования поврежденной нервной ткани [15, 40].

Системные проявления иммунного ответа на острую ишемию

Наряду с воспалительным ответом в мозговой ткани изменения иммунных параметров наблюдаются также в крови, костном мозге, селезенке и других лимфоидных органах [24, 76]. Как в экспериментальных моделях, так и у человека инсульт сопровождается быстрым (в течение часов) возрастанием числа лейкоцитов в периферической крови и усилением экспрессии генов провоспалительных медиаторов, что свидетельствует о развитии системной воспалительной реакции в ответ на ишемическое поражение мозга [32, 86]. Системное воспаление проявляется значимым увеличением соотношения нейтрофилов и лимфоцитов [136], величина которого является прогностическим маркером 60- и 90-суточной летальности при ишемическом инсульте [12, 120].

Наряду с костным мозгом источником лейкоцитов на периферии является селезенка, сокращение которой сопровождается высвобождением спленоцитов в циркуляцию и их миграцией в зону первичного ишемического поражения [110], что опосредует иммунные механизмы вторичных повреждений [91]. У человека активация селезенки проявляется сокращением ее размеров и выявляется у 40% пациентов. Эти пациенты характеризуются большей тяжестью инсульта и выраженностью воспалительной реакции, в частности более высоким уровнем в плазме интерферона-гамма, IL-6, IL-12, IL-13 и IL-10 [124]. Вовлечение клеток селезенки при инсульте связывают с активацией симпатической нервной системы [96] и повышенной экспрессией провоспалительных медиаторов, включая хемокины и цитокины (TNF α , IFN γ , IL-6, MCP-1, MIP-2, CCR1, CCR2, CCR7 и IP-10) [86, 111]. Удаление селезенки или ее облучение перед или сразу после окклюзии мозговой артерии уменьшает размеры ишемического инфаркта и улучшает восстановление [90, 137]. В этом аспекте терапевтический потенциал стволовых клеток в моделях ишемического поражения головного мозга может быть в значительной мере опосредован их способностью подавлять провоспалительный ответ со стороны селезенки [56, 108, 142].

Индукцированный церебральной ишемией острофазовый ответ быстро сменяется глубокой иммунодепрессией. Эта фаза характеризуется лимфопенией, возрастанием уровня IL-10, снижением функциональной активности моноци-

тов (уменьшением экспрессии HLA-DR молекул и способности продуцировать провоспалительные цитокины), апоптозом лимфоцитов и атрофией лимфоидных органов [42, 121]. Клиническим проявлением иммунной недостаточности является присоединение инфекций респираторного и мочевого тракта, часто являющихся причиной летальности при инсульте [76, 121]. Так, пневмония и инфекция мочевыводящих путей выявляются у 30% пациентов в постинсультном периоде [130]. Развитие инфекций ассоциировано с более обширными размерами ишемического поражения мозга и более выраженными проявлениями иммунной недостаточности. По данным Vogelgesang A. и соавт., пациенты с наличием инфекционных осложнений отличаются более высоким уровнем IL-10 и IL-6 и более низким содержанием CD4⁺T-клеток [127].

Механизмы развития иммунной недостаточности во многом связывают с активацией симпатoadrenalовой системы и повышенным высвобождением глюкокортикоидов и катехоламинов [3, 76]. Действительно, у пациентов с инсультом выявляется повышенный уровень в сыворотке крови кортизола и катехоламинов, высокая концентрация которых является предиктором летального исхода [3, 16]. Взаимодействуя с β 2-адренорецепторами, катехоламины подавляют антигенпрезентирующую функцию дендритных клеток и моноцитов; индуцируют толерогенные дендритные клетки, способные вызывать анергию Т-лимфоцитов и генерацию Treg [44]. Активированные глюкокортикоидами моноциты подавляют в Т-клетках продукцию IFN γ и IL-17 и также индуцируют генерацию Treg [126]. Возрастание уровня указанных медиаторов вызывает апоптоз лимфоцитов и Th1/Th2-переключение, атрофию первичных и вторичных лимфоидных органов, индукцию регуляторных Т-клеток [87, 88, 94]. Симпатическая иннервация имеется во всех органах, включая иммунную систему. Кроме того, катехоламины могут секретироваться Т-клетками. Поэтому, учитывая наличие адренергических рецепторов на иммунных клетках, гиперактивация симпатoadrenalовой системы при инсульте во многом обуславливает развитие глубокой иммуносупрессии [132]. Причастность указанных медиаторов к развитию инфекционных осложнений подтверждается тем, что пациенты с повышенным уровнем кортизола и катехоламинов более чувствительны к развитию инфекционных осложнений [16]. Антагонисты стероидов или β -адренергических рецепторов (пропранолол) в моделях экспериментального инсульта предотвращают развитие апоптоза лимфоцитов и уменьшают чувствительность к инфекциям [94]. Аналогичным образом пациенты,

принимающие β -блокаторы, имеют меньший риск ранней летальности [27].

Поскольку иммуносупрессия приводит к подавлению антигенной презентации и, как следствие, способствует развитию толерогенного ответа, при отсутствии инфекции данная фаза способствует предотвращению избыточных проявлений системного воспаления и аутоиммунных реакций. С этой точки зрения «контролируемая» иммуносупрессия может рассматриваться в качестве механизма feed-back регуляции, направленного на предупреждение вторичных повреждений и прогрессии неврологических расстройств, обусловленных воспалительными и/или аутоиммунными реакциями.

Однако чрезмерная или пролонгированная иммуносупрессия часто сопряжена с развитием инфекционных осложнений, которые являются непосредственной причиной летального исхода [130]. Кроме того, присоединение инфекции может потенцировать воспаление и развитие аутоиммунных реакций за счет активации ко-стимуляторных молекул и усиления антигенной презентации [62]. Так, введение липополисахарида в модели ишемии и реперфузии (в качестве прототипа бактериальной инфекции) ухудшает исходы инсульта [75] и усиливает выраженность постишемической атрофии мозга через 1 мес. после моделирования инсульта, что связано с усилением экспрессии ко-стимуляторной молекулы B7.1, сенсibilизацией Т-клеток к мозговым антигенам и активацией Th1-ответа [6, 139]. Таким образом, негативный эффект постинсультной иммуносупрессии, помимо присоединения инфекций, может заключаться в потенцировании аутоиммунных реакций, детерминирующих неврологические расстройства в отдаленном периоде. При этом еще одним механизмом, способствующим активации аутореактивных клонов, может быть деплеция CD4⁺Treg как результат постишемической лимфопении.

Заключение

Иммунные реакции являются ключевыми звеньями патогенеза инсульта. Воспаление, опосредованное клетками врожденного иммунитета, играет двойственную роль, оказывая не только нейродеструктивные эффекты, но и участвуя в восстановлении поврежденной нервной ткани.

Ишемия и реперфузия индуцируют высвобождение воспалительных сигналов, ответственных за интрацеребральную инвазию периферических лейкоцитов. И хотя конечной целью воспалительной реакции является восстановление гомеостаза, воспалительные медиаторы оказывают выраженное повреждающее действие на мозговую ткань. Церебральная ишемия также запускает локальные и системные реакции адаптивного иммунитета, однако эти реакции, по-видимому, не оказывают значимого деструктивного действия в остром периоде. Более того, отдельные субпопуляции лимфоцитов обладают протективной функцией, ослабляют цитотоксический эффект провоспалительных медиаторов и способствуют восстановлению поврежденной ткани. В то же время значение адаптивных реакций в развитии отдаленных неврологических расстройств, в частности ассоциированных с атрофией мозга и деменцией, остается открытым вопросом. Механизмы деструктивных и протективных эффектов иммунных клеток при церебральной ишемии еще далеки от полного осмысления. Важным представляется выяснение роли иммуносупрессии в отношении ранних и отдаленных исходов инсульта. В то время как иммунные реакции приводят к повреждению мозга, поврежденная мозговая ткань в свою очередь оказывает выраженный иммуносупрессивный эффект, что предрасполагает к присоединению инфекции и снижает выживаемость пациентов с инсультом. Ключевая роль иммунной системы в патогенезе инсульта обосновывает необходимость разработки иммунотерапевтических подходов к лечению церебральной ишемии. Исследования, раскрывающие взаимодействия между иммунной системой и ишемизированным мозгом, позволят разработать новые методы иммуномодуляции, направленные на подавление воспалительного и усиление репаративного ответа иммунных клеток. Перспективной сферой дальнейшего поиска является также выяснение клеточных и молекулярных механизмов постишемической иммуносупрессии. Исследования в этом направлении позволят выявить не только новые прогностические биомаркеры, но и определить новые мишени терапевтических воздействий.

Список литературы / References

1. Ajmo C.T. Jr., Vernon D.O., Collier L., Hall A.A., Garbuzova-Davis S., Willing A., Pennypacker K.R. The spleen contributes to stroke-induced neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.*, 2008, Vol. 86, no. 10, pp. 2227-2234.
2. Al'Qteishat A., Gaffney J., Krupinski J., Rubio F., West D., Kumar S., Kumar P., Mitsios N., Slevin M. Changes in hyaluronan production and metabolism following ischaemic stroke in man. *Brain*, 2006, Vol. 129, no. 8, pp. 2158-2176

3. Anne M., Juha K., Timo M., Mikko T., Olli V., Kyosti S., Heikki H., Vilho M. Neurohormonal activation in ischemic stroke: effects of acute phase disturbances on long-term mortality. *Curr. Neurovasc. Res.*, 2007, Vol. 4, no. 3, pp. 170-175.
4. Becker K., Kindrick D., McCarron R., Hallenbeck J., Winn R. Adoptive transfer of myelin basic protein-tolerized splenocytes to naive animals reduces infarct size: a role for lymphocytes in ischemic brain injury? *Stroke*, 2003, Vol. 34, no. 7, pp. 1809-1815.
5. Becker K.J., Kalil A.J., Tanzi P., Zierath D.K., Savos A.V., Gee J.M., Hadwin J., Carter K.T., Shibata D., Cain K.C. Autoimmune responses to the brain after stroke are associated with worse outcome. *Stroke*, 2011, Vol. 42, no. 10, pp. 2763-2769.
6. Becker K.J., Kindrick D.L., Lester M.P., Shea C., Ye Z.C. Sensitization to brain antigens after stroke is augmented by lipopolysaccharide. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2005, Vol. 25, no. 12, pp. 1634-1644.
7. Bornstein N.M., Aronovich B., Korczyn A.D., Shavit S., Michaelson D.M., Chapman J. Antibodies to brain antigens following stroke. *Neurology*, 2001, Vol. 56, no. 4, pp. 529-530.
8. Bowen K.K., Dempsey R.J., Vemuganti R. Adult interleukin-6 knockout mice show compromised neurogenesis. *Neuroreport*, 2011, Vol. 22, no. 3, pp. 126-130.
9. Brait V.H., Arumugam T.V., Drummond G.R., Sobey C.G. Importance of T lymphocytes in brain injury, immunodeficiency, and recovery after cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2012, Vol. 32, no. 4, pp. 598-611.
10. Brait V.H., Jackman K.A., Walduck A.K., Selemidis S., Diep H., Mast A.E., Guida E., Broughton B.R.S., Drummond G.R., Sobey C.G. Mechanisms contributing to cerebral infarct size after stroke: gender, reperfusion, T lymphocytes, and Nox2-derived superoxide. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2010, Vol. 30, no. 7, pp. 1306-1317.
11. Breckwoldt M.O., Chen J.W., Stangenberg L., Aikawa E., Rodriguez E., Qiu S., Moskowitz M.A., Weissleder R. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, Vol. 105, no. 47, pp. 18584-18589.
12. Brooks S.D., Spears C., Cummings C., van Gilder R.L., Stinehart K.R., Gutmann L., Domico J., Culp S., Carpenter J., Rai A., Barr T.L. Admission neutrophil-lymphocyte ratio predicts 90 day outcome after endovascular stroke therapy. *J. Neurointerv. Surg.*, 2014, Vol. 6, no. 8, pp. 578-583.
13. Buisson A., Nicole O., Docagne F., Sartelet H., Mackenzie E.T., Vivien D. Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor β 1. *FASEB J.*, 1998, Vol. 12, no. 15, pp. 1683-1691.
14. Caligiuri G., Nicoletti A., Poirier B., Hansson G.K. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 109, no. 6, pp. 745-753.
15. Carmichael S.T. Translating the frontiers of brain repair to treatments: starting not to break the rules. *Neurobiol. Dis.*, 2010, Vol. 37, no. 2, pp. 237-242.
16. Chamorro A., Urra X., Planas A.M. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke*, 2007, Vol. 38, no. 3, pp. 1097-1103.
17. Chamorro A., Meisel A., Planas A.M., Urra X., van de Beek D., Veltkamp R. The immunology of acute stroke. *Nat. Rev. Neurol.*, 2012, Vol. 8, no. 7, pp. 401-410.
18. Chen S., Wu H., Klebe D., Hong Y., Zhang J., Tang J. Regulatory T cell in stroke: a new paradigm for immune regulation. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, Art. ID 689827, 9 p.
19. Chen Y., Hallenbeck J.M., Ruetzler C., Bol D., Thomas K., Berman N.E., Vogel S.N. Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2003, Vol. 23, no. 6, pp. 748-755.
20. Chen Y., Bodhankar S., Murphy S.J., Vandenbark A.A., Alkayed N.J., Offner H. Intrastriatal B-cell administration limits infarct size after stroke in B-cell deficient mice. *Metab. Brain Dis.*, 2012, Vol. 27, no. 4, pp. 487-493.
21. Chu H.X., Broughton B.R., Kim H.A., Lee S., Drummond G.R., Sobey C.G. Evidence that Ly6C(hi) monocytes are protective in acute ischemic stroke by promoting M2 macrophage polarization. *Stroke*, 2015, Vol. 46, no. 7, pp. 1929-1937.
22. Clark W.M., Rinker L.G., Lessov N.S., Hazel K., Hill J.K., Stenzel-Poore M., Eckenstein F. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke*, 2000, Vol. 31, no. 7, pp. 1715-1720.
23. Cuartero M.I., Ballesteros I., Moraga A., Nombela F., Vivancos J., Hamilton J.A., Corbí Á.L., Lizasoain I., Moro M.A. N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR γ agonist rosiglitazone. *Stroke*, 2013, Vol. 44, no. 12, pp. 3498-3508.
24. Denes A., McColl B.W., Leow-Dyke S.F., Chapman K.Z., Humphreys N.E., Grecis R.K., Allan S.M., Rothwell N.J. Experimental stroke-induced changes in the bone marrow reveal complex regulation of leukocyte responses. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2011, Vol. 31, no. 4, pp. 1036-1050.
25. Denes A., Vidyasagar R., Feng J., Narvainen J., McColl B.W., Kauppinen R.A., Allan S.M. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2007, Vol. 27, no. 12, pp. 1941-1953.
26. Dimitrijevic O.B., Stamatovic S.M., Keep R.F., Andjelkovic A.V. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke*, 2007, Vol. 38, no. 4, pp. 1345-1353.

27. Dziedzic T., Slowik A., Pera J., Szczudlik A. Beta-blockers reduce the risk of early death in ischemic stroke. *J. Neurol. Sci.*, 2007, Vol. 252, no. 1, pp. 53-56.
28. Easton A.S. Neutrophils and stroke – can neutrophils mitigate disease in the central nervous system? *Int. Immunopharmacol.*, 2013, Vol. 17, no. 4, pp. 1218-1225.
29. el Ali A., Rivest S. Microglia in Alzheimer's disease: a multifaceted relationship. *Brain Behav. Immun.*, 2016, Vol. 55, pp. 138-150.
30. Emsley H.C., Smith C.J., Georgiou R.F., Vail A., Hopkins S.J., Rothwell N.J., Tyrrell P.J. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2005, Vol. 76, no. 10, pp. 1366-1372.
31. Emsley H.C., Smith C.J., Georgiou R.F., Vail A., Tyrrell P.J., Barberan E.M., Rothwell N.J., Hopkins S.J. Correlation of systemic inflammatory response with infarct volume in acute ischemic stroke patients. *Stroke*, 2005, Vol. 36, no. 2, pp. 228-229.
32. Emsley H.C., Smith C.J., Gavin C.M., Georgiou R.F., Vail A., Barberan E.M., Hallenbeck J.M., del Zoppo G.J., Rothwell N.J., Tyrrell P.J., Hopkins S.J. An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 2003, Vol. 139, no. 1-2, pp. 93-101.
33. Fonarow G.C., Smith E.E., Saver J.L., Reeves M.J., Bhatt D.L., Grau-Sepulveda M.V., Olson D.M., Hernandez A.F., Peterson E.D., Schwamm L.H. Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke: patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes. *Circulation*, 2011, Vol. 123, no. 7, pp. 750-758.
34. Gee J.M., Kalil A., Thullbery M., Becker K.J. Induction of immunologic tolerance to myelin basic protein prevents central nervous system autoimmunity and improves outcome after stroke. *Stroke*, 2008, Vol. 39, no. 5, pp. 1575-1582.
35. Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 2010, Vol. 327, no. 5966, pp. 656-661.
36. Ginis I., Jaiswal R., Klimanis D., Liu J., Greenspon J., Hallenbeck J.M. TNF-alpha-induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF-kappaB transactivation: the role of NF-kappaB association with p300 adaptor. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2002, Vol. 22, no. 2, pp. 142-152.
37. Gliem M., Schwaninger M., Jander S. Protective features of peripheral monocytes/macrophages in stroke. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, Vol. 1862, no. 3, pp. 329-338.
38. Gombault A., Baron L., Couillin I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 3, p. 414.
39. Graber J.J., Dhib-Jalbut S. Protective autoimmunity in the nervous system. *Pharmacol. Ther.*, 2009, Vol. 121, no. 2, pp. 147-159.
40. Greenberg D.A., Jin K. Growth factors and stroke. *NeuroRx*, 2006, Vol. 3, no. 4, pp. 458-465.
41. Grilli M., Barbieri I., Basudev H., Brusa R., Casati C., Lozza G., Ongini E. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur. J. Neurosci.*, 2000, Vol. 12, no. 7, pp. 2265-2272.
42. Haeusler K.G., Schmidt W.U., Foehring F., Meisel C., Guenther C., Brunecker P., Kunze C., Helms T., Dirnagl U., Volk H.D., Villringer A. Immune responses after acute ischemic stroke or myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.*, 2012, Vol. 155, no. 3, pp. 372-377.
43. Hayakawa K., Pham L.D., Arai K., Lo E.H. High-mobility group box 1: an amplifier of stem and progenitor cell activity after stroke. *Acta Neurochir. Suppl.*, 2013, Vol. 118, pp. 31-38.
44. Hervé J., Dubreil L., Tardif V., Terme M., Pogu S., Anegón I., Rozec B., Gauthier C., Bach J.M., Blancou P. β 2-adrenoreceptor agonist inhibits antigen cross-presentation by dendritic cells. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 7, pp. 3163-3171.
45. Hofstetter H.H., Sewell D.L., Liu F., Sandor M., Forsthuber T., Lehmann P.V., Fabry Z. Autoreactive T cells promote post-traumatic healing in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.*, 2003, Vol. 134, no. 1-2, pp. 25-34.
46. Hu X., Li P., Guo Y., Wang H., Leak R.K., Chen S., Gao Y., Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2012, Vol. 43, no. 11, pp. 3063-3070.
47. Hu X., Leak R.K., Shi J., Suenaga J., Gao Y., Zheng P., Chen J. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. *Nat. Rev. Neurol.*, 2015, Vol. 11, no. 1, pp. 56-64.
48. Hua F., Ma J., Ha T., Kelley J.L., Kao R.L., Schweitzer J.B., Kalbfleisch J.H., Williams D.L., Li C. Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Brain Res.*, 2009, Vol. 1262, pp. 100-108.
49. Huang J.M., Hu J., Chen N., Hu M.L. Relationship between plasma high-mobility group box-1 levels and clinical outcomes of ischemic stroke. *J. Crit. Care*, 2013, Vol. 28, no. 5, pp. 792-797.
50. Hurn P.D., Subramanian S., Parker S.M., Afentoulis M.E., Kaler L.J., Vandenbark A.A., Offner H. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2007, Vol. 27, no. 11, pp. 1798-1805.
51. Iadecola C., Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.*, 2012, Vol. 17, no. 7, pp. 796-808.
52. Jauch E.C., Lindsell C., Broderick J., Fagan S.C., Tilley B.C., Levine S.R., NINDS rt-PA Stroke Study Group. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the National Institute of Neurological

Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study. *Stroke*, 2006, Vol. 37, no. 10, pp. 2508-2513.

53. Jin R., Zhu X., Liu L., Nanda A., Granger D.N., Li G. Simvastatin attenuates stroke-induced splenic atrophy and lung susceptibility to spontaneous bacterial infection in mice. *Stroke*, 2013, Vol. 44, no. 4, pp. 1135-1143.

54. Jin R., Yang G., Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, Vol. 87, no. 5, pp. 779-789.

55. Kaito M., Araya S., Gondo Y., Fujita M., Minato N., Nakanishi M., Matsui M. Relevance of distinct monocyte subsets to clinical course of ischemic stroke patients. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 8, e69409. doi: 10.1371/journal.pone.0069409

56. Keimpema E., Fokkens M.R., Nagy Z., Agoston V., Luiten P.G., Nyakas C., Boddeke H.W., Copray J.C. Early transient presence of implanted bone marrow stem cells reduces lesion size after cerebral ischemia in adult rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2009, Vol. 35, no. 1, pp. 89-102.

57. Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., Alexander J.K., Donnelly D.J., Popovich P.G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J. Neurosci.*, 2009, Vol. 29, no. 43, pp. 13435-13444.

58. Kim E., Yang J., Beltran C.D., Cho S. Role of spleen-derived monocytes/macrophages in acute ischemic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2014, Vol. 34, no. 8, pp. 1411-1419.

59. Kleinschnitz C., Schwab N., Kraft P., Hagedorn I., Dreykluft A., Schwarz T., Austinat M., Nieswandt B., Wiendl H., Stoll G. Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 18, pp. 3835-3842.

60. Kleinschnitz C., Kraft P., Dreykluft A., Hagedorn I., Gobel K., Schuhmann M. K., Nieswandt B., Stoll G., Wiendl H. Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 4, pp. 679-691.

61. Koizumi S., Shigemoto-Mogami Y., Nasu-Tada K., Shinozaki Y., Ohsawa K., Tsuda M., Joshi B.V., Jacobson K.A., Kohsaka S., Inoue K. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*, 2007, Vol. 446, no. 7139, pp. 1091-1095.

62. Kono H., Rock K.L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 4, pp. 279-289.

63. Lambertsen K.L., Biber K., Finsen B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2012, Vol. 32, no. 9, pp. 1677-1698.

64. Lawrence A.J., Patel B., Morris R.G., MacKinnon A.D., Rich P.M., Barrick T.R., Markus H.S. Mechanisms of cognitive impairment in cerebral small vessel disease: multimodal MRI results from the St George's cognition and neuroimaging in stroke (SCANS) study. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 4, e61014. doi: 10.1371/journal.pone.0061014.

65. Leys D., Henon H., Mackowiak-Cordoliani M.A., Pasquier F. Poststroke dementia. *Lancet Neurol.*, 2005, Vol. 4, no. 11, pp. 752-759.

66. Li P., Gan Y., Sun B.L., Zhang F., Lu B., Gao Y., Liang W., Thomson A.W., Chen J., Hu X. Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia. *Ann. Neurol.*, 2013, Vol. 74, no. 3, pp. 458-471.

67. Liesz A., Zhou W., Mracsko E., Karcher S., Bauer H., Schwarting S., Sun L., Bruder D., Stegemann S., Cerwenka A., Sommer C., Dalpke A.H., Veltkamp R. Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain*, 2011, Vol. 134, no. 3, pp. 704-720.

68. Liesz A., Suri-Payer E., Veltkamp C., Doerr H., Sommer C., Rivest S., Giese T., Veltkamp R. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, pp. 192-199.

69. Liesz A., Zhou W., Na S.Y., Hammerling G.J., Garbi N., Karcher S., Mracsko E., Backs J., Rivest S., Veltkamp R. Boosting regulatory T cells limits neuroinflammation in permanent cortical stroke. *J. Neurosci.*, 2013, Vol. 33, no. 44, pp. 17350-17362.

70. Liu Z., Fan Y., Won S.J., Neumann M., Hu D., Zhou L., Weinstein P.R., Liu J. Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2007, Vol. 38, no. 1, pp. 146-152.

71. London A., Cohen M., Schwartz M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front Cell Neurosci.*, 2013, Vol. 7, Art. 34, 10 p.

72. Lopes Pinheiro M.A., Kooij G., Mizze M.R., Kamermans A., Enzmann G., Lyck R., Schwaninger M., Engelhardt B., de Vries H.E. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, Vol. 1862, no. 3, pp. 461-471.

73. Macrez R., Ali C., Toutirais O., Le Mauff B., Defer G., Dirnagl U., Vivien D. Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol.*, 2011, Vol. 10, no. 5, pp. 471-480.

74. Malm T., Koistinaho M., Muona A., Magga J., Koistinaho J. The role and therapeutic potential of monocytic cells in Alzheimer's disease. *Glia*, 2010, Vol. 58, no. 8, pp. 889-900.

75. McColl B.W., Rothwell N.J., Allan S.M. Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms. *J. Neurosci.*, 2007, Vol. 27, no. 16, pp. 4403-4412.

76. Meisel C., Schwab J., Prass K., Meisel A., Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2005, Vol. 6, no. 10, pp. 775-786.

77. Moalem G., Gdalyahu A., Shani Y., Otten U., Lazarovici P., Cohen I.R., Schwartz M. Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J. Autoimmun.*, 2000, Vol. 15, no. 3, pp. 331-345.
78. Moalem G., Leibowitz-Amit R., Yoles E., Mor F., Cohen I.R., Schwartz M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.*, 1999, Vol. 5, no. 1, pp. 49-55.
79. Moskowitz M.A., Lo E.H., Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*, 2010, Vol. 67, no. 2, pp. 181-198.
80. Mulcahy N.J., Ross J., Rothwell N.J., Loddick S.A. Delayed administration of interleukin-1 receptor antagonist protects against transient cerebral ischaemia in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 2003, Vol. 140, no. 3, pp. 471-476.
81. Napoli I., Neumann H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*, 2009, Vol. 158, no. 3, pp. 1030-1038.
82. Nathan C., Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell*, 2010, Vol. 140, no. 6, pp. 871-882.
83. Nave K.A. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*, 2010, Vol. 468, no. 7321, pp. 244-252.
84. Neumann H. Control of glial immune function by neurons. *Glia*, 2001, Vol. 36, no. 2, pp. 191-199.
85. Neumann S., Shields N.J., Balle T., Chebib M., Clarkson A.N. Innate immunity and inflammation post-stroke: an $\alpha 7$ -nicotinic agonist perspective. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, Vol. 16, no. 12, pp. 29029-29046.
86. Offner H., Subramanian S., Parker S.M., Afentoulis M.E., Vandenbark A.A., Hurn P.D. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2006, Vol. 26, no. 5, pp. 654-665.
87. Offner H., Subramanian S., Parker S.M., Wang C., Afentoulis M.E., Lewis A., Vandenbark A.A., Hurn P.D. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 11, pp. 6523-6531.
88. Offner H., Vandenbark A.A., Hurn P.D. Effect of experimental stroke on peripheral immunity: CNS ischemia induces profound immunosuppression. *Neuroscience*, 2009, Vol. 158, no. 3, pp. 1098-1111.
89. Oppenheim J.J., Tewary P., de la Rosa G., Yang D. Alarmins initiate host defense. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007, Vol. 601, pp. 185-194.
90. Ostrowski R.P., Schulte R.W., Nie Y., Ling T., Lee T., Manaenko A., Gridley D.S., Zhang J.H. Acute splenic irradiation reduces brain injury in the rat focal ischemic stroke model. *Transl. Stroke Res.*, 2012, Vol. 3, no. 4, pp. 473-481.
91. Pennypacker K.R., Offner H. The role of the spleen in ischemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2015, Vol. 35, no. 2, pp. 186-187.
92. Pettigrew L.C., Kindy M.S., Scheff S., Springer J.E., Kryscio R.J., Li Y., Grass D.S. Focal cerebral ischemia in the TNF α -transgenic rat. *J. Neuroinflammation*, 2008, Vol. 5, p. 47.
93. Planas A.M., Gomez-Choco M., Urrea X., Gorina R., Caballero M., Chamorro A. Brain-derived antigens in lymphoid tissue of patients with acute stroke. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 5, pp. 2156-2163.
94. Prass K., Meisel C., Höflich C., Braun J., Halle E., Wolf T., Ruscher K., Victorov I.V., Priller J., Dirnagl U., Volk H.D., Meisel A. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by post-stroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, no. 5, pp. 725-736.
95. Qiu J., Xu J., Zheng Y., Wei Y., Zhu X., Lo E.H., Moskowitz M.A., Sims J.R. High-mobility group box 1 promotes metalloproteinase-9 upregulation through Toll-like receptor 4 after cerebral ischemia. *Stroke*, 2010, Vol. 41, no. 9, pp. 2077-2082.
96. Rasouli J., Lekhray R., Ozbalik M., Brain-spleen inflammatory coupling: a literature review. *Einstein J. Biol. Med.*, 2011, Vol. 27, no. 2, pp. 74-77.
97. Ren X., Akiyoshi K., Dziennis S., Vandenbark A.A., Herson P.S., Hurn P.D., Offner H. Regulatory B cells limit CNS inflammation and neurologic deficits in murine experimental stroke. *J. Neurosci.*, 2011, Vol. 31, no. 23, pp. 8556-8563.
98. Ren X., Akiyoshi K., Vandenbark A.A., Hurn P.D., Offner H. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T-cells in cerebral ischemic stroke. *Metab. Brain Dis.*, 2011, Vol. 26, no. 1, pp. 87-90.
99. Ren X., Akiyoshi K., Grafe M.R., Vandenbark A.A., Hurn P.D., Herson P.S., Offner H. Myelin specific cells infiltrate MCAO lesions and exacerbate stroke severity. *Metab. Brain Dis.*, 2012, Vol. 27, no. 1, pp. 7-15.
100. Ritzel R.M., Patel A.R., Grenier J.M., Crapser J., Verma R., Jellison E.R., McCullough L.D. Functional differences between microglia and monocytes after ischemic stroke. *J. Neuroinflammation*, 2015, Vol. 12, p. 106.
101. Römer C., Engel O., Winek K., Hochmeister S., Zhang T., Rojl G., Klehmet J., Dirnagl U., Meisel C., Meisel A. Blocking stroke-induced immunodeficiency increases CNS antigen-specific autoreactivity but does not worsen functional outcome after experimental stroke. *J. Neurosci.*, 2015, Vol. 35, no. 20, pp. 7777-7794.
102. Rosamond W., Flegal K., Friday G., Furie K., Go A., Greenlund K., Haase N., Ho M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lloyd-Jones D., McDermott M., Meigs J., Moy C., Nichol G., O'Donnell C.J., Roger V., Rumsfeld J., Sorlie P., Steinberger J., Thom T., Wasserthiel-Smoller S., Hong Y. Heart disease and stroke statistics – 2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 2007, Vol. 115, no. 5, e69-e171.

103. Ruhnau J., Schulze J., von Sarnowski B., Heinrich M., Langner S., Pötschke C., Wilden A., Kessler C., Bröcker B.M. Vogelgesang A., Dressel A. Reduced numbers and impaired function of regulatory T cells in peripheral blood of ischemic stroke patients. *Mediators Inflamm.*, 2016, Vol. 2016, Art. ID 2974605, 9 p.
104. Saino O., Taguchi A., Nakagomi T., Nakano-Doi A., Kashiwamura S., Doe N., Nakagomi N., Soma T., Yoshikawa H., Stern D.M., Okamura H., Matsuyama T. Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke. *J. Neurosci. Res.*, 2010, Vol. 88, no. 11, pp. 2385-2389.
105. Schilling M., Besselmann M., Muller M., Strecker J.K., Ringelstein E.B., Kiefer R. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp. Neurol.*, 2005, Vol. 196, no. 2, pp. 290-297.
106. Schilling M., Strecker J.K., Schabitz W.R., Ringelstein E.B., Kiefer R. Effects of monocyte chemoattractant protein 1 on blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*, 2009, Vol. 161, no. 3, pp. 806-812.
107. Schulze J., Zierath D., Tanzi P., Cain K., Shibata D., Dressel A., Becker K. Severe stroke induces long-lasting alterations of high-mobility group box 1. *Stroke*, 2013, Vol. 44, no. 1, pp. 246-248.
108. Schwarting S., Litwak S., Hao W., Bähr M., Weise J., Neumann H. Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury. *Stroke*, 2008, Vol. 39, no. 10, pp. 2867-2875.
109. Schwartz M., London A., Shechter R. Boosting T-cell immunity as a therapeutic approach for neurodegenerative conditions: the role of innate immunity. *Neuroscience*, 2009, Vol. 158, no. 3, pp. 1133-1142.
110. Seifert H.A., Hall A.A., Chapman C.B., Collier L.A., Willing A.E., Pennypacker K.R. A transient decrease in spleen size following stroke corresponds to splenocyte release into systemic circulation. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 2012, Vol. 7, no. 4, pp. 1017-1024.
111. Seifert H.A., Leonardo C.C., Hall A.A., Rowe D.D., Collier L.A., Benkovic S.A., Willing A.E., Pennypacker K.R. The spleen contributes to stroke induced neurodegeneration through interferon gamma signaling. *Metab. Brain Dis.*, 2012, Vol. 27, no. 2, pp. 131-141.
112. Sherman D., Bes A., Easton J.D., Hacke W., Kaste M., Polmar S.H. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: Results of the enlimomab acute stroke trial. *Neurology*, 2001, Vol. 57, no. 8, pp. 1428-1434.
113. Shichita T., Sugiyama Y., Ooboshi H., Sugimori H., Nakagawa R., Takada I., Iwaki T., Okada Y., Iida M., Cua D.J., Iwakura Y., Yoshimura A. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadelta T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, no. 8, pp. 946-950.
114. Siniscalchi A., Gallelli L., Malferrari G., Pirritano D., Serra R., Santangelo E., De Sarro G. Cerebral stroke injury: the role of cytokines and brain inflammation. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 2014, Vol. 25, no. 2, pp. 131-137.
115. Spite M., Serhan C.N. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. *Circ. Res.*, 2010, Vol. 107, no. 10, pp. 1170-1184.
116. Stubbe T., Ebner F., Richter D., Engel O., Klehmet J., Royle G., Meisel A., Nitsch R., Meisel C., Brandt C. Regulatory T cells accumulate and proliferate in the ischemic hemisphere for up to 30 days after MCAO. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2013, Vol. 33, no. 1, pp. 37-47.
117. Tarkowski E., Ekelund P., Tarkowski A. Enhancement of antigen-specific T-cell reactivity on the affected side in stroke patients. *J. Neuroimmunol.*, 1991, Vol. 34, no. 1, pp. 61-67.
118. Taylor A., Verhagen J., Blaser K., Akdis M., Akdis C.A. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology*, 2006, Vol. 117, no. 4, pp. 433-442.
119. Taylor R.A., Sansing L.H. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, Art. ID 746068, 10 p.
120. Tokgoz S., Kayrak M., Akpinar Z., Seyithanoğlu A., Güney F., Yürüten B. Neutrophil lymphocyte ratio as a predictor of stroke. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, 2013, Vol. 22, no. 7, pp. 1169-1174.
121. Urra X., Cervera A., Obach V., Climent N., Planas A.M., Chamorro A. Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke. *Stroke*, 2009, Vol. 40, no. 4, pp. 1262-1268.
122. Urra X., Cervera A., Villamor N., Planas A.M., Chamorro A. Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke. *Neuroscience*, 2009, Vol. 158, no. 3, pp. 1174-1183.
123. Urra X., Miro F., Chamorro A., Planas A.M. Antigen-specific immune reactions to ischemic stroke. *Front Cell Neurosci.*, 2014, Vol. 8, Art. 278.
124. Vahidy F.S., Parsha K.N., Rahbar M.H., Lee M.J., Bui T-T., Nguyen C., Barreto A.D., Bambhroliya A.B., Sahota P., Yang B., Aronowski J., Savitz S.I. Acute splenic responses in patients with ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2016, Vol. 36, no. 6, pp. 1012-1021.
125. van Zwam M., Huizinga R., Melief M.J., Wierenga-Wolf A.F., van Meurs M., Voerman J.S., Biber K.P., Boddeke H.W., Höpken U.E., Meisel C., Meisel A., Bechmann I., Hintzen R.Q., Hart B.A., Amor S., Laman J.D., Boven L.A. Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2009, Vol. 87, no. 3, pp. 273-286.
126. Varga G., Ehrchen J., Brockhausen A., Weinlage T., Nippe N., Belz M. Immune suppression via glucocorticoid-stimulated monocytes: a novel mechanism to cope with inflammation. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 3, pp. 1090-1099.

127. Vogelgesang A., May V.E., Grunwald U., Bakkeboe M., Langner S., Wallaschofski H., Kessler C., Bröker B.M., Dressel A. Functional status of peripheral blood T-cells in ischemic stroke patients. *PLoS ONE*, 2010, Vol. 5, no. 1, e8718. doi: 10.1371/journal.pone.0008718.
128. Waje-Andreassen U., Krakenes J., Ulvestad E., Thomassen L., Myhr K.M., Aarseth J., Vedeler C.A. IL-6: an early marker for outcome in acute ischemic stroke. *Acta Neurol. Scand.*, 2005, Vol. 111, no. 6, pp. 360-365.
129. Wattananit S., Tornero D., Graubardt N., Memanishvili T., Monni E., Tatarishvili J., Miskinyte G., Ge R., Ahlenius H., Lindvall O., Schwartz M., Kokaia Z. Monocyte-derived macrophages contribute to spontaneous long-term functional recovery after stroke in mice. *J. Neurosci.*, 2016, Vol. 36, no. 15, pp. 4182-4195.
130. Westendorp W.F., Nederkoorn P.J., Vermeij J.D., Dijkgraaf M.G., van de Beek D. Post-stroke infection: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol.*, 2011, Vol. 11, p. 110.
131. Wolf S.A., Steiner B., Akpınarlı A., Kammertoens T., Nassenstein C., Braun A., Blankenstein T., Kempermann G. CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 7, pp. 3979-3984.
132. Wong C.H., Jenne C.N., Lee W.Y., Leger C., Kubes P. Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke. *Science*, 2011, Vol. 334, no. 6052, pp. 101-105.
133. Xiong X.Y., Liu L., Yang Q.W. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog. Neurobiol.*, 2016, Vol. 142, pp. 23-44.
134. Xu X., Jiang Y. The Yin and Yang of innate immunity in stroke. *Biomed. Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, Art. ID 807978, 8 p.
135. Yan J., Read S.J., Henderson R.D., Hull R., O'Sullivan J.D., McCombe P.A., Greer J.M. Frequency and function of regulatory T cells after ischaemic stroke in humans. *J. Neuroimmunol.*, 2012, Vol. 243, no. 1-2, pp. 89-94.
136. Zahorec R. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts – rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl. Lek. Listy*, 2001, Vol. 102, no. 1, pp. 5-14.
137. Zhang B.J., Men X.J., Lu Z.Q., Li H.Y., Qiu W., Hu X.Q. Splenectomy protects experimental rats from cerebral damage after stroke due to anti-inflammatory effects. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2013, Vol. 126, no. 12, pp. 2354-2360.
138. Ziegler-Heitbrock H.W. Definition of human blood monocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 2000, Vol. 67, no. 5, pp. 603-606.
139. Zierath D., Thullberg M., Hadwin J., Gee J.M., Savos A., Kalil A., Becker K.J. CNS immune responses following experimental stroke. *Neurocrit. Care*, 2010, Vol. 12, no. 2, pp. 274-284.
140. Ziv Y., Ron N., Butovsky O., Landa G., Sudai E., Greenberg N., Cohen H., Kipnis J., Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat. Neurosci.*, 2006, Vol. 9, no. 2, pp. 268-275.
141. Zouggari Y., Ait-Oufella H., Waeckel L., Vilar J., Loinard C., Cochain C., Recalde A., Duriez M., Levy B.I., Lutgens E., Mallat Z., Silvestre J.S. Regulatory T cells modulate postischemic neovascularization. *Circulation*, 2009, Vol. 120, no. 14, pp. 1415-1425.
142. Vendrame M., Gemma C., Pennypacker K.R., Bickford P.C., Davis Sanberg C., Sanberg P.R., Willing A.E. Cord blood rescues stroke-induced changes in splenocyte phenotype and function. *Exp. Neurol.*, 2006, Vol. 199, no. 1, pp. 191-200.

Авторы:

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

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

Морозов С.А. — аспирант 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

Authors:

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

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

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

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

Поступила 15.09.2016

Отправлена на доработку 19.09.2016

Принята к печати 26.12.2016

Received 15.09.2016

Revision received 19.09.2016

Accepted 26.12.2016

ЦИТОКИНОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС И ЕГО КОРРЕКЦИИ СОЕДИНЕНИЕМ РЯДА 1,3,4-ТИАДИАЗИНА И ЛИПОВОЙ КИСЛОТОЙ

Данилова И.Г.^{1,2}, Емельянов В.В.¹, Гетте И.Ф.^{1,2}, Медведева С.Ю.^{1,2},
Булавинцева Т.С.^{1,2}, Черешнева М.В.², Сидорова Л.П.¹,
Черешнев В.А.^{1,2}, Соколова К.В.¹

¹ ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. В эксперименте *in vivo* впервые дана комплексная сравнительная оценка способности соединения L-17 (2-морфолино-5-фенил-1,3,4-тиадиазина гидробромида) и антиоксиданта липоевой кислоты (ЛК) корректировать уровень цитокинемии, метаболические нарушения и морфологические изменения в поджелудочной железе при аллоксановом диабете. Установлено, что все тестируемые соединения корректируют гипергликемию, снижают накопление гликированных белков крови. Исследуемое соединение L-17 из ряда 1,3,4-тиадиазинов обладает способностью к коррекции метаболических нарушений при аллоксановом СД, сопоставимой с таковой антиоксиданта ЛК. Однако L-17 снижает уровень исследуемых цитокинов до значений интактных животных, предотвращая развитие системных воспалительных реакций, обуславливающих повреждение органов-мишеней при СД.

Ключевые слова: сахарный диабет, гипергликемия, воспаление, инсулин, цитокины, липоевая кислота

CYTOKINE REGULATION OF REGENERATIVE PROCESSES IN PANCREATIC GLAND IN ALLOXAN-INDUCED DIABETIC RATS, AND IT CORRECTION BY 1,3,4-THIADIAZINE COMPOSITION AND LIPOIC ACID

Danilova I.G.^{a,b}, Emelianov V.V.^a, Gette I.F.^{a,b}, Medvedeva S.Yu.^{a,b},
Bulavintseva T.S.^{a,b}, Cheresheva M.V.^b, Sidorova L.P.^a,
Chereshnev V.A.^{a,b}, Sokolova K.V.^a

^a B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. A comprehensive comparative evaluation of the ability of L-17 compound (2-morpholino-5-phenyl-1,3,4-thiadiazine) and antioxidant lipoic acid (LA) to correct blood cytokine levels, metabolic disorders

Адрес для переписки:

Данилова Ирина Георгиевна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел./факс: 8 (343) 374-00-70.
E-mail: ig-danilova@yandex.ru

Address for correspondence:

Danilova Irina G.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian
Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Ekaterinburg, Pervomayskaya str., 106.
Phone: 7 (343) 374-00-70.
E-mail: ig-danilova@yandex.ru

Образец цитирования:

И.Г. Данилова, В.В. Емельянов, И.Ф. Гетте,
С.Ю. Медведева, Т.С. Булавинцева, М.В. Черешнева,
Л.П. Сидорова, В.А. Черешнев, К.В. Соколова
«Цитокиновая регуляция регенераторных процессов
в поджелудочной железе при аллоксановом сахарном
диабете у крыс и его коррекции соединением ряда
1,3,4-тиадиазина и липоевой кислотой» // Медицинская
иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 35-44.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-35-44

© Данилова И.Г. и соавт., 2018

For citation:

I.G. Danilova, V.V. Emelianov, I.F. Gette, S.Yu. Medvedeva,
T.S. Bulavintseva, M.V. Cheresheva, L.P. Sidorova,
V.A. Chereshnev, K.V. Sokolova "Cytokine regulation of
regenerative processes in pancreatic gland in alloxan-induced
diabetic rats, and it correction by 1,3,4-thiadiazine composition
and lipoic acid", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 35-44.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-35-44

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-35-44

and morphological alterations in pancreas in alloxan-induced diabetes was performed for the first time, using an experimental *in vivo* model. All the tested compounds have been found to correct hyperglycemia and decreased accumulation of glycated blood proteins. The tested L-17 compound belongs to the 1,3,4-thiadiazine series and is able to correct metabolic disorders occurring in alloxan-induced diabetes comparable to activity of LA antioxidant. However, L-17 reduces the cytokine levels to the values of intact animals, that preventing development of systemic inflammatory response which causes damage of target organs in diabetes mellitus.

Keywords: diabetes mellitus, hyperglycemia, inflammation, insulin, cytokines, lipolic acid

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-15-00039.

Введение

Исследование механизмов регуляции регенераторных процессов в панкреатических островках при сахарном диабете (СД) создает базу для разработки перспективных стратегий фармакологической коррекции данной патологии. Известно, что в патогенезе СД 1 типа имеют место воспалительные и аутоиммунные реакции, контролируемые иммунокомпетентными клетками крови и тканей и опосредованные цитокинами [7, 24, 25, 41]. Именно цитокины являются триггерами каскада биологических реакций при этом заболевании. Развивающаяся в результате гибели инсулиноцитов стойкая гипергликемия способствует повсеместному накоплению гликированных белков, в отношении которых также осуществляются аутоиммунные реакции. Гипергликемия приводит к развитию низкоинтенсивного системного хронического воспаления, формированию хронических осложнений СД, таких как микроангиопатии, нефропатия, ретинопатия [1, 18, 42, 45]. Регуляция воспалительных и аутоиммунных реакций иммунокомпетентными клетками осуществляется посредством секреции таких провоспалительных цитокинов, как фактор некроза опухолей-альфа (TNF α), интерлейкин-1 (IL-1) и интерлейкин-6 (IL-6) [17, 35]. Согласно данным литературы, увеличение содержания TNF α в плазме крови наблюдается у пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типа [39, 40], причем увеличение этого показателя коррелирует с уровнем гипергликемии [18]. Отмечают повышенный уровень TNF α также у грызунов с аллоксановым и стрептозотоциновым диабетом [20]. Увеличение содержания TNF α обнаруживают не только в плазме крови и слюне больных СД [26], но также в различных тканях диабетических крыс, в том числе в сетчатке глаза [23]. IL-1 подавляет продукцию инсулина β -клетками и стимулирует их апоптоз [28]. Также IL-1 индуцирует NO-синтазу, вследствие чего в β -клетках возрастает содержание оксида азота, что в конечном итоге приводит β -клетки к гибели [21]. Повышенное содержание IL-6 выявлено у больных СД 1 и СД 2 типа в плазме крови [15, 22], а также в плазме крови мышей с аллоксановым диабетом

[20]. У больных СД 1 типа содержание IL-6 коррелировало с повышением уровня гликированного гемоглобина [26].

Антивоспалительное действие оказывает IL-10 [33]. Данные об изменении содержания IL-10 при СД 1 типа противоречивы, однако известно, что в процессе лечения уровень IL-10, в отличие от уровня других цитокинов, не снижался [20].

Установлено, что гиперпродукция провоспалительных цитокинов может предшествовать клинической манифестации СД у человека, обнаруживаясь еще на стадии нарушенной гликемии натощак, коррелирует с уровнем биомаркеров оксидативного стресса [19] и является предиктором развития СД у предрасположенных лиц [2].

В литературе имеются сообщения об успешном применении при СД противовоспалительных цитокинов, в частности рецепторного антагониста IL-1, показавшего гипогликемическое и гиполипидемическое действие при экспериментальном СД [3] и снижавшего риск развития микроангиопатий [14] и улучшавшего секрецию инсулина у пациентов с СД 2 типа [29].

Таким образом, цитокины в ряде случаев могут стать мишенями для терапевтического воздействия при СД, а уровни цитокинемии обоснованно претендуют на роль биомаркеров для прогнозирования СД и ранней диагностики его осложнений.

В настоящее время интенсивно проводится фармакологический скрининг химических веществ с плеiotропным действием, сочетающих способность корректировать метаболические (оксидативный стресс, неферментативное гликирование белков) и иммунологические нарушения (индукция аутоиммунных реакций, системный воспалительный ответ) при СД. Соединения, блокирующие данные патогенетические механизмы, могут стать потенциальными лекарственными средствами для терапии этого социально значимого заболевания.

В рамках научного поиска в этом направлении мы обратили внимание на ряд производных 1,3,4-тиадиазина, синтезированных на кафедре органической и биомолекулярной химии ХТИ УрФУ под руководством академика РАН О.Н. Чупахина. Как установлено нашими предыдущими исследованиями, эти вещества обладают способ-

ностью ингибировать неферментативное гликирование белков при инкубации бычьего сывороточного альбумина с глюкозой. Производные 1,3,4-тиадиазина обладают выраженными антиоксидантными свойствами, поскольку блокируют окисление аскорбиновой кислоты кислородом воздуха в модельной системе *in vitro* [15, 37]. Нами также была впервые обнаружена способность соединений ряда 1,3,4-тиадиазина корректировать течение аллоксанового СД у крыс, что выражалось в снижении гипергликемии, оксидативного стресса и накопления гликированных белков в крови и органах животных [9, 10, 12], и установлена минимально необходимая продолжительность введения соединения ряда 1,3,4-тиадиазина [11].

Тем не менее механизмы корректирующего влияния соединений ряда 1,3,4-тиадиазина при аллоксановом СД остаются недостаточно изученными. Учитывая роль хронического низкоинтенсивного системного воспаления в патогенезе СД, а также данные о противовоспалительном действии соединения ряда 1,3,4-тиадиазина на моделях экспериментального инфаркта миокарда [36] и панкреонекроза [16], представляет интерес оценить возможность коррекции регенераторных процессов в островковом аппарате поджелудочной железы и цитокинового профиля крови соединением ряда 1,3,4-тиадиазина при аллоксановом СД у крыс.

Липоевая кислота успешно применяется в терапии осложнений СД как препарат, корректирующий метаболические нарушения, инсулинорезистентность, гиперпродукцию провоспалительных цитокинов клетками иммунной системы, что было доказано на различных моделях экспериментальной патологии [34]. Данный факт определил выбор липоевой кислоты в качестве препарата сравнения в настоящем экспериментальном исследовании.

Материалы и методы

Наиболее распространенными экспериментальными моделями СД 1 типа являются модели с использованием аллоксана и стрептозотоцина [13, 20, 31]. Однако аллоксан обладает более низким прямым цитотоксическим эффектом по сравнению со стрептозотоцином, что позволяет более точно определять сроки выбранных метаболических событий и их патофизиологические последствия [13, 31]. Прооксидантное действие аллоксана приводит к генерации активных форм кислорода и является причиной гибели β -клеток островков Лангерганса, которые особенно уязвимы к действию свободных радикалов вследствие низкой активности ферментов антиоксидантной защиты [32]. Аллоксан обладает

высоким сродством к SH-содержащим соединениям и, как следствие, уменьшает содержание глутатиона в клетке. Кроме того, аллоксан ингибирует глюкокиназу, необходимую для секреции инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой [38].

Все эксперименты на животных были одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (г. Екатеринбург, Россия) и выполнены в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС Европейского парламента и Европейского Совета от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.). Животные, используемые в исследовании, были помещены в карантин в виварии и на момент начала эксперимента были клинически здоровы. Все животные содержались в равных условиях (12 часов света / 12 часов темноты), были помещены по 5 животных в клетку, их кормили в соответствии с обычным графиком со свободным доступом к воде.

Эксперименты проводили на 40 крысах-самцах линии Вистар (по 10 крыс в группе). Животные были одного возраста и веса. СД моделировали введением аллоксана по ранее разработанной методике в течение 3 суток в суммарной дозе 300 мг/кг массы животного [6]. Было сформировано 5 групп животных: интактная (1), контрольная с аллоксановым СД (2), опытная с аллоксановым СД и его коррекцией соединением L-17 ряда 1,3,4-тиадиазина (3) и опытная с аллоксановым СД и его коррекцией липоевой кислотой (4). Синтетическое соединение L-17 ряда 1,3,4-тиадиазина и вещество сравнения липоевую кислоту (препарат «Октолипен», Россия) вводили внутримышечно в дозе 40 мг/кг массы животного 3 раза в неделю в течение 4 недель. На 30 сутки животных выводили из эксперимента инъекцией 40 мг/кг пентобарбитала натрия. В плазме крови крыс определяли концентрации глюкозы унифицированным глюкозооксидазным методом набором Витал диагностикс (СПб), в цельной крови — гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) методом колоночной хроматографии наборами «Диабет-тест» (Фосфосорб, Москва). В плазме крови крыс также определяли содержание инсулина методом ИФА наборами реактивов фирмы Millipore Corporation, кортикостерона — наборами фирмы Immunodiagnostic Systems Ltd, интерлейкинов IL-1 α , IL-6, IL-10, IFN γ , TNF α , инсулиноподобного ростового фактора 1 (IGF-1) — наборами фирмы Thermo Scientific на автоматическом анализаторе LAZURITE AUTOMATED ELISA SYSTEM.

Образцы ткани поджелудочной железы отделяли от жировой ткани и погружали в 10% ней-

тральный формалин на 24 часа при комнатной температуре. Подготовку образцов для гистологического исследования осуществляли с использованием автоматического процессора Leica EG 1160 с последующей заливкой в парафин. С серийных срезов толщиной 3–4 мкм удаляли парафин, для этого стекла помещались последовательно в ксилол, в 100% спирт и в растворы с постепенным снижением концентрации спирта до полностью водного раствора [27]. Далее, не давая стеклам высохнуть, каждый первый срез из серии окрашивали гематоксилин-эозином и проводили морфологическое и морфометрическое исследование. Микроскопическое исследование производили на микроскопе Leica DM 2500, анализ изображений выполняли в программе ВидеоТест «Морфология» 5.0. Иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы лабораторных животных проводили по стандартному протоколу с использованием Autostainer DAKO на формалин-фиксированных парафиновых срезах толщиной 3–4 мкм. Демаскировку антигенов осуществляли путем высокотемпературной обработки в цитратном буфере с использованием Pascal DAKO [27]. Визуализацию β -клеток осуществляли с помощью антител к инсулину (clon E11D7, Millipore). Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1:100 и инкубировали в течение 60 минут при 37 °С. Затем осуществляли инкубацию с вторичными biotin goat anti-mouse Igs (multiple adsorption) (BD) в разведении 1:50 и инкубировали в течение 30 минут при 37 °С. Для визуализации антигенреактивных клеток использовали тест-систему Novolink™ Polymer Detection System (Novocastra Lab., Ltd), включающую хромогенный субстрат 3,3-диаминобензидин (DAБ) в забуферном растворе [27]. ДАБ-позитивные клетки идентифицировали по коричневому гранулярному окрашиванию цитоплазмы клеток. Для исключения неспецифического окрашивания проводили постановку негативного и позитивного контроля.

Морфометрические исследования островкового аппарата поджелудочной железы в каждой экспериментальной группе животных включали следующие показатели: подсчет общего количества островков и количества островков, обладающих положительной реакцией на инсулин, в 1 мм² паренхимы поджелудочной железы (N/мм²), диаметра панкреатических островков (μм); общей клеточности островка, количества β -клеток. Определение функциональной активности β -клеток осуществляли в микропрепаратах поджелудочной железы, специфически окрашенных на инсулин, путем оценки интенсивности экспрессии антигена (инсулина) в клетках по их оптической плотности с помощью программы анализа изображения ВидеоТест «Морфология» 5.0.

Статистическая обработка результатов эксперимента проводилась с применением программного комплекса Biostatistica и MS Excel. Для сравнения двух независимых групп по количественному признаку использован непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия между показателями считались статистически значимыми, если уровень значимости p не превышал 0,05.

Результаты

Введение аллоксана, непосредственно повреждающего β -клетки поджелудочной железы, приводило к снижению плазменной концентрации инсулина на 34% с $0,66 \pm 0,19$ до $0,42 \pm 0,06$ нг/мл ($p_{1-2} < 0,05$), наблюдалась тенденция к увеличению концентрации кортикостерона на 23% с $65,8 \pm 7,2$ до $81,0 \pm 13,93$ нг/мл (табл. 1). Абсолютный дефицит инсулина и преобладание эффектов контринсулярных гормонов приводили к выраженной гипергликемии и гликированию гемоглобина (табл. 1). Так, концентрация глюкозы в крови крыс составила $20,0 \pm 1,3$ ммоль/л, а HbA_{1c} — $7,5 \pm 0,8\%$, против $6,4 \pm 0,5$ ммоль/л и $4,3 \pm 0,3\%$ у интактных животных соответственно.

Соединение L-17 существенно изменяло картину метаболических нарушений при формировании аллоксанового СД. Важным моментом его корригирующего действия был антигипергликемический эффект. К окончанию эксперимента гипергликемия в группе СД+L-17 была на 22% ниже, чем в контрольной группе ($p_{2-3} < 0,05$). При этом наблюдалось закономерное снижение концентрации HbA_{1c} до уровней интактных животных (табл. 1), что на 49% ниже ($p_{2-3} < 0,05$), чем в контрольной группе. Соединение L-17 приводило к значимому увеличению уровня инсулина в 2,2 раза по сравнению с показателем диабетических крыс ($p_{2-3} < 0,05$) и в 1,5 раза по сравнению с показателем интактных животных ($p_{1-3} < 0,05$), однако уровень кортикостерона оставался повышенным. Применение соединения сравнения липоевой кислоты позволило существенно снизить уровень гипергликемии и HbA_{1c} по сравнению с показателями крыс при СД ($p_{2-4} < 0,05$). Введение липоевой кислоты оказало выраженный антигипергликемический эффект: концентрации глюкозы и HbA_{1c} в крови снизились до $7,2 \pm 1,5$ ммоль/л и до $4,5 \pm 0,9\%$ соответственно, хотя уровень глюкозы не достиг значения показателя интактных животных. Корригирующий эффект липоевой кислоты мог быть связан с сохранением на уровне интактных крыс концентрации инсулина $0,70 \pm 0,19$ нг/мл ($p_{1-4} > 0,05$), несмотря на остававшуюся повышенной концентрацию кортикостерона — $88 \pm 9,0$ нг/мл ($p_{1-4} > 0,05$).

При гистологическом исследовании поджелудочной железы контрольной группы животных (№ 2) через 30 суток после введения аллоксана были выявлены структурные нарушения со стороны междольковых сосудов и микроциркуляторного русла в виде эндотелиоцитоза, полнокровия и капилляростаза. При оценке островкового аппарата поджелудочной железы в данной группе животных отмечались дистрофические изменения панкреатоцитов в виде кариопикноза и кариолизиса, присутствовали признаки зернистой дистрофии или вакуолизации цитоплазмы.

Гистологическое исследование поджелудочной железы животных с аллоксановым диабетом и введением соединения L-17 (группа 3) показало сохранение структурных нарушений сосудов микроциркуляции в органе. Однако в панкреатических островках обнаруживались единичные клетки с кариопикнозом и лизисом ядер. Введение липоевой кислоты крысам с аллоксановым диабетом (группа 4) уменьшало выраженность деструктивных изменений в эндокринной части, микроциркуляции органа и предотвращало развитие нарушений кровообращения в сосудах.

В поджелудочной железе животных с введением L-17 на фоне развития аллоксанового СД отмечалось значительное снижение общего количества панкреатических островков относительно этого показателя в интактной и контрольной группах (табл. 2). Вместе с этим выявлено увеличение общего количества клеток в островках относительно показателя интактной группы и животных с аллоксановым СД, количество β -клеток соответствовало их уровню у животных с аллоксановым СД (табл. 2).

Количество панкреатических островков у животных с введением липоевой кислоты на фоне развития аллоксанового диабета соответствовало уровню показателя у животных с аллоксановым диабетом. Панкреатические островки характеризовались увеличенными размерами относительно островков интактных животных и животных после введения ЛК, при этом количество сохранных β -клеток было больше в 2 раза относительно показателя животных с аллоксановым диабетом (табл. 2).

Согласно данным литературы, гипергликемия при СД служит триггером продукции провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками [19]. В нашем исследовании это выражалось в увеличении содержания IL-1 α с $318 \pm 9,7$ до $359 \pm 13,6$ пг/мл и IL-6 с $409,3 \pm 10,0$ до $532,0 \pm 36,5$ пг/мл ($p_{1-2} < 0,05$) и компенсаторном увеличении концентрации IL-10 с $27,0 \pm 3,0$ до $99,4 \pm 1,1$ пг/мл ($p_{1-2} < 0,05$) у крыс с СД по сравнению с показателями интактных животных. Уровни TNF α , IGF-1 практически не изменялись.

Введение соединения L-17 приводило к существенному снижению плазменных концентраций IL-1 α , IL-6, IL-10, тогда как содержание IGF-1 превышало значения, характерные для интактной и контрольной группы. Введение липоевой кислоты при аллоксановом СД у крыс корректировало уровни цитокинемии, снижая содержание провоспалительных IL-1 α до $260,9 \pm 26,6$ пг/мл и IL-6 до $451,0 \pm 14,8$ пг/мл и, в отличие от соединения L-17, еще более увеличивая концентрацию противовоспалительного IL-10 до $115,6 \pm 13,6$ пг/мл ($p_{2-4} < 0,05$, $p_{1-4} > 0,05$).

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ГЛЮКОЗЫ, ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА, ИНСУЛИНА И КОРТИКОСТЕРОНА В КРОВИ ЖИВОТНЫХ

TABLE 1. CONTENTS OF GLUCOSE, GLYCATED HEMOGLOBIN, INSULIN AND CORTICOSTERONE IN BLOOD OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Группа Group	Интактная группа Intact group	СД Diabetes mellitus	СД + L-17 Diabetes mellitus + L-17	СД + липоевая кислота Diabetes mellitus + lipoic acid
	1	2	3	4
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/l	$6,4 \pm 0,5$	$20,1 \pm 1,3^*$	$15,6 \pm 3,4^* **$	$7,2 \pm 1,5^* **$
HbA _{1c} , %	$4,3 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,8^*$	$3,8 \pm 0,8^{**}$	$4,5 \pm 0,9^{**}$
Инсулин, нг/мл Insulin, ng/ml	$0,66 \pm 0,19$	$0,42 \pm 0,06^*$	$0,94 \pm 0,50^{**}$	$0,70 \pm 0,19^{**}$
Кортикостерон, нг/мл Corticosterone, ng/ml	$65,8 \pm 7,28$	$81,0 \pm 13,93$	$97,6 \pm 10,55$	$88 \pm 9,0$

Примечание. * – достоверные отличия с интактной группой; $p < 0,05$; ** – достоверные отличия от группы СД, $p < 0,05$.

Note. *, significant differences with intact group, $p < 0.05$; **, significant differences against the diabetes group, $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. МОРФОМЕТРИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 2. MORPHOMETRIC DATA FOR PANCREATIC GLANDS FROM EXPERIMENTAL ANIMALS

Группа Group	Интактная группа Intact group	СД Diabetes mellitus	СД + L-17 Diabetes mellitus + L-17	СД + липоевая кислота Diabetes mellitus + lipoic acid
	1	2	3	4
Количество ПО/мм ² Паренхимы Number of PIs per mm ² of parenchyma	1,77±0,15	1,38±0,23	0,41±0,06* **	0,81±0,12*
Диаметр ПО, мкм Mean diameter of PIs, μm	80,2±6,8	120,2±12,5*	90,2±7,4	106,5±5,1*
Общая клеточность ПО/мм ² ПО Total PI cellularity/mm ²	9 874±954	9 929±412	16950±3180* **	10026±501
Количество β-клеток/мм ² ПО Number of the β-cells per one PI/mm ²	6683±354	2966±706*	1582±148*	4776±449* **
Доля β-клеток, % Proportion of β cells, %	69,0±3,9	29,9±7,5*	11,6±1,5*	48,2±4,8* **

Примечание. См. примечание к таблице 1. ПО – панкреатический островок.

Note. As in Table 1. PI, pancreatic islet.

Обсуждение

Увеличение уровня цитокинов IL-6 и IL-1α в плазме крови крыс с аллоксановым СД является закономерным явлением, отражающим развитие воспалительного процесса в островковой части поджелудочной железы крыс [24]. Запуск воспалительного процесса вызывает введение аллоксана, который, как известно, обладает направленным токсическим действием в отношении инсулиноцитов [30]. Согласно данным литературы, деструктивные процессы в панкреатических островках инициируют миграцию макрофагов, которые осуществляют фагоцитоз и презентацию β-клеточных антигенов Naïve CD4⁺T-лимфоцитам, в результате инициируя аутоиммунную реакцию против β-клеток [42]. Более того, макрофаги способны секретировать TNFα, IL-1, IL-6 и активные формы кислорода, способствующие деструкции β-клеток [7, 41]. Данные морфометрического анализа, снижение содержания инсулина в плазме крови и выраженная гипергликемия у диабетических крыс контрольной группы являются подтверждением убыли инсулиноцитов. В процессе развития аллоксанового диабета воспалительные реакции становятся системными, поскольку происходит повсеместное накопление гликированных белков [1, 41]. Отражением этого процесса является обнаруженное в данном исследовании увеличение количества гликозилированного гемоглобина на 30 сутки исследования. Применение соединения L-17 позволило существенно скорректировать показатели нарушенного метаболизма и его

иммуно-эндокринной регуляции при развитии аллоксанового СД у крыс. Введение L-17 оказало выраженный антигипергликемический эффект, предотвращало разрушение островков Лангерганса и увеличивало их клеточность.

Интересным механизмом действия соединения L-17 явилась способность корректировать уровень цитокинемии, снижая их системное действие на органы-мишени диабетического повреждения. Увеличение уровня IGF-1 в плазме крови при применении L-17 вносит положительный вклад в антигипергликемический механизм действия препарата. Увеличение содержания IGF-1 у крыс, подвергавшихся воздействию L-17, соответствует увеличению уровня инсулина и снижению уровня глюкозы и гликированного гемоглобина. Известно, что IGF-1 является посредником действия соматотропного гормона и обеспечивает регуляцию анаболических эффектов этого гормона и может также, соединяясь с рецепторами инсулина, оказывать влияние на утилизацию глюкозы [5, 13]. На экспериментальных моделях СД 1 типа было установлено, что IGF-1 предотвращает апоптоз инсулиноцитов и способствует их пролиферации [43, 44].

Известно антиоксидантное и антигликирующее действие липоевой кислоты [4, 8]. Поэтому способность липоевой кислоты предотвращать гипoinsулинемию, снижать гипергликемию и накопление HbA_{1c} можно связать с защитой β-клеток островков Лангерганса от гибели в условиях индуцированного аллоксаном оксидативного стресса. Кроме того, в нашем исследовании были

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 3. CYTOKINE CONTENTS IN BLOOD PLASMA OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Группа Group	Интактная группа Intact group	СД Diabetes mellitus	СД + L-17 Diabetes mellitus + L-17	СД + липоевая кислота Diabetes mellitus + lipoic acid
	1	2	3	4
IL-1α (пг/мл) IL-1α (pg/ml)	318,0±9,7	359,3±13,6*	180,7±17,2* **	260,9±26,6**
IL-6 (пг/мл) IL-6 (pg/ml)	409,3±10,0	532,0±36,5*	420,6±11,4* **	451,0±14,8* **
IFNγ (пг/мл) IFNγ (pg/ml)	13,0±1,1	10,2±0,4	8,6±0,5* **	13,1±1,9
TNFα (пг/мл) TNFα (pg/ml)	52,0±0,3	52,7±0,9	51,6±0,2	51,7±0,5
IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/ml)	27,0±3,0	99,4±1,1*	63,5±7,9* **	115,6±13,6* **
IGF-1 (пг/мл) IGF-1 (pg/ml)	7397±85,1	7109,0±96,0	8146,0±152,2* **	7 594,4±71,9

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As in Table 1.

получены доказательства иммуностропного анти-воспалительного действия липоевой кислоты при моделировании аллоксанового СД.

Применение в качестве корректора веществ, обладающих различным механизмом действия, приводило к увеличению количества сохраненных островков и содержания в них β-клеток, что способствовало коррекции метаболических нарушений. Соединение L-17, которое обладает

множественными механизмами действия, также снижало степень повреждения островкового аппарата поджелудочной железы, однако увеличивало клеточность панкреатического островка, более существенно корригировало уровни цитокинемии, увеличивало содержание IGF-1. Эта особенность действия соединения L-17 может обуславливать уникальный механизм его противо-диабетической активности в эксперименте.

Список литературы / References

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений: Руководство для врачей. М.: Медицина, 2005. 512 с. [Balabolkin M.I., Klebanova E.M., Kreminskaya V.M. Treatment of diabetes and its complications: Manual for Physicians]. Moscow: Medicine, 2005. 512 p.
2. Беспалова И.Д., Рязанцева Н.В., Калюжин В.В., Афанасьева Д.С., Мурашев Б.Ю., Осихов И.А. Системное воспаление в патогенезе метаболического синдрома и ассоциированных с ним заболеваний // Сибирский медицинский журнал, 2013. № 2. С. 5-9. [Bespalova I.D., Ryazantseva N.V., Kalyuzhin V.V., Afanasyeva D.S., Myrashev B.Yu., Osikhov I.A. Systemic inflammation in pathogenesis of metabolic syndrome and associated diseases. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2013, no. 2, pp. 5-9. (In Russ.)]
3. Бухтиярова И.П., Дроговоз С.М., Шекина Е.Г., Ищенко А.М. Влияние ралейкина на липидный обмен в условиях модельного диабета // Вестник фармации, 2014. Т. 65, № 3. С. 89-94. [Buhtiyarova I.P., Drogovoz S.M., Shchokina K.G., Ishchenko A.M.. The influence of raleukin on lipid metabolism in the model of diabetes. *Vestnik farmatsii = Bulletin of Pharmacy*, 2014, Vol. 65, pp. 89-94. (In Russ.)]
4. Волчегорский И.А., Мирошниченко И.Ю., Рассохина Л.М., Файзуллин Р.М. Влияние реамберина и α-липоевой кислоты на устойчивость к острой церебральной ишемии при экспериментальном сахарном диабете // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова, 2016. Т. 116, № 6. С. 53-59. [Volchegorsky I.A., Miroshnichenko I.Yu., Rassokhina L.M., Faizullin R.M. Influence of reamberin and α-lipoic acid on resistance to acute cerebral ischemia in experimental diabetes mellitus. *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii imeni S.S. Korsakova = Journal of Neurology and Psychiatry named after S.S. Korsakov*, 2016, Vol. 116, no. 6, pp. 53-59. (In Russ.)]
5. Геннадиник А.Г., Нелаева А.А. Роль инсулиноподобного фактора роста-I в метаболизме, регуляции клеточного обновления и процесса старения // Ожирение и метаболизм, 2010. № 2. С. 10-15. [Gennadinik A.G., Nelaeva A.A. The role of insulin-like growth factor-I in metabolism, regulation of cellular renewal and aging processes. *Ozhirenie i metabolism = Obesity and Metabolism*, 2010, no. 2, pp. 10-15. (In Russ.)]
6. Данилова И.Г., Гетте И.Ф. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент на изобретение №2534411; 27.11.2014. Бюл. № 33. [Danilova I.G., Gette I.F. Bulavintseva T.S. The method of modeling alloxan diabetes. Patent for invention No. 2534411; 27.11.2014. Bulletin No. 33].

7. Дедов И.И., Фадеев В.В. Введение в диабетологию: Руководство для врачей. М.: Берг, 1998. 200 с. [Dedov I.I., Fadeev V.V. Introduction to Diabetology: Manual for Physicians]. Moscow: Berg, 1998. 200 p.
8. Емельянов В.В., Леонтьев Д.В., Ищенко А.В., Булавинцева Т.С., Саватеева Е.А., Данилова И.Г. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов и метаболические нарушения при экспериментальном сахарном диабете и его коррекции липоевой кислотой // Биофизика, 2016. Т. 61, № 5. С. 922-926. [Emelianov V.V., Leontiev D.V., Ishchenko A.V., Bulavintseva T.S., Savateeva E.A., Danilova I.G. Atomic force microscopy of erythrocytes and metabolic disturbances in experimental diabetes mellitus and its correction by lipoic acid. *Biofizika = Biophysics*, 2016, Vol. 61, no. 5, pp. 922-926. (In Russ.)]
9. Емельянов В.В., Саватеева Е.А., Мусальникова А.В., Сидорова Л.П., Перова Н.М., Новикова А.П., Булавинцева Т.С., Гетте И.Ф., Данилова И.Г., Максимова Н.Е., Мочульская Н.Н., Черешнев В.А. Перспективы поиска новых противодиабетических средств среди серосодержащих гетероциклических соединений // Аллергология и иммунология, 2013. Т. 14, № 2. С. 141-142. [Emelianov V.V., Savateeva E.A., Musalnikova A.V., Sidorova L.P., Perova N.M., Novikova A.P., Bulavintseva T.S., Gette I.F., Danilova I.G., Maksimova N.E., Mochulskaia N.N., Chereshev V.A. Prospects for the search for new antidiabetics among sulfur-containing heterocyclic compounds. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2013. Vol. 14, no. 2, pp 141-142. (In Russ.)]
10. Емельянов В.В., Саватеева Е.А., Сидорова Л.П., Цейтлер Т.А., Булавинцева Т.С., Гетте И.Ф., Данилова И.Г., Максимова Н.Е., Мочульская Н.Н., Чупахин О.Н., Черешнев В.А. Коррекция метаболических нарушений при аллоксановом сахарном диабете производными 1,3,4-тиадиазинов // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 2 (1). С. 487-489. [Emelianov V.V., Savateeva E.A., Sidorova L.P., Tseitler T.A., Bulavintseva T.S., Gette I.F., Danilova I.G., Maksimova N.E., Mochulskaia N.N., Chupakhin O.N., Chereshev V.A. Correction of metabolic disorders in alloxan diabetes mellitus with 1,3,4-thiadiazine derivatives. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Immunological Journal*, 2015, Vol. 9 (18), no. 2 (1), pp. 487-489. (In Russ.)]
11. Емельянов В.В., Саватеева Е.А., Сидорова Л.П., Цейтлер Т.А., Гетте И.Ф., Булавинцева Т.С., Смирных С.Е., Максимова Н.Е., Мочульская Н.Н., Чупахин О.Н., Черешнев В.А. 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин корригирует метаболические нарушения при формировании аллоксанового сахарного диабета у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2016. Т. 162, № 7. С. 42-45. [Emelianov V.V., Savateeva E.A., Sidorova L.P., Tseitler T.A., Gette I.F., Bulavintseva T.S., Smirnykh S.E., Maksimova N.E., Mochulskaia N.N., Chupakhin O.N., Chereshev V.A. 2-Morpholino-5phenyl-6H-1,3,4-thiadiazine corrects metabolic disorders during the development of alloxan diabetes mellitus in rats. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016, Vol. 162, no. 7, pp. 42-45. (In Russ.)]
12. Емельянов В.В., Сидорова Л.П., Саватеева Е.А., Булавинцева Т.С., Гетте И.Ф., Максимова Н.Е., Мочульская Н.Н., Черешнев В.А., Чупахин О.Н. Применение соединений класса 1,3,4-тиадиазинов в качестве средства коррекции экспериментального аллоксанового сахарного диабета. Патент RU № 2597764 от 10.07.2016. Приоритет от 16.12.2014. [Emelianov V.V., Sidorova L.P., Savateeva E.A., Bulavintseva T.S., Gette I.F., Maksimova N.E., Mochulskaia N.N., Chereshev V.A., Chupakhin O.N. The use of compounds of the 1,3,4-thiadiazine class as a means of correcting experimental alloxan diabetes. Patent RU No. 2597764 dated July 10, 2016. Priority from 16.12.2014].
13. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Патофизиология. Т. 2. Основы патохимии. СПб.: Элби-СПб., 2001. 687 с. [Zaichik A.Sh., Churilov L.P. Pathophysiology. Vol. 2. Fundamentals of pathochemistry]. St. Petersburg: Elbi-SPb., 2001. 687 p.
14. Насонов Е.Л., Елисеев М.С. Роль интерлейкина 1 в развитии заболеваний человека // Научно-практическая ревматология, 2016. Т. 54, № 1. С. 60-67. [Nasonov E.L., Eliseev M.S. Role of interleukin 1 in the development of human diseases. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2016, Vol. 54, no. 1, pp. 60-77. (In Russ.)]
15. Сидорова Л.П., Цейтлер Т.А., Емельянов В.В., Саватеева Е.А., Максимова Н.Е., Мочульская Н.Н., Черешнев В.А., Чупахин О.Н. 2-Тиоморфолин-5-арил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромиды и их способность ингибировать неферментативное гликозилирование белков // Химико-фармацевтический журнал, 2017. № 51. С. 11-14. [Sidorova L.P., Zeitler T.A., Emelianov V.V., Savateeva E.A., Maksimova N.E., Mochulskaia N.N., Chereshev V.A., Chupakhin O.N. 2-Thiomorpholin-5-aryl-6H-1,3,4-thiadiazine hydrobromides and their ability to inhibit non-enzymatic glycosylation of proteins. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2017, no. 51, pp. 11-14. (In Russ.)]
16. Сарапульцев П.А., Чупахин О.Н., Сарапульцев А.П., Ранцев М.А., Медведева С.Ю., Сидорова Л.П., Данилова И.Г. Влияние соединения из группы замещенных 5R1, 6R2-1,3,4-тиадиазин-2-аминов на течение системного воспаления // Цитокины и воспаление, 2013. Т. 12, № 3. С. 40-44. [Sarapultsev P.A., Chupakhin O.N., Sarapultsev A.P., Rantsev M.A., Medvedeva S.Yu., Sidorova L.P., Danilova I.G. The effects of the compound of the group of substituted 5R1, 6R2-1,3,4-thiadiazine-2-amines on the course of systemic inflammation. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, Vol. 12, no. 3, pp. 40-44. (In Russ.)]
17. Фрейдлин И.С. Иммунная система и ее дефекты: Руководство для врачей. СПб.: НТФ «Полисан», 1998. 113 с. [Freidlin I.S. The immune system and its defects: Manual for Physicians]. St. Petersburg: NTF Polisan, 1998. 113 p.
18. Bianchi E., Ripandelli G., Taurone S., Feher J., Plateroti R., Kovacs I., Magliulo G., Orlando M.P., Micera A., Battaglione E., Artico M. Age and diabetes related changes of the retinal capillaries: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2016, Vol. 29, no. 1, pp. 40-53.
19. Butkowski E.G., Jelinek H.F. Hyperglycaemia, oxidative stress and inflammatory markers. *Redox Rep.*, 2016, pp. 1-8.

20. Chen T., Gao J., Xiang P., Chen Y., Ji J., Xie P., Wu H., Xiao W., Wei Y., Wang S., Lan J., Ji H., Yan T. Protective effect of platycodin D on liver injury in alloxan-induced diabetic mice via regulation of Treg/Th17 balance. *Int. Immunopharmacol.*, 2015, Vol. 26, no. 2, pp. 338-348.
21. Corbett J.A., Kwon G., Turk J., McDaniel M.L. IL-1 beta induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochemistry*, 1993, Vol. 32, no. 50, pp. 13767-13770.
22. Cutando A., Montero J., Gómez-de Diego R., Ferrera M.J., Lopez-Valverde A.. Effect of topical application of melatonin on serum levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in patients with type 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. *J. Clin. Exp. Dent.*, 2015, Vol. 7, no. 5, pp. 628-633.
23. Dennis M.D., Kimball S.R., Fort P.E., Jefferson L.S. Regulated in development and DNA damage 1 is necessary for hyperglycemia-induced vascular endothelial growth factor expression in the retina of diabetic rodents. *J. Biol. Chem.*, 2015, Vol. 290, no. 6, pp. 3865-3874.
24. Donath M.Y., Störling J., Maedler K., Mandrup-Poulsen T. Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2003, Vol. 81, no. 8, pp. 455-470.
25. Heier M., Margeirsdottir H.D., Brunborg C., Hanssen K.F., Dahl-Jørgensen K., Seljeflot I. Inflammation in childhood type 1 diabetes; influence of glycemic control. *Atherosclerosis*, 2015, Vol. 238, no. 1, pp. 33-37.
26. Kuehl M.N., Rodriguez H., Burkhardt B.R., Alman A.C. Tumor necrosis factor- α , matrix-metalloproteinases 8 and 9 Levels in the saliva are associated with increased hemoglobin A1c in type 1 diabetes subjects. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 4, e0125320. doi: 10.1371/journal.pone.0125320.
27. Kumar G.L., Rudbeck L. Education guide. Immunohistochemical (IHC) staining methods. 2009. Dako North America, Carpinteria, California. 160 p.
28. Lagathu C., Yvan-Charvet L., Bastard J.P., Maachi M., Quignard-Boulangé A., Capeau J., Caron M. Long-term treatment with interleukin-1 β induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia*, 2006, no. 49, pp. 2162-2173.
29. Larsen C.M., Faulenbach M., Vaag A., Vølund A., Ehlers J.A., Seifert B., Mandrup-Poulsen T., Donath M.Y. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 2007, Vol. 356, no. 15, pp. 1517-1526.
30. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 2008, no. 51, pp. 216-226.
31. Like A.A., Rossini A.A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*, 1976, no. 193, pp. 415-417.
32. Malaisse W. Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell. *Biochem. Pharmacol.*, 1982, no. 31, pp. 3527-3534.
33. Mollazadeh H., Cicero A.F.G., Blesso C.N., Pirro M., Majeed M., Sahebkar A. Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2017, pp. 1-13.
34. Moura F.A., de Andrade K.Q., dos Santos J.C., Goulart M.O. Lipoic acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2015, Vol. 15, no. 5, pp. 458-483.
35. Nicola N.A. Guidebook to cytokines and their receptors. Oxford; New York: Oxford University Press, 1994. 176 p.
36. Sarapultsev A.P., Chupakhin O.N., Sarapultsev P.A., Rantsev M.A., Medvedeva S.U., Sidorova L.P., Danilova I.G. Effect of a new class of compounds of the group of substituted 5R1, 6H2-1,3,4-thiadiazine-2-amines on the inflammatory and cytokine response in experimental myocardial infarction. *Current Vascular Pharmacology*, 2015, no. 13, pp. 43-53.
37. Sidorova L.P., Tseitler T.A., Perova N.M., Emelianov V.V., Savateeva E.A., Maksimova N.E., Mochulskaya N.N., Chereshev V.A., Chupakhin O.N. Synthesis of new 1,3,4-thiadiazines capable of inhibiting nonenzymatic glycosylation of proteins. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2015, Vol. 49, no. 8, pp. 501-550.
38. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.*, 2001, no. 50, pp. 536-546.
39. Sun M., Yang J., Wang J., Hao T., Jiang D., Bao G., Liu G. TNF- α is upregulated in T2DM patients with fracture and promotes the apoptosis of osteoblast cells *in vitro* in the presence of high glucose. *Cytokine*, 2016, no. 80, pp. 35-42.
40. Tangvarasittichai S., Pongthaisong S., Tangvarasittichai O. Tumor necrosis factor-A, interleukin-6, C-reactive protein levels and insulin resistance associated with type 2 diabetes in abdominal obesity women. *Indian J. Clin. Biochem.*, 2016, Vol. 31, no. 1, pp. 68-74.
41. Wagner D. Type 1 Diabetes – pathogenesis, genetics and immunotherapy. Publisher: InTech, Chapters published, 2011. 670 p.
42. Willcox A., Richardson S.J., Bone A.J., Foulis A.K., Morgan N.G. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.*, 2009, no. 155, pp. 173-181.
43. Withers D.J., Burks D.J., Towery H.H., Altamuro S.L., Flint C.L., White M.F. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulinsignalling. *Nat. Genet.*, 1999, Vol. 23, no. 1, pp. 32-40.
44. Xiao X., Gaffar I., Guo P., Wiersch J., Fischbach S., Peirish L., Song Z., El-Gohary Y., Prasad K., Shiota C., Gittes G.K. M2 macrophages promote beta-cell proliferation by up-regulation of SMAD7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2014, Vol. 111, no. 13, pp. 1211-1220.
45. Zhu T., Meng Q., Ji J., Lou X., Zhang L. Toll-like receptor 4 and tumor necrosis factor-alpha as diagnostic biomarkers for diabetic peripheral neuropathy. *Neurosci. Lett.*, 2015, no. 585, pp. 28-32.

Авторы:

Данилова И.Г. — д.б.н., доцент, заведующая лабораторией морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; заведующая кафедрой медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Емельянов В.В. — к.м.н., доцент кафедры иммунохимии Химико-технологического института, доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики, ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Гетте И.Ф. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; старший научный сотрудник кафедры иммунохимии Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Медведева С.Ю. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Булавинцева Т.С. — младший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; младший научный сотрудник кафедры иммунохимии Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Черешнева М.В. — д.м.н., главный научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Сидорова Л.П. — к.х.н., доцент кафедры органической и биомолекулярной химии Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Черешнев В.А. — д.м.н., профессор, академик, директор ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; заведующий кафедрой иммунохимии Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Соколова К.В. — аспирант кафедры медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Danilova I.G., PhD, MD (Biology), Assistant Professor, Head, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Institute of Natural Sciences, B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Emelianov V.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Immunochimistry, Institute of Chemical Engineering; Assistant Professor, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Institute of Natural Science and Mathematics, B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Gette I.F., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Department of Immunochimistry, Institute of Chemical Engineering, B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Medvedeva S.Yu., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Assistant Professor, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Institute of Natural Sciences, B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Bulavintseva T.S., Junior Research Associate, Associate, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Junior Research Associate, Department of Immunochimistry, Institute of Chemical Engineering, B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Chereshneva M.V., PhD, MD (Medicine), Main Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Sidorova L.P., PhD (Chemistry), Assistant Professor, Department of Organic and Biomolecular Chemistry, Institute of Chemical Engineering, B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Chereshnev V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Department of Immunochimistry, Institute of Chemical Engineering, B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Sokolova K.V., Postgraduate Student, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Institute of Natural Sciences and Mathematics, B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 18.09.2017
Отправлена на доработку 25.09.2017
Принята к печати 10.12.2017

Received 18.09.2017
Revision received 25.09.2017
Accepted 10.12.2017

ЭФФЕКТЫ γ с-ЦИТОКИНОВ (IL-2, IL-7 И IL-15) НА СОЗРЕВАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ CD45RO⁺CD4⁺/ CD8⁺T-ЛИМФОЦИТОВ *IN VITRO*

Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С.

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

Резюме. Исследовано влияние γ с-цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на созревание и дифференцировку цитотоксических и хелперных популяций CD45RO⁺T-клеток в условиях гомеостатического культивирования *in vitro*. Выявлено, что IL-2, IL-7 и IL-15 опосредуют созревание и дифференцировку CD8⁺T-лимфоцитов центральной памяти, пополняя популяцию клеток, обладающих эффекторными функциями. Действие IL-2 на CD4⁺T-клетки центральной памяти сопровождается генерацией клеток эффекторной памяти за счет снижения числа незрелых эффекторов – CD62L-CD27⁺, тогда как IL-7 стимулирует образование незрелых эффекторов – CD62L-CD27⁺. В субпопуляции CD8⁺CD45RO⁺ лимфоцитов IL-2, IL-7 и IL-15 инициируют образование терминально-дифференцированных клеток, обеспечивающих устойчивую иммунологическую память на реинвазию патогена.

Ключевые слова: иммунная память, клетки центральной памяти, клетки эффекторной памяти, терминально-дифференцированные лимфоциты, γ с-цитокины, проточная цитофлюориметрия

EFFECTS OF γ c-CYTOKINES (IL-2, IL-7 AND IL-15) UPON *IN VITRO* MATURATION AND DIFFERENTIATION OF CD4⁺CD45RO⁺/CD8⁺CD45RO⁺ T CELLS

Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Litvinova L.S.

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. Effect of γ c-cytokines (IL-2, IL-7 и IL-15) upon maturation and differentiation of cytotoxic and helper CD45RO⁺ T cell population was studied in the homeostatic *in vitro* culture conditions. We have found that IL-2, IL-7 and IL-15 mediate maturation and differentiation of CD8 T cells central memory, replenishing the population of cells that exhibit effector functions. Action of IL-2 on CD4⁺ central memory T cells is associated with generation of effector memory cells by reducing the number of immature effectors (CD62L-CD27⁺), whereas IL-7 promotes the formation of immature (CD62L-CD27⁺) effectors. IL-2, IL-7 and IL-15 initiate formation of terminally-differentiated cells in a subpopulation of CD8⁺CD45RO⁺ lymphocytes, providing a stable immunological memory to a pathogen reinfestation.

Keywords: immunological memory, central memory T cells, effector memory T cells, terminally differentiated cells, γ c-cytokines, differentiation

Адрес для переписки:

Литвинова Лариса Сергеевна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени И. Канта»
236016, Россия, г. Калининград, ул. Боткина, 3.
Тел.: 8 (4012) 59-55-95 (доб. 6631).
E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Address for correspondence:

Litvinova Larisa S.
Immanuel Kant Baltic Federal University
236016, Russian Federation, Kaliningrad, Botkina str., 3.
Phone: 7 (4012) 59-55-95 (acc. 6631).
E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Образец цитирования:

К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова, Н.М. Тодосенко,
Л.С. Литвинова «Эффекты γ -цитокинов (IL-2, IL-7
и IL-15) на созревание и дифференцировку CD45RO⁺CD4⁺/
CD8⁺T-лимфоцитов *in vitro*» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 1. С. 45-52.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-45-52
© Юрова К.А. и соавт., 2018

For citation:

K.A. Yurova, O.G. Khaziakhmatova, N.M. Todosenko,
L.S. Litvinova "Effects of γ -cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15)
upon *in vitro* maturation and differentiation of CD4⁺CD45RO⁺/
CD8⁺CD45RO⁺ T cells", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 1,
pp. 45-52. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-45-52
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-45-52

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности («дорожной карты») и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/6.7» Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Введение

Способность адаптивной иммунной системы реагировать на патогены различной природы требует постоянного присутствия Т-лимфоцитов иммунной памяти. В зависимости от рецепторного репертуара и функциональной активности, выделяют популяции Т-клеток центральной (T_{CM}), эффекторной (T_{EM}) памяти и пул терминально-дифференцированных лимфоцитов (T_{EMRA}) [5, 6, 37, 39]. T_{CM} экспрессируют на своей поверхности молекулы костимуляции CD27, CD28 и маркеры, определяющие их миграцию во вторичные лимфоидные органы — L-селектин (CD62L) и CCR7 [1, 3, 24, 32, 42]; имеют повышенный пролиферативный потенциал, способность к самообновлению и более длинные теломеры в сравнении с T_{EM} [29]. Для T_{CM} характерна высокая экспрессия антиапоптотических генов, в частности STAT5a, и более низкие уровни проапоптотического белка Vim [34]. Популяции T_{EM} являются гетерогенными по экспрессии CD62L и CD27, мигрируют преимущественно в нелимфоидные ткани и воспаленные участки [24, 32, 42] и содержат в цитоплазме большое количество перфорина, что обеспечивает их высокую цитотоксическую активность и выраженную способностью к немедленной эффекторной функции [42]. Потеря CD27 в процессе клональной экспансии и дифференцировки приводит к появлению Т-клеток с более полным набором эффекторных функций [35].

Согласно современным представлениям, T_{EM} необходимы при реинфекции для немедленной защиты от патогенной инвазии на периферии, осуществляя быструю элиминацию антигена [3], тогда как T_{CM} обеспечивают защиту от системных воздействий, активируясь дендритными клетками во вторичных лимфоидных органах, генерируя антигенспецифический клон эффекторов, способных полностью элиминировать патоген [24, 32, 34, 42]. Существуют данные, что при повторном контакте с антигеном T_{CM} могут пополнять пул T_{EMRA} — наиболее дифференцированной субпопуляции Т-лимфоцитов. T_{EMRA} инфильтрируют периферические ткани, обеспечивая клиренс патогена [1]. В современной литературе вопрос об этапности дифференцировки Т-лимфоцитов до конца не изучен. Рассматривается несколько моделей формирования клеток памяти из «наивных» предшественников [2, 7, 9, 10, 25, 31, 36]. Так, в модели независимой дифференцировки

предполагается, что T_{CM} и T_{EM} могут возникать независимо друг от друга, на основе стохастического прайминга наивных Т-лимфоцитов или в зависимости от условий их стимуляции [10]. Однако исследования Willinger T. и соавт. (2005) убедительно демонстрируют дихотомию между $CD8^+T_{CM}$ и T_{EM}/T_{EMRA} клетками на молекулярном уровне и предполагают, что T_{CM} человека представляют собой промежуточное состояние между лимфоцитами с наивным фенотипом и T_{EM}/T_{EMRA} клетками [41]. В научной периодике встречается большое количество работ, акцентированных на разнице условий для активации и клональной экспансии CD4 и CD8 Т-клеток памяти [4, 16], которые в естественных условиях (*in vivo*) находятся под жестким цитокиновым контролем [17, 38]. Однако данные, касающиеся участия цитокинов семейства I типа, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), в процессе дифференцировки лимфоцитов иммунной памяти, ограничены и крайне противоречивы [19].

В связи с вышесказанным **целью настоящего исследования** стал анализ действия $\gamma\delta$ -цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) на созревание и дифференцировку $CD45RO^+CD4^+/CD45RO^+CD8^+$ Т-клеток, ассоциированных с изменением фенотипа, в гомеостатической модели культивирования *in vitro*.

Материалы и методы

Исследование проводилось согласно протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. и Хельсинской декларации ВМА 2000 г. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете БФУ им. И. Канта (г. Калининград) № 5 от 05.11.2013.

Материалом для исследования служили мононуклеарные клетки (МНК) периферической венозной крови 58 условно здоровых доноров (29 мужчин и 29 женщин в возрасте от 22 до 35 лет). Выделение МНК осуществляли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин (Pharmacia, Швеция) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Для выделения фракции $CD45RO^+$ Т-клеток использовали метод иммуномагнитной сепарации, в основе которого лежит технология MACS® (Miltenyi Biotec, Германия), основанная на использовании суперпарамагнитных частиц MACS MicroBeads, конъюгированных с высокоспецифичными моноклональными антителами (МАТ).

Для сепарации были использованы МАТ $CD45RO^+$ с магнитными частицами (MicroBeads human, Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Отсутствие В-лимфоцитов ($CD19^+$) и моноцитов ($CD14^+$) в культурах $CD45RO^+$ клеток до и после куль-

тивирования было подтверждено с помощью проточной цитометрии с использованием МАТ, конъюгированных с FITC (CD3), PE (CD14) (Abcam, Великобритания), с конъюгатом PE с цианином (PE-Cy7) (CD45RO) или с пиридинхлорофиллом (PerCP) (CD19) (e-Bioscience, США). Анализ поверхностных маркеров был проведен на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия), согласно протоколам производителей. В работе были использованы культуры клеток, содержание в которых CD3⁺CD45RO⁺CD14⁻CD19⁻ лимфоцитов составляло в среднем 98,5±1,5%.

Для реализации поставленной цели нами была использована гомеостатическая модель культивирования, предполагающая создание *in vitro* условий гомеостатического влияния рекомбинантных форм γ с-цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на CD45RO⁺Т-лимфоциты.

CD45RO⁺ лимфоциты (1×10^6 кл/мл) культивировали в 48-луночных планшетах в бессывороточной среде Искова (Sigma, США), содержащей 0,5% сывороточного альбумина человека («Микроген», Россия), 5×10^{-5} М β -меркаптоэтанола (Acros Organics, США) и 30 мкг/мл гентамицина, в присутствии рекомбинантных форм цитокинов – IL-2, IL-7, IL-15 (Miltenyi Biotec, Германия) в разных концентрациях или без них (контроль) в течение 48 ч при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Были использованы следующие варианты культивирования: 1) контрольная проба (без добавления цитокинов); 2) пробы с добавлением rIL-2 (0,1 нг/мл; 0,5 нг/мл; 1,0 нг/мл); 3) пробы с добавлением rIL-7 (0,1 нг/мл; 0,5 нг/мл; 1,0 нг/мл); 4) пробы с добавлением rIL-15 (0,1 нг/мл; 0,5 нг/мл; 1,0 нг/мл).

Регистрацию жизнеспособности и подсчет числа клеток по истечению срока инкубации в исследуемых клеточных культурах проводили методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре Guava EasyCite Plus (Millipore, США) с использованием программы Guava ViaCount (Millipore, США), согласно протоколу производителя. Жизнеспособность составляла 95-98% от общего числа клеток.

Количество CD45RO⁺ лимфоцитов, экспрессирующих молекулы дифференцировки (CD3⁺, CD45RO⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD62L⁺, CD27⁺), определяли с помощью метода проточной лазерной двухцветной цитометрии с использованием коктейля МАТ, конъюгированных с аллофикоцианином (APC) (CD45RO), Viablue (CD3), FITC (CD4) (Miltenyi Biotec, Германия); PE (CD62L), с конъюгатом PerCP с цианином (Cy5.5) (CD8), PE-Cy7 (CD27) (Abcam, Великобритания), согласно протоколу производителя. Регистрацию

результатов проводили на проточном цитометре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия).

Полученные данные оценивали с использованием пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 2.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Для анализа имеющихся выборок была использована гипотеза нормальности распределения (Колмогорова–Смирнова). Полученные данные не подчинялись нормальному закону распределения, для них рассчитывали медиану (М) и квартили (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Статистически значимых гендерных различий обнаружено не было. Сравнительный анализ проводился с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями был проведен корреляционный анализ Спирмена. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

После окончания времени инкубации (48 ч) число Т_{СМ} (CD4⁺CD62L⁺CD27⁺) в интактных культурах CD4⁺CD45RO⁺Т-клеток составило 54,12 (49,02–58,66) %. Количество незрелых эффекторных клеток CD62L⁻CD27⁺ и зрелых эффекторов CD62L⁻CD27⁻ (Т_{ЕМ}) было равным 10,36 (8,07–13,26) и 18,47 (18,28–20,16) % соответственно. Также в популяции CD4⁺CD45RO⁺Т-клеток нами была обнаружена минорная популяция CD62L⁺CD27⁻, которая предположительно представляет собой индуцируемую *in vitro* переходную форму между Т_{СМ} и Т_{ЕМ} лимфоцитами, составляющую 13,38 (11,51–15,98) % (табл. 1).

Не менее интересным было субпопуляционное распределение цитотоксических CD45RO⁺Т-клеток. Количество Т_{СМ} (CD62L⁺CD27⁺) в интактных пробах было равным 21,19 (20,76–27,24) %, что оказалось в 2 раза меньше числа Т-клеток с аналогичным фенотипом в CD4⁺CD45RO⁺ популяции; содержание зрелых эффекторных клеток CD62L⁻CD27⁻ (Т_{ЕМ}) составило 34,09 (24,51–39,48) %, а незрелых эффекторов CD62L⁻CD27⁺ – 31,90 (30,51–42,48) % (табл. 2). Как и в популяции хелперных Т-клеток, нами были обнаружены Т-клетки с фенотипом CD62L⁺CD27⁻.

Установлено, что Т-клетки памяти в естественных условиях (*in vivo*) поддерживают свое численное постоянство за счет гомеостатической пролиферации, опосредованной действием γ с-цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) [17, 27].

При этом цитокины могут проявлять разнонаправленные эффекты на Т-лимфоциты, в зависимости от дифференцировки клеток и их функциональной активности [17, 19, 27]. Эти данные позволяют предположить, что для поддержания гомеостаза и функциональной активности

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ CD4⁺Т-КЛЕТОК (%) В КУЛЬТУРАХ CD45RO⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МЕМБРАННЫЕ МОЛЕКУЛЫ CD62L И CD27, АССОЦИИРОВАННЫЕ СО СТЕПЕНЬЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-КЛЕТОК, В УСЛОВИЯХ ИНКУБАЦИИ С γ С-ЦИТОКИНАМИ (IL-2, IL-7 И IL-15) В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})
TABLE 1. PERCENTAGE OF CD4⁺ T CELLS (%) IN CULTURES OF CD45RO⁺ T LYMPHOCYTES EXPRESSING MEMBRANE MOLECULES CD62L AND CD27 ASSOCIATED WITH THE DEGREE OF T CELL DIFFERENTIATION INDUCED BY *IN VITRO* ADDITION OF γ C-CYTOKINES (IL-2, IL-7 AND IL-15), Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Варианты культивирования Variants of cultivation	CD45RO ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺			
	CD62L ⁻ CD27 ⁻	CD62L ⁻ CD27 ⁺	CD62L ⁺ CD27 ⁺	CD62L ⁺ CD27 ⁻
Контрольная проба Control samples	18,47 (18,28-20,16)	10,36 (8,07-13,26)	54,12 (49,02-58,66)	13,38 (11,51-15,98)
IL-2 (0,1 нг/мл) (0.1 ng/ml)	15,80 (13,95-21,62)	11,06 (7,25-14,87)	57,09 (48,78-64,51)	14,40 (11,49-15,69)
IL-2 (0,5 нг/мл) (0.5 ng/ml)	17,23 (14,88-21,15)	10,11 (8,12-13,40)	58,61 (48,50-63,39)	12,72 (12,29-13,85)
IL-2 (1,0 нг/мл) (1.0 ng/ml)	26,32 (21,62-28,55) p ₀ < 0,05	5,97 (3,22-6,55) p ₀ < 0,05	50,93 (48,62-51,87)	13,40 (12,43-14,81)
IL-7 (0,1 нг/мл) (0.1 ng/ml)	18,75 (17,91-19,72)	10,92 (8,42-14,36)	54,67 (48,01-60,33)	13,36 (10,09-15,20)
IL-7 (0,5 нг/мл) (0.5 ng/ml)	18,94 (16,89-19,68)	9,85 (7,07-12,82)	56,61 (50,22-62,24)	12,45 (12,30-13,78)
IL-7 (1,0 нг/мл) (1.0 ng/ml)	17,25 (15,52-18,61)	11,36 (7,45-12,14) p ₀ < 0,05	47,71 (45,08-51,50) p ₀ < 0,05	12,37 (10,50-15,29)
IL-15 (0,1 нг/мл) (0.1 ng/ml)	20,51 (18,37-21,13)	10,69 (6,94-12,95)	53,28 (48,21-58,56)	13,86 (11,73-14,53)
IL-15 (0,5 нг/мл) (0.5 ng/ml)	18,97 (16,75-20,67)	11,62 (6,54-12,12)	54,19 (48,16-61,62)	13,69 (12,23-14,74)
IL-15 (1,0 нг/мл) (1.0 ng/ml)	19,80 (15,40-20,91)	10,31 (8,37-12,74)	55,46 (49,03-62,70)	13,53 (13,31-14,14)

Примечание. p₀ – достоверность различий по сравнению с контрольной пробой.

Note. p₀, significance of differences in comparison with the control sample.

CD4⁺/CD8⁺T_{CM}⁻ и T_{EM}-лимфоцитов требуются разные стимулы [19].

IL-2 принимает участие во многих аспектах Т-клеточного гомеостаза, являясь мощным активатором пролиферации всех субпопуляций Т-клеток и способствуя дифференцировке цитотоксических лимфоцитов и регуляторных Т-клеток [4]. Полученные нами данные свидетельствуют о способности IL-2 (1,0 нг/мл) повышать число зрелых эффекторных CD4⁺CD45RO⁺/CD8⁺CD45RO⁺Т-клеток на фоне снижения числа незрелых эффекторов CD62L⁻CD27⁺ и лимфоцитов центральной памяти CD62L⁺CD27⁺ (табл. 1, 2). Аналогичное действие на цитотоксические Т_{CM} лимфоциты оказывал IL-15 (1,0 нг/мл) (табл. 2).

IL-15, имея аналогичные β- (CD122) и γ- (CD132) цепи, во многом обладает биологическими функциями, свойственными IL-2. Особенности действия цитокинов обусловлены наличием специфических α-субъединиц в составе рецепторных комплексов и гетерогенной экспрессией всех компонентов рецепторов на разных типах клеток [13]. Ма А. и коллегами (2006) были получены приоритетные данные о важности IL-15 в гомеостазе CD8⁺Т-клеток памяти, в отличие от наивных CD8⁺ лимфоцитов и CD4⁺Т-клеток памяти, что, вероятно, обусловлено высокой экспрессией β-цепи, которая имеет положительную корреляцию с чувствительностью лимфоцитов к действию IL-15 [28]. Кроме того, установлено,

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ CD8⁺Т-КЛЕТОК (%) В КУЛЬТУРАХ CD45RO⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ИНКУБАЦИИ С γ с-ЦИТОКИНАМИ (IL-2, IL-7 И IL-15) В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. PERCENTAGE OF CD8⁺ T CELLS (%) IN CULTURES OF CD45RO⁺ T LYMPHOCYTES WITH *IN VITRO* ADDED γ с-CYTOKINES (IL-2, IL-7 AND IL-15), Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Варианты культивирования Variants of cultivation	CD45RO ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺			
	CD62L ⁻ CD27 ⁻	CD62L ⁻ CD27 ⁺	CD62L ⁺ CD27 ⁺	CD62L ⁺ CD27 ⁻
Контрольная проба Control sample	34,09 (24,51-39,48)	31,90 (30,51-42,48)	21,19 (20,76-27,24)	13,38 (11,51-15,98)
IL-2 (0,1 нг/мл) (0.1 ng/ml)	32,64 (25,35-36,80)	29,45 (23,39-33,20)	18,60 (17,89-23,60)	12,47 (6,29-13,75)
IL-2 (0,5 нг/мл) (0.5 ng/ml)	31,77 (25,76-41,40)	27,84 (24,59-32,31)	19,56 (17,12-27,63)	11,24 (8,12-13,22)
IL-2 (1,0 нг/мл) (1.0 ng/ml)	45,63 (42,10-51,51) $p_0 < 0,05$	20,01 (16,66-28,29) $p_0 < 0,05$	17,58 (14,10-18,69) $p_0 < 0,05$	11,15 (8,23-16,73)
IL-7 (0,1 нг/мл) (0.1 ng/ml)	36,75 (28,96-44,82)	31,08 (26,27-36,28)	19,63 (14,05-29,96)	13,50 (12,57-14,12)
IL-7 (0,5 нг/мл) (0.5 ng/ml)	33,58 (31,61-41,86)	29,73 (28,00-33,85)	20,65 (18,29-28,32)	15,72 (13,86-16,57)
IL-7 (1,0 нг/мл) (1.0 ng/ml)	42,80 (36,38-50,98) $p_0 < 0,05$	22,04 (20,50-26,70) $p_0 < 0,05$	15,74 (14,55-19,64) $p_0 < 0,05$	7,97 (4,80-9,98)
IL-15 (0,1 нг/мл) (0.1 ng/ml)	35,76 (23,40-43,99)	31,80 (28,22-36,15)	18,21 (15,77-27,65)	12,97 (9,15-14,29)
IL-15 (0,5 нг/мл) (0.5 ng/ml)	31,85 (25,33-39,43)	32,98 (27,29-37,81)	19,21 (16,00-25,58)	14,83 (12,63-16,74)
IL-15 (1,0 нг/мл) (1.0 ng/ml)	44,37 (36,51-51,55) $p_0 < 0,05$	23,49 (17,26-32,37) $p_0 < 0,05$	15,84 (13,01-27,13) $p_0 < 0,05$	13,53 (10,73-17,73)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As in Table 1.

что цитотоксические Т-лимфоциты не нуждаются в экспрессии IL-15 α и могут отвечать на IL-15 только CD122⁺ и CD132⁺ [11]. Выявленные нами закономерности согласуются с данными зарубежных авторов. Исследования, проведенные Lanzavecchia A. (2002) и Bouneaud C. (2005), убедительно доказали, что в отсутствие повторного антигенного стимула Т_{CM} могут дифференцироваться в Т_{EM} в присутствии IL-15 для пополнения пула эффекторных клеток [10, 23].

Анализ корреляционных взаимосвязей между содержанием Т-лимфоцитов центральной памяти, а также зрелых и незрелых клеток эффекторной памяти при действии исследуемых концентраций γ с-цитокинов показал, что наибольший коэффициент корреляции связывает показатели содержания CD4⁺CD62L⁻CD27⁻ (Т_{EM}) лимфоци-

тов и число незрелых эффекторов – CD4⁺CD62L⁻CD27⁺ при действии IL-2 (1,0 нг/мл) ($r = -0,80$, $p < 0,05$).

В CD8⁺CD45RO⁺ популяции IL-2 и IL-15 (1,0 нг/мл) способствовали повышению числа клеток эффекторной памяти за счет снижения количества CD62L⁺CD27⁺ (Т_{CM}) Т-лимфоцитов ($r = -0,70$ и $r = -0,65$, $p < 0,05$ при действии IL-2 и IL-15 (1,0 нг/мл) соответственно); а также уменьшения содержания незрелых эффекторов CD62L⁻CD27⁺ ($r = -0,56$ и $r = -0,70$, $p < 0,05$ при действии IL-2 и IL-15 [1,0 нг/мл] соответственно).

CD4⁺CD45RO⁺Т-клетки оказались нечувствительными к действию IL-15, что может быть связано с низкой поверхностной экспрессией CD122⁺ на мембране CD4⁺Т-клеток [18, 20, 33, 38]. Учитывая тот факт, что CD4⁺Т-клетки явля-

ются основными продуцентами IL-2 [4], отсутствие их ответа на экзогенный IL-15 может быть обусловлено конкуренцией между IL-2 и IL-15 за связывание с рецепторами IL-2/IL-15R β и общей γ -цепью [20].

IL-7 (1,0 нг/мл) в популяции CD4⁺CD45RO⁺T-клеток повышал содержание незрелых T_{EM} (табл. 1), тогда как в популяции CD8⁺CD45RO⁺ клеток IL-7 (1,0 нг/мл) инициировал генерацию зрелых T_{EM} на фоне снижения незрелых T_{EM} и T_{CM} (табл. 2).

Существуют убедительные доказательства, что гомеостаз и выживание CD8⁺T-клеток памяти зависят от IL-7-сигналов и могут быть опосредованы через антиапоптотические молекулы Bcl-2 или MCL-1 [21, 30]. Согласно данным научной периодики, IL-7 может способствовать дифференцировке лимфоцитов центральной памяти в клетки эффекторной памяти даже в отсутствие антигенного стимула [10].

Следует отметить тот факт, что гомеостатическая пролиферация CD8⁺ лимфоцитов контролируется несколькими цитокинами: IL-15 может компенсировать отсутствие IL-7 и наоборот. Таким образом, IL-15 и IL-7 являются функционально взаимозаменяемыми и при отсутствии одного из цитокинов любой из них способен индуцировать пролиферацию CD8⁺T-лимфоцитов памяти [20, 33, 38].

Нами были получены приоритетные данные о влиянии γ с-цитокинов на образование терминально-дифференцированных эффекторов в условиях культивирования *in vitro*. Так, аппликация IL-2, IL-7 и IL-15 (1,0 нг/мл) в культуры CD8⁺CD45RO⁺T-клеток способствовала повышению содержания лимфоцитов с фенотипом T_{EMRA} CD45RO-CD62L-CD27⁻, за счет снижения количества T-клеток центральной памяти. Этот тезис был подтвержден выявленной сильной корреляционной связью CD45RO⁺CD62L⁺CD27⁺T-лимфоцитов и CD45RO-CD62L-CD27⁻ клеток ($r = -0,83$, $p < 0,05$ при действии IL-2 [1,0 нг/мл]).

Добавление IL-7 (1,0 нг/мл) в культуры CD4⁺CD45RO⁺T-лимфоцитов индуцировало образование незрелых T_{EMRA} T-хелперов CD45RO-CD62L-CD27⁺, преимущественно за счет снижения числа T-клеток с фенотипом центральной памяти, что было подтверждено корреляционной зависимостью между числом CD45RO-CD62L-CD27⁺ и CD45RO⁺CD62L⁺CD27⁺ лимфоцитов ($r = -0,58$, $p < 0,05$).

T_{EMRA} лимфоциты обладают низкой пролиферативной активностью, характеризуются потерей костимулирующих рецепторов CD28, CD27, CCR7, усиленной восприимчивостью к апоптозу, высоким цитотоксическим потенциалом, ассоциированным с повышенным уровнем экспрес-

сии FasL, перфорина и гранзима B, а также продукцией провоспалительных медиаторов (IFN γ и TNF α) [14, 15, 40].

Большинство исследователей сходятся во мнении, что T_{EMRA} клетки не могут быть получены с помощью антигенной стимуляции, клетки с фенотипом, соответствующим T_{EMRA}, генерируются преимущественно за счет субпопуляции T_{CM} при цитокиновой стимуляции [18, 37].

Ряд проведенных исследований убедительно доказали, что интенсивное и постоянное воздействие IL-2 способствует образованию CD8⁺T_{EMRA} [22]. Группой зарубежных авторов было установлено, что CD8⁺T-клетки, повторно экспрессирующие молекулу CD45RA, дифференцируются из T_{CM} — CD8⁺CD45RA-CCR7⁺ в присутствии IL-7 и IL-15 в отсутствие антигенного стимула, вероятно, за счет гомеостатической пролиферации CD45RA-CCR7⁺ прекурсоров, в связи с повышенной гибелью CD45R⁺CCR7⁻ клеток и их низкой способностью к рециркуляции в организме [18]. Вызывают интерес результаты, полученные Libri V. (2011), в которых экспериментально продемонстрировано, что IL-7 индуцирует реэкспрессию молекулы CD45RA в популяциях хелперных T-клеток с центральным фенотипом. Подобным действием на CD4⁺ лимфоциты, в меньшей степени, чем IL-7, обладали IL-2 и IL-15 [26]. Предполагают, что *in vivo* клетки ре-экспрессирующие молекулу CD45RA обеспечивают устойчивую иммунную память против антигенов, которые элиминированы из организма [8, 12]. В соответствии с этой точкой зрения, клетки, реэкспрессирующие молекулу CD45RA, представляют собой популяцию покоящихся T-клеток памяти, которые могут быть повторно активированы для выполнения эффекторных функций [14].

Таким образом, проведенное исследование позволило доказать, что γ с-цитокины (IL-2, IL-7 и IL-15) в гомеостатической модели *in vitro* опосредуют дифференцировку CD8⁺ лимфоцитов с фенотипом центральной памяти (T_{CM}) в эффекторные T-клетки (T_{EM} и T_{EMRA}). В хелперной популяции IL-2 инициирует созревание CD45RO⁺T-клеток в T-клетки эффекторной памяти за счет снижения незрелых эффекторов — CD62L-CD27⁺. Действие IL-7 на CD45RO⁺CD4⁺T-лимфоциты ассоциировано с генерацией незрелых эффекторов (T_{EM}) и терминально-дифференцированных клеток (T_{EMRA}) за счет T-клеток с фенотипом центральной памяти (T_{CM}). Полученные нами в условиях *in vitro* экспериментальные данные подтверждают факт линейной дифференцировки T_{CM} в T_{EM}/T_{EMRA} под действием γ с-цитокинов.

Список литературы / References

1. Иванова И.П., Савкин И.В., Селедцова Г.В., Шишков А.А., Селедцов В.И. Фенотипические характеристики и внутриклеточные цитокины Т-клеток памяти у больных рассеянным склерозом после Т-клеточной вакцинации // *Acta Biomedica Scientifica*, 2012. № 3-2 (85). С. 79-82. [Ivanova I.P., Savkin I.V., Seledtsova G.V., Shishkov A.A., Seledtsov V.I. Phenotypic characterization and intracellular cytokines of memory T-cells in multiple sclerosis patients after T-cell vaccination. *Acta Biomedica Scientifica = Acta Biomedica Scientifica*, 2012, no. 3-2 (85), pp. 79-82. (In Russ.)]
2. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 4 (17). С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 4, pp. 947-964. (In Russ.)]
3. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Копыльцова Е.А., Алешкин В.А. Возрастная динамика экспрессии изоформ CD45 Т-хелперами и Т-цитотоксическими лимфоцитами крови здоровых доноров // Иммунология, 2014. № 4. С. 229-232. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Kopyltsova E.A., Alyoshkin V.A. Age-dependent dynamics of the CD45 isoforms expression on the T-helper and T-cytotoxic lymphocytes in the blood of the healthy people. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no. 4, pp. 229-232. (In Russ.)]
4. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
5. Ahlers J.D., Belyakov I.M. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 9, pp. 1678-1689.
6. Alves N.L., Hooibrink B., Arosa F.A., van Lier R.A. IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8⁺ T cells *in vitro*. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 7, pp. 2541-2546.
7. Appay V., Dunbar P.R., Callan M., Klennerman P., Gillespie G.M., Papagno L., Ogg G.S., King A., Lechner F., Spina C.A., Little S., Havlir D.V., Richman D.D., Gruener N., Pape G., Waters A., Easterbrook P., Salio M., Cerundolo V., McMichael A.J., Rowland-Jones S.L. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.*, 2002, Vol. 8, pp. 379-385.
8. Bell E.B., Sparshott S.M., Bunce C. CD4⁺ T-cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen – a unifying concept. *Immunol. Today*, 1998, Vol. 19, no. 2, pp. 60-64.
9. Berger C., Jensen M.C., Lansdorp P.M., Gough M., Elliott C., Riddell S.R. Adoptive transfer of effector CD8⁺ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, no. 1, pp. 294-305.
10. Bouneaud C., Garcia Z., Kourilsky P., Pannetier C. Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 201, pp. 579-590.
11. Burkett P.R., Koka R., Chien M., Chai S., Chan F., Ma A., Boone D.L. IL-15R α expression on CD8⁺ T cells is dispensable for T cell memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, Vol. 100, no. 8, pp. 4724-4729.
12. Carrasco J., Godelaine D., van Pel A., Boon T., van der Bruggen P. CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last antigenic stimulation. *Blood*, 2006, Vol. 108, no. 9, pp. 2897-2905.
13. Cooper M.A., Bush J.E., Fehniger T.A., van Deusen J.B., Waite R.E., Liu Y., Aguila H.L., Caligiuri M.A. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood*, 2002, Vol. 100, no. 10, pp. 3633-3638.
14. Dunne P.J., Faint J.M., Gudgeon N.H., Fletcher J.M., Plunkett F.J., Soares M.V., Hislop A.D., Annels N.E., Rickinson A.B., Salmon M., Akbar A.N. Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. *Blood*, 2002, Vol. 100, no. 3, pp. 933-940.
15. Faint J.M., Annels N.E., Curnow S.J., Shields P., Pilling D., Hislop A.D., Wu L., Akbar A.N., Buckley C.D., Moss P.A., Adams D.H., Rickinson A.B., Salmon M. Memory T cells constitute a subset of the human CD8⁺CD45RA⁺ pool with distinct phenotypic and migratory characteristics. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 1, pp. 212-220.
16. Foulds K.E., Zenewicz L.A., Shedlock D.J., Jiang J., Troy A.E., Shen H. Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 4, pp. 1528-1532.
17. Geginat J., Campagnaro S., Sallusto F., Lanzavecchia A. TCR-independent proliferation and differentiation of human CD4⁺ T cell subsets induced by cytokines. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2002, Vol. 512, pp. 107-112.
18. Geginat J., Lanzavecchia A., Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, 2003, Vol. 101, no. 11, pp. 4260-4266.
19. Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J. Exp. Med.*, 2001, Vol. 194, no. 12, pp. 1711-1719.
20. Goldrath A.W., Sivakumar P.V., Glaccum M., Kennedy M.K., Bevan M.J., Benoist C., Mathis D., Butz E.A. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, no. 12, pp. 1515-1522.
21. Jiang Q., Li W.Q., Hofmeister R.R., Young H.A., Hodge D.R., Keller J.R., Khaled A.R., Durum S.K. Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members. *Mol. Cell. Biol.*, 2004, Vol. 24, no. 14, pp. 6501-6513.
22. Kalia V., Sarkar S., Subramaniam S., Haining W.N., Smith K.A., Ahmed R. Prolonged interleukin-2R α expression on virus-specific CD8⁺ T cells favors terminal-effector differentiation *in vivo*. *Immunity*, 2010, Vol. 32, no. 1, pp. 91-103.
23. Lanzavecchia A., Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 2, pp. 982-987.
24. Lefrançois L. Development, trafficking, and function of memory T-cell subsets. *Immunol. Rev.*, 2006, Vol. 211, pp. 93-103.

25. Lefrançois L., Marzo A. The descent of memory T-cell subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, Vol. 6, pp. 618-623.
26. Libri V., Azevedo R.I., Jackson S.E., Di Mitri D., Lachmann R., Fuhrmann S., Vukmanovic-Stejić M., Yong K., Battistini L., Kern F., Soares M.V., Akbar A.N. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. *Immunology*, 2011, Vol. 132, no. 3, pp. 326-339.
27. Litvinova L.S., Sokhnevich N.A., Gutsol A.A., Kofanova K.A. Influence of immunoregulatory cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15) *in vitro* upon activation, proliferation and apoptosis of immune memory T-cells. *Cell and tissue biology*, 2013, Vol. 7, no. 6, pp. 539-544.
28. Ma A., Koka R., Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2006, Vol. 24, pp. 657-679.
29. Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F., Roederer M., Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, no. 11, pp. 2797-2809.
30. Marsden V.S., Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 21, pp. 72-105.
31. Marzo A.L., Klonowski K.D., le Bon A., Borrow P., Tough D.F., Lefrançois L. Initial T cell frequency dictates memory CD8⁺ T cell lineage commitment. *Nat. Immunol.*, 2005, Vol. 6, pp. 793-799.
32. Mora J.R., von Andrian U.H. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol.*, 2006, Vol. 27, no. 5, pp. 235-243.
33. Prlic M., Lefrançois L., Jameson S.C. Multiple Choices: regulation of memory CD8 T cell generation and homeostasis by interleukin (IL)-7 and IL-15. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, no. 12, F49-52.
34. Riou C., Yassine-Diab B., van Grevenynghe J., Somogyi R., Greller L.D., Gagnon D., Gimmig S., Wilkinson P., Shi Y., Cameron M.J., Campos-Gonzalez R., Balderas R.S., Kelvin D., Sekaly R.-P., Haddad E.K. Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4⁺ central memory T cells. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 1, pp. 79-91.
35. Romero P., Zippelius A., Kurth I., Pittet M.J., Touvrey C., Iancu E.M., Corthesy P., Devedre E., Speiser D.E., Rufer N. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 7, pp. 4112-4119.
36. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 6, pp. 601-610.
37. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 745-763.
38. Tan J.T., Ernst B., Kieper W.C., LeRoy E., Sprent J., Surh C.D. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, no. 12, pp. 1523-1532.
39. Unsoeld H., Pircher H. Complex memory T-cell phenotypes revealed by coexpression of CD62L and CCR7. *J. Virol.*, 2005, Vol. 79, pp. 4510-4513.
40. van Leeuwen E.M., Gamadia L.E., Baars P.A., Remmerswaal E.B., ten Berge I.J., van Lier R.A. Proliferation requirements of cytomegalovirus-specific, effector-type human CD8⁺ T cells. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 10, pp. 5838-5843.
41. Willinger T., Freeman T., Hasegawa H., McMichael A.J., Callan M.F. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 9, pp. 5895-5903.
42. Yang S., Liu F., Wang Q.J., Rosenberg S.A., Morgan R.A. The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 7, e22560. doi: 10.1371/journal.pone.0022560.

Авторы:

Юрова К.А. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Хазиахматова О.Г. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

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

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

Authors:

Yurova K.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khaziakhmatova O.G., PhD (Biology), Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

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

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

Поступила 21.07.2017

Отправлена на доработку 22.09.2017

Принята к печати 25.09.2017

Received 21.07.2017

Revision received 22.09.2017

Accepted 25.09.2017

СОПОСТАВЛЕНИЕ УРОВНЯ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ И НЕКОТОРЫХ АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ

Раджаббадиев Р.М.¹, Ригер Н.А.¹, Никитюк Д.Б.¹, Галстян А.Г.²,
Петров А.Н.³, Евсюкова А.О.³, Ханферьян Р.А.¹

¹ ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии», Москва, Россия

² ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», Москва, Россия

³ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования», г. Видное, Московская обл., Россия

Резюме. Проведено обследование сывороточных концентраций цитокинов у 103 высококвалифицированных спортсменов различных по энергозатратам видов спорта (бобслей и пулевая стрельба). Установлено, что концентрация цитокинов (IL-4 и IL-18) у мужчин-бобслеистов существенно выше по сравнению со спортсменами, занимающимися пулевой стрельбой. Так, концентрация IL-4 составила $1,5 \pm 0,9$ пг/мл у бобслеистов и $0,45 \pm 0,23$ пг/мл у стрелков ($p < 0,05$). Концентрация IL-18 составила $467,5 \pm 155,21$ пг/мл у бобслеистов и $304,5 \pm 126,8$ пг/мл у стрелков. При этом концентрации IL-6 и IL-10 в сыворотке крови имели лишь тенденцию к повышению. Концентрация IFN- γ у бобслеистов практически не отличалась от аналогичных показателей сравниваемой группы стрелков. При сравнении показателей в женской группе спортсменов значения IL-4 и IL-10 были выше у спортсменов-бобслеистов 3,7 раза для IL-4 и в 2,34 раза для IL-10 по отношению к представителям пулевой стрельбы. Анализ содержания цитокинов в крови спортсменов с высокими энергозатратами показал значительные индивидуальные колебания данных показателей у спортсменов обоих полов. Корреляционной связи между содержанием в сыворотке крови цитокинов и основными антропометрическими показателями (мышечная масса тела, индекс массы тела, энергозатраты) не обнаружено. Вместе с тем выявлено увеличение содержания изучаемых цитокинов у бобслеистов – спортсменов, имеющих более интенсивные физические нагрузки. Таким образом, величина энергозатрат влияет на показатели цитокинового статуса, однако все значения цитокинов спортсменов находятся в пределах популяционной нормы, что, вероятно, обусловлено адаптацией спортсменов к высоким нагрузкам, обусловленным, в том числе, и адекватным применением специализированных спортивных продуктов для питания спортсменов.

Ключевые слова: цитокины, высококвалифицированные спортсмены, иммунитет, индекс массы тела

Адрес для переписки:

Ханферьян Роман Авакович
ФГБУН «Федеральный исследовательский
центр питания и биотехнологии»
109240, Россия, Москва, Устьинский проезд, 2/14.
Тел.: 8 (495) 698-53-45.
E-mail: khanferyan@ion.ru

Address for correspondence:

Khanferyan Roman A.
Federal Research Centre of Nutrition,
Biotechnology and Food Safety
109240, Russian Federation, Moscow, Ustinskiy proezd, 2/14.
Phone: 7 (495) 698-53-45.
E-mail: khanferyan@ion.ru

Образец цитирования:

Р.М. Раджаббадиев, Н.А. Ригер, Д.Б. Никитюк,
А.Г. Галстян, А.Н. Петров, А.О. Евсюкова,
Р.А. Ханферьян «Сопоставление уровня
иммунорегуляторных цитокинов и некоторых
антропометрических показателей
высококвалифицированных спортсменов»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1.
С. 53–60. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-53-60
© Раджаббадиев Р.М. и соавт., 2018

For citation:

R.M. Radzhabkadiyev, N.A. Riger, D.B. Nikityuk,
A.G. Galstyan, A.N. Petrov, A.O. Evsyukova, R.A. Khanferyan
“Comparison of the level of immunoregulatory cytokines and
some anthropometric parameters of highly skilled athlete”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2018, Vol. 20, no. 1, pp. 53–60.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-53-60

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-53-60

COMPARISON OF THE LEVEL OF IMMUNOREGULATORY CYTOKINES AND SOME ANTHROPOMETRIC PARAMETERS OF HIGHLY SKILLED ATHLETES

Radzhabkadiyev R.M.^a, Riger N.A.^a, Nikityuk D.B.^a, Galstyan A.G.^b, Petrov A.N.^c, Evsyukova A.O.^c, Khanferyan R.A.^a

^a Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian Federation

^b All-Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russian Federation

^c Russian Research Institute of Canning Technology, Vidnoe, Moscow Region, Russian Federation

Abstract. Studies in serum concentrations of cytokines was performed in 103 high-ranked athletes from the sports different by energy consumption (bobsleigh and shooting sports). We have shown that the cytokine concentrations (IL-4 и IL-18) in bobsleigh sportsmen were sufficiently higher than in shooters. I.e., the IL-4 concentration was 1.5 ± 0.9 pg/mL in bobsledders, and 0.45 ± 0.23 pg/mL in shooters ($p < 0.05$). The IL-18 concentration was 467.5 ± 155.2 pg/mL in bobsledders and 304.5 ± 126.8 pg/mL in shooters. Meanwhile, the IL-6 and IL-10 in blood serum showed only a tendency for increase. The IFN γ concentration in bobsledders did not differ from similar parameters in shooters. When comparing the data in females, the IL-4 and IL-10 figures were 3.7-fold higher in bobsledders for IL-4, and 2.34-fold higher for IL-10, when compared to the shooters. Analysis of cytokines in blood of athletes with high energy consumption has shown significant fluctuations of the given parameters in athletes of both sexes. We have not revealed any correlations between the cytokine contents in blood serum and main anthropometric parameters (body muscle mass, body index mass, energy consumption). Moreover, increased contents of the cytokines was found in bobsledders at more intensive physical loads. Hence, the energy consumption influences the cytokine state parameters. However, all the cytokine values in athletes are within population norms which may due to adaptation of the athletes for high loads which may be determined by, e.g., adequate usage of specialized sport food for their nutrition.

Keywords: cytokines, highly skilled athletes, immunity, body mass index

Введение

Современный спорт высших достижений неразрывно связан с экстремальными физическими и эмоциональными нагрузками, которые приводят к изменению показателей функциональных систем организма. Исследования последних десятилетий показали, что под влиянием высоких спортивных нагрузок показатели иммунитета могут выходить за пределы физиологической нормы и носить патологический характер, являясь причиной увеличения заболеваемости и снижения спортивных результатов [10]. Иммунная система, как одна из ключевых интегральных и регуляторных систем организма, наиболее чувствительна к воздействию стрессовых факторов [10, 13]. Известно, что интенсивные мышечные нагрузки приводят к изменению параметров иммунного

статуса: увеличению содержания в крови стрессовых гормонов, снижению числа нейтрофилов, уменьшению количества Т- и В-лимфоцитов, нарушению синтеза иммуноглобулинов различных классов [2, 4, 12, 16, 22], снижению количества естественных киллеров (НК-клеток) и изменению продукции про- и противовоспалительных цитокинов [4, 17].

Одной из важнейших функций цитокинов является обеспечение согласованного действия иммунной, эндокринной и нервной системы в ответ на стресс. По данным научной литературы, сдвиги в цитокиновом каскаде под влиянием физических нагрузок аналогичны с таковым при воспалительных и септических состояниях [3]. Исследования [6, 8, 14, 15, 17, 19, 20] показали, что интенсивные физические упражнения вы-

зывают воспалительную реакцию, активность которой зависит от активности воздействия физической нагрузки, которая сопровождается значительным повышением концентрации провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, IL-12, IL-18, TNF α и антагониста рецептора IL-1 (IL-1ra). Так, было выявлено 100-кратное увеличение продукции IL-1ra и IL-6 у марафонцев после бега [21].

Исследования цитокинового статуса осуществлялись у спортсменов различной специализации: гребля [9], лыжные гонки [5], плавание, легкая и тяжелая атлетика, волейбол, баскетбол [11], велоспорт [3], вольная борьба, бокс [4], тхэквондо [6], биатлон. Вместе с тем лишь в ограниченных исследованиях имеются данные по коррелятивной зависимости физической активности от важнейших антропометрических показателей. В последнее время большое внимание также уделяется изучению состава тела, что позволяет адекватно проводить мониторинг состояния спортсмена, прогнозировать наступление патологических нарушений. В связи с этим определение состава тела имеет существенное значение для оптимизации тренировочного режима и массы тела спортсменов в процессе подготовки к соревнованиям [1, 9]. **Целью нашей работы** было

проведение исследования зависимости содержания иммунорегуляторных цитокинов (IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 и IFN γ) в крови от показателей состава тела высококвалифицированных спортсменов, занимающихся различными по физической активности видами спорта: бобслеем и пулевой стрельбой.

Материалы и методы

В обследование были включены 103 высококвалифицированных спортсмена (мастера спорта) в возрасте от 18 до 29 лет, которые были разделены по полу и спортивной специализации. Среди бобслеистов ($n = 48$) было 27 мужчин и 21 женщин. Соотношение мужчин и женщин, занимающихся пулевой стрельбой ($n = 55$), было 33/22 соответственно. Спортсмены обследованы в предсоревновательный период спортивной подготовки. Все участники обследования подписали информированное согласие.

Измерение показателей состава тела проводилось биоимпедансным анализатором InBody 720 (Biospace, Южная Корея) с определением массы тела (MT), роста, возраста, индекса массы тела (ИМТ) и массы мышечной ткани (ММТ) [7]. Также в ходе анализа были получены показате-

ТАБЛИЦА.1. АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПОРТСМЕНОВ

TABLE 1. ANTHROPOMETRIC INDICES IN ATHLETES

Вид спорта Kind of sport	Состав команд Team structure	Возраст Age	Рост Height	MT Weight	ИМТ BMI	ИМТ-N BMI-N	ММТ SMM	ММТ-N SMM-N	Основной обмен Basal metabolism
Пулевая стрельба ($n = 55$) Shooting sports	м/м ($n = 33$)	22,2 $\pm$ 8,3	177,4 $\pm$ 6,6	71,3 $\pm$ 9,9	22,8 $\pm$ 2,6	20,9-24,9	36,49$\pm$5,3$\uparrow$	28,91-34,01	1753 $\pm$ 186,8
	ж/ж ($n = 22$)	22,9 $\pm$ 8,1	162 $\pm$ 5,5	57,7 $\pm$ 6,9	22 $\pm$ 2,4	19,6-24,2	26,8$\pm$4,7$\uparrow$	19,36-23,49	1426 $\pm$ 163,1
Бобслей ($n = 48$) Bobsleigh	м/м ($n = 27$)	22,7 $\pm$ 2,4	182 $\pm$ 5	88,2 $\pm$ 9,3	26,5$\pm$2,2$\uparrow$	21,1-25,2	48,1$\pm$5,7$\uparrow$	28,85-33,94	2133 $\pm$ 198,1
	ж/ж ($n = 21$)	22 $\pm$ 5,5	169 $\pm$ 4,6	66 $\pm$ 8,5	23,9 $\pm$ 2,07N $\uparrow$	19,5-24,0	34,6$\pm$6,3$\uparrow$	19,30-23,43	1661 $\pm$ 206,7

Примечание. Жирным шрифтом обозначены отклонения от популяционной нормы [12]; ИМТ-N – индекс массы тела популяционной нормы; ММТ-N – масса мышечной ткани популяционной нормы; [$\uparrow$] – выше нормы, N $\uparrow$ – верхняя граница нормы; ж – женщины; м – мужчины.

Note. Deviations from the population norm are indicated in bold type; BMI-N, body mass index of population; SMM-N, skeletal muscle mass of population; [$\uparrow$], above normal values, N $\uparrow$, upper limit of normal; w, women; m, men

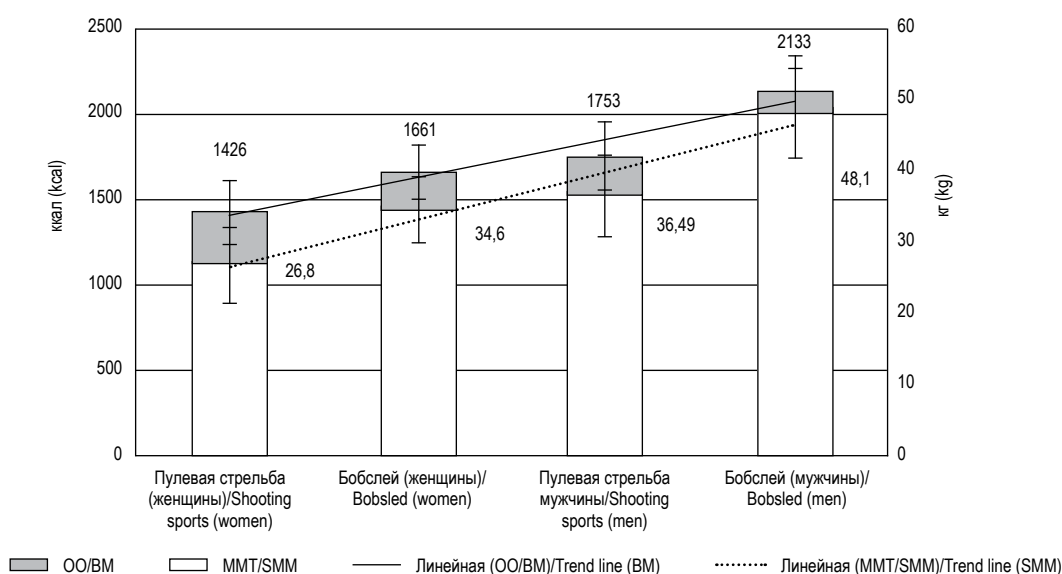


Рисунок 1. Индекс массы тела и масса мышечной ткани спортсменов

Примечание. ИМТ – индекс массы тела; ММТ – масса мышечной ткани.

Figure 1. Body mass index and skeletal muscle mass of athletes

Note. BMI, body mass index, SMM, skeletal muscle mass.

ли интенсивности основного обмена и энергозатрат.

Забор крови проводился утром натощак до утренней тренировки. Определение уровня цитокинов (IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 и IFN γ) в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением наборов реагентов фирмы «Вектор-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) с регистрацией на микропланшетном фотометре Anthos 2010 (Labtec, Австрия). Подготовку к измерению уровня исследуемых цитокинов проводили согласно рекомендациям производителя наборов.

Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили с использованием пакета прикладных программ Statistics Version 20. Оценка достоверности различий между группами проведена с использованием t-критерия Стьюдента. Уровень значимости считали достоверным при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

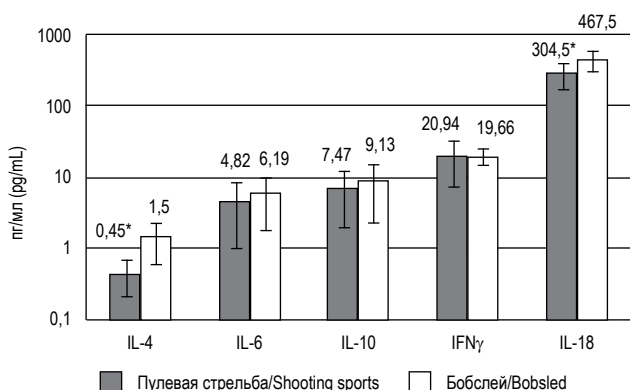
В результате анализа антропометрических данных и состава тела обследуемых групп было выявлено, что наиболее выраженные изменения наблюдались в значениях массы мышечной ткани

(ММТ). Как видно из данных, представленных в таблице 1, ММТ выходит за пределы физиологической нормы общей популяции, как в мужской, так и в женской группе спортсменов-бобслеистов. Следует отметить, что значения ИМТ у представителей пулевой стрельбы не выходили за пределы популяционной нормы (табл. 1).

Сравнительный анализ показателей ИМТ и ММТ обследуемых групп показал повышение данных значений у спортсменов, занимающихся бобслеем, по сравнению с представителями пулевой стрельбы. Установлено статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение показателей ИМТ и ММТ (рис. 1) у бобслеистов как мужской группы на 14 и 25%, так и женской на 8 и 22,6% соответственно.

Анализ основного обмена у спортсменов-мужчин, занимающихся пулевой стрельбой показал, что уровень ОО в среднем составляет $1753 \pm 186,8$ ккал/сут., в группе бобслеистов – $2133 \pm 198,1$ ккал/сут. Аналогичные данные были получены в женской группе спортсменов. Так, средние значения основного обмена спортсменов, занимающихся пулевой стрельбой, составили – $1426 \pm 163,1$ ккал/сут., в группе бобслеисток – $1661 \pm 206,7$ ккал/сут.

A (A)



Б (B)

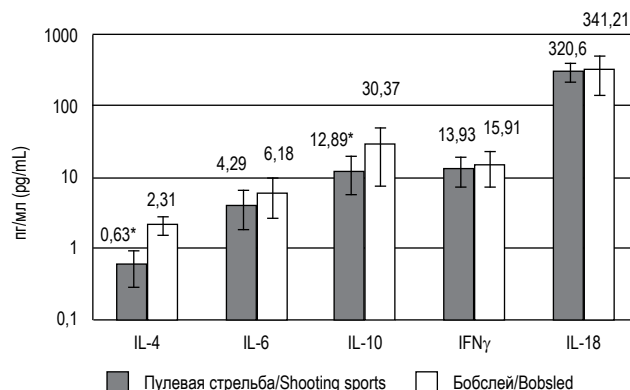


Рисунок 2. Цитокины в сыворотке крови высококвалифицированных спортсменов

Примечание. * – $p \leq 0,05$ – достоверность различий между группами спортсменов различной специализации.

Мужчины – рисунок 2А, женщины – рисунок 2Б.

Figure 2. The cytokines in the blood serum of elite athletes

Note. *, $p \leq 0,05$, significance of differences between groups of athletes of different specializations. Men, Figure 2A, Women, Figure 2B.

Определена выраженная зависимость показателей основного обмена от ММТ. Так, выявлено повышение значений ОО и ММТ у бобслеистов мужчин на 17,9 и 24,1% ($p < 0,05$), соответственно, по сравнению со спортсменами, занимающимися пулевой стрельбой. Аналогичные данные были получены в женской группе.

Анализ содержания цитокинов в крови мужчин показал существенное увеличение IL-4 и IL-18 у бобслеистов по отношению к спортсменам, занимающимся пулевой стрельбой. Так, концентрация IL-4 составила $1,5 \pm 0,9$ пг/мл у бобслеистов и $0,45 \pm 0,23$ пг/мл у стрелков ($p < 0,05$). Концентрация IL-18 составила $467,5 \pm 155,21$ пг/мл у бобслеистов и $304,5 \pm 126,8$ пг/мл у стрелков ($p < 0,05$). При этом концентрации IL-6 и IL-10 в сыворотке крови имели лишь тенденцию к повышению, однако различия не достигали статистически значимых величин: ($p > 0,05$). Концентрация IFN γ у бобслеистов практически не отличалась от аналогичных показателей сравниваемой группы стрелков и составила $19,96 \pm 5,31$ пг/мл против $20,94 \pm 13,6$ пг/мл соответственно (рис. 2А). При сравнении цитокиновых показателей в женской группе спортсменов значения IL-4 и IL-10 были выше у спортсменов-

бобслеистов по отношению к представителям пулевой стрельбы в 3,7 раза для IL-4 и 2,34 раза для IL-10 ($p < 0,05$). Концентрация IL-6, IL-18 и IFN γ у бобслеистов была незначительно выше показателей спортсменов-стрелков, однако различия не достигали статистически значимых величин ($p > 0,05$) (рис. 2Б).

Корреляционной связи между содержанием в сыворотке крови цитокинов и некоторыми антропометрическими показателями (ММТ, ИМТ) обнаружено не было. Однако выявлено увеличение содержания изучаемых цитокинов у бобслеистов-спортсменов, подверженных более интенсивным физическим нагрузкам. Так, у бобслеистов уровень большинства цитокинов (IL-4, IL-6, IL-10 и IL-18) был значительно выше, чем у лиц из группы стрелкового спорта. Так, концентрация IL-4 была выше на 70%, IL-6 на 22,14%, IL-10 на 18,19% и IL-18 на 34,87%. Содержание же IFN γ у мужчин-бобслеистов оказалась незначительно ниже (6,12%) относительно представителей пулевой стрельбы. При сравнении показателей в женской группе спортсменов, занимающихся бобслеем, значения IL-4 были выше на 72,7%, IL-6 на 30,59%, IL-10 на 57,5%, IFN γ на 12,45% и IL-18 на 6,05%.

Резюмируя вышесказанное, можно предположить, что величина энергозатрат оказывает существенное влияние на показатели цитокинового статуса. Однако следует отметить, что все значения иммунорегуляторных цитокинов спортсменов не выходят за пределы популяционной

нормы, что, вероятно, связано с адаптацией спортсменов к высоким нагрузкам, обусловленным, в том числе, и адекватным применением специализированных пищевых продуктов для питания спортсменов.

Список литературы / References

1. Абрамова М.А., Азизбекян Г.А., Зилова И.С., Лысиков Ю.А. Результаты исследований фактического питания и некоторых параметров физического состояния спортсменов-регбистов // Вопросы питания, 2013. Т. 82, № 4. С. 69-75. [Abramova M.A., Azizbekyan G.A., Zilova I.S., Lysikov Yu.A. Results of researches of the actual food and some parameters of a physical condition of athletes rugby. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*, 2013, Vol. 82, no. 2, pp. 69-75. (In Russ.)]
2. Афанасьева И.А. Сдвиги в популяционном составе и функциональной активности лимфоцитов, продукции цитокинов и иммуноглобулинов у спортсменов при синдроме перетренированности // Вестник спортивной науки, 2011. № 3. С. 18-24. [Afanasyeva I.A. Alterations in population structure and functional activity of lymphocytes, production of cytokines and immunoglobulins in athletes with overtraining syndrome. *Vestnik sportivnoy nauki = Sports Science Bulletin*, 2011, no. 3, pp. 18-24. (In Russ.)]
3. Василенко В.С., Левин М.Я., Семенова Ю.Б., Назаров П.Г. Цитокины как маркеры перенапряжения сердечно-сосудистой системы у спортсменов // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 1. С. 86-90. [Vasilenko V.S., Levin M.Ya., Semenova Yu.B., Nazarov P.G. Cytokines as markers of overexertion of the cardiovascular system in athletes. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 1, pp. 86-90. (In Russ.)]
4. Головкова В.С., Гольдерова А.С., Николаева И.Н., Алексеева Е.А., Захарова Ф.А. Состояние иммунитета у молодых спортсменов – единоборцев республики Саха (Якутия) // Бюллетень ВЧНЦ СО РАМН, 2010. Т. 75, № 5. С. 157-159. [Golovkova V.S., Golderova A.S., Nikolaev I.N., Alekseeva E.A., Zakharova F.A. Immune status of young sportsmen of the Republic of Sakha (Yakutia). *Byulleten Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN = Bulletin of the East Siberian Scientific Center SBRAMS*, 2010, Vol. 75, no. 5, pp. 157-159. (In Russ.)]
5. Зурочка А.В., Журило О.В., Сашенков С.Л. Динамика изменения состояния иммунной системы спортсменов различных специализаций в течение годовичного цикла тренировочного процесса // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 2-3. С. 223. [Zurochka A.V., Zhurilo O.V., Sashenkov S.L. Dynamics of changes in the immune system of athletes of different specializations during the annual cycle of the training process. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 2, no. 7, p. 223. (In Russ.)]
6. Мельников В.И. Уровень про-и противовоспалительных цитокинов у спортсменов водных видов спорта в период интенсивных физических нагрузок // Фундаментальные исследования, 2011. № 10. С. 122-125. [Melnikov V.I. The levels of Pro-and anti-inflammatory cytokines in athletes of water sports in a period of intense physical exertion. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2011, no. 10, pp. 122-125. (In Russ.)]
7. Николаев Д.В., Смирнов А.В., Бобринская И.Г., Руднев С.Г. Биоимпедансный анализ состава тела человека. М.: Наука, 2009. С. 392. [Nikolaev D.V., Smirnov A.V., Bobrinskaya I.G., Rudnev S.G. Bioimpedance analysis of body composition]. Moscow: Science, 2009, p. 392.
8. Назаров П., Шевченко Е., Осадчая О., Левон М. Иммунный статус спортсменов при физической нагрузке // Наука в олимпийском спорте, 2014. № 1. С. 37-43. [Nazarov P., Shevchenko E., Osadchaya O., Levon M.

The immune status of athletes during exercise. *Nauka v Olimpijskom sporte = Science in the Olympic sport*, 2014, no. 1, pp. 37-43. (In Russ.)]

9. Романов Ю.Н. Функциональный мониторинг компонентного состава тела, осанки и экспресс-анализа мочи студентов кикбоксеров на этапе предсоревновательной подготовки мезоцикла // Вестник ЮУрГУ, 2011. № 39. С. 47-50. [Romanov Yu.N. Functional monitoring of the component composition of the body, posture and express analysis of urine students kickboxers at the stage of precompetitive preparation mesocycle. *Vestnik Yuzhno-Uralskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of the South Ural State University*, 2011, no. 39, pp. 47-50. (In Russ.)]

10. Руднев С.Г., Соболева Н.П., Стерликов С.А., Николаев Д.В. Биоимпедансное исследование состава тела населения России. М.: РИО ЦНИИОИЗ, 2014. С. 493. [Rudnev S.G., Soboleva N.P. Sterlikov S.A., Nikolaev D.V. Bioimpedance study of body composition of Russia's population]. Moscow: Editorial and Publishing Department of the Central Scientific Research Institute of Health Organization and Informatization, 2014, p. 493.

11. Суздальницкий Р.С., Левандо В.А. Новые подходы к пониманию спортивного стрессорного иммунодефицита // Теория и практика физической культуры, 2003. № 1. С. 68-74. [Suzdalnitsky R.S., Levando V.A. Modern approaches to understanding sports stress immunodeficiencies. *Teoriya i praktika fizicheskoy kultury = Theory and Practice of Physical Culture*, 2003, no. 1, pp. 68-74. (In Russ.)]

12. Сарайкин Д.А., Терзи М.С., Павлова В.И. Показатели периферической системы крови у юных тхэквондистов на предсоревновательном этапе тренировочного процесса // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2012. Т. 39, № 2. С. 15. [Saraykin D.A., Terzi M.S., Pavlova V.I. The parameters of the peripheral blood system in young athletes in the precompetitive stage training process. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2012, Vol. 39, no. 2, p. 15. (In Russ.)]

13. Стернин Ю.И., Кнорринг Г.Ю., Сизязкина Л.П. Особенности регуляции иммунной системы при высокой физической активности // Цитокины и воспаление, 2007. Т. 6, № 2. С. 63-67. [Sternin Yu.I., Knorring G.Yu., Sizyakina L.P. Features of the regulation of the immune system with high physical activity. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2007, Vol. 6, no. 2, pp. 63-67. (In Russ.)]

14. Cabral-Santos C., Gerosa-Neto J., Inoue D.S., Panissa V.L.G., Gobbo L.A., Zagatto A.M., Campos E.Z., Lira F.S.. Similar anti-inflammatory acute responses from moderate-intensity continuous and high-intensity intermittent exercise. *J. Sports Science and Medicine*, 2015, Vol. 14, pp. 849-856.

15. Denguezli-Bouzarrou M., Ben Jabrallah M., Gaid S., Slama F., Ben Saad H., Tabka Z. Effects of brief maximal exercise on interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *J. Biology of Sport*, 2006, Vol. 23, no 1, pp. 1-13.

16. Gleeson M., Bishop N., Oliveira M., McCauley T., Tauler P., Muhamad A. S. Respiratory infection risk in athletes: association with antigen-stimulated IL-10 production and salivary IgA secretion. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*. 2012, Vol. 22, no. 3, pp. 410-417.

17. Gleeson M., Pyne D.B. Exercise effects on mucosal immunity. *J. Immunology and Cell Biology*, 2000, Vol. 78, pp. 536-544.

18. Gough L., Penfold R.S., Godfrey R.J., Castel L. The immune response to short-duration exercise in trained, eumenorrhoeic women. *J. Sports Science*, 2015, Vol. 9, pp. 1-7.

19. Margeli A., Skenderi K., Tsironi M., Hantzi E., Matalas A.-L., Vrettou C., Kanavakis E., Chrousos G., Dramatic I. P. . Elevations of Interleukin-6 and acute-phase reactants in athletes participating in the ultradistance foot race spartathlon: Severe systemic inflammation and lipid and lipoprotein changes in protracted exercise. *J. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005, Vol. 90, no. 7, pp. 3914-3918.

20. Robson P. Elucidating the unexplained underperformance syndrome in endurance athletes: the interleukin-6 hypothesis. *J. Sports Medicine*, 2003, Vol. 33, no. 10, pp. 771-781.

21. Steensberg A., van Hall G., Osada T., Sacchetti M., Saltin B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J. Physiology*, 2000, Vol. 529, no. 1, pp. 237-242.

22. Suzuki K., Yamada M., Kurakake S., Okamura N., Yamaya K., Liu O., Kudoh S., Kowatari K., Nakaji S., Sugawara K.. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *European Journal of Applied Physiology*, 2000, Vol. 81, no. 4, pp. 281-287.

Авторы:

Раджабкадиев Р.М. — младший научный сотрудник
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
питания и биотехнологии», Москва, Россия

Ригер Н.А. — д.м.н., старший научный сотрудник
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
питания и биотехнологии», Москва, Россия

Никичук Д.Б. — д.м.н., профессор, член-
корреспондент РАН, директор ФГБУН «Федеральный
исследовательский центр питания и биотехнологии»,
Москва, Россия

Галстян А.Г. — д.т.н., профессор, член-корреспондент
РАН, ведущий научный сотрудник ФГБНУ
«Всероссийский научно-исследовательский институт
молочной промышленности», Москва, Россия

Петров А.Н. — д.т.н., академик РАН, директор ФГБНУ
«Всероссийский научно-исследовательский институт
технологии консервирования», г. Видное, Московская
обл., Россия

Евсюкова А.О. — научный сотрудник ФГБНУ
«Всероссийский научно-исследовательский институт
технологии консервирования», г. Видное, Московская
обл., Россия

Ханферьян Р.А. — д.м.н., профессор, заведующий
лабораторией иммунологии ФГБУН «Федеральный
исследовательский центр питания и биотехнологии»,
Москва, Россия

Authors:

Radzhabkadiev R.M., Junior Research Associate, Federal
Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety,
Moscow, Russian Federation

Riger N.A., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate,
Laboratory of Immunology, Federal Research Centre of
Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian
Federation

Nikiyuk D.B., PhD, MD, Professor (Medicine), RAS
Corresponding Member, Director, Federal Research Centre of
Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian
Federation

Galstyan A.G., PhD, MD (Technology), Professor, RAS
Corresponding Member, Leading Research Associate,
All-Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russian
Federation

Petrov A.N., PhD, MD (Technology), Professor, RAS Full
Member, Director, Russian Research Institute of Canning
Technology, Vidnoe, Moscow Region, Russian Federation

Evsyukova A.O., Research Associate, Russian Research
Institute of Canning Technology, Vidnoe, Moscow Region,
Russian Federation

Khanferyan R.A., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory
of Immunology, Federal Research Centre of Nutrition,
Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.11.2017

Отправлена на доработку 01.12.2017

Принята к печати 04.12.2017

Received 29.11.2017

Revision received 01.12.2017

Accepted 04.12.2017

ВЗАИМОСВЯЗЬ СОДЕРЖАНИЯ Th- И Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В КРОВИ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ И АДНЕКСИТОМ

Савченко А.А.^{1,2}, Каспаров Э.В.¹, Арутюнян С.С.¹, Борисов А.Г.^{1,2}, Кудрявцев И.В.^{3,4,5}, Гвоздев И.И.¹, Мошев А.В.¹

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

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

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

⁵ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение особенностей взаимосвязи содержания Th- и Т-регуляторных клеток в крови и хемилюминесцентной активности нейтрофилов у больных хронически эндометритом и аднекситом. Обследовано 89 женщин репродуктивного возраста (от 18 до 45 лет) с хроническим эндометритом (48 чел.) и аднекситом (41 чел.). В качестве контроля обследовано 98 здоровых женщин аналогичного возрастного диапазона. Исследование фенотипического состава Th- и Т-регуляторных клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови. Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа. В качестве индикаторов хемилюминесценции использовали люминол и люцигенин. При хроническом эндометрите установлено повышение количества в крови неактивированных и активированных Th-клеток и Treg. Высокая интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов определяется повышением уровня синтеза первичных и вторичных активных форм кислорода (АФК). Однако длительный инфекционно-воспалительный процесс при хроническом эндометрите приводит к истощению метаболических резервов нейтрофильных гранулоцитов для синтеза первичных АФК. При данном заболевании с показателями респираторного взрыва нейтрофилов взаимосвязаны только активированные Th-клетки (экспрессирующие CD62L), что реализуется в сокращении времени активации НАДФН-оксидазы и стимулировании антигениндуцированного синтеза вторичных АФК. У больных хроническим аднекситом содержание Th-клеток в периферической крови соответствует контрольному диапазону, тогда как количество Treg, а также активированных Th-клеток и Treg значительно превышает контрольный диапазон. Респираторный взрыв нейтрофилов крови у больных хроническим аднекситом реализуется при дисбалансе синтеза первичных и вторичных АФК: при сниженной активности НАДФН-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.А. Савченко, Э.В. Каспаров, С.С. Арутюнян, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев, И.И. Гвоздев, А.В. Мошев «Взаимосвязь содержания Th- и Т-регуляторных клеток в крови и хемилюминесцентной активности нейтрофилов у больных хроническим эндометритом и аднекситом» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 61-72
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-61-72
© Савченко А.А. и соавт., 2017

For citation:

A.A. Savchenko, E.V. Kasparov, S.S. Arutyunyan, A.G. Borisov, I.V. Kudryavtsev, I.I. Gvozdev, A.V. Moshev "Relationship between the Th and T regulatory cells in blood, and chemiluminescent activity of neutrophils in patients with chronic endometritis and adnexitis", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 61-72. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-61-72
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-61-72

оксидазы наблюдается высокий уровень синтеза вторичных АФК. С помощью корреляционного анализа установлено, что при хроническом аднексите имеется единственная взаимосвязь между уровнем Т-хелперов и показателями респираторного взрыва нейтрофилов, характеризующая отрицательное влияние Th-клеток на индекс активации нейтрофилов. В то же время при данном заболевании обнаружены многочисленные и тесные положительные взаимосвязи между количеством неактивированных и активированных Treg и практически всеми показателями респираторного взрыва нейтрофилов. Предполагается, что длительное стимулирующее воздействие Th-клеток и Treg на нейтрофильные гранулоциты приводит к истощению метаболических резервов для реализации респираторного взрыва, что и является одним из механизмов иммунопатогенеза, способствующим хронизации инфекционно-воспалительного процесса.

Ключевые слова: Т-хелперы, Т-регуляторные клетки, нейтрофилы, респираторный взрыв, хронический эндометрит, хронический аднексит

RELATIONSHIP BETWEEN THE Th AND T REGULATORY CELLS IN BLOOD, AND CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS AND ADNEXITIS

Savchenko A.A.^{a, b}, Kasparov E.V.^a, Arutyunyan S.S.^a, Borisov A.G.^{a, b}, Kudryavtsev I.V.^{a, b, c}, Gvozdev I.I.^a, Moshev A.V.^a

^a Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

^d Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

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

Abstract. The aim of present study was to investigate the specific relationships between contents of Th and T regulatory cells in blood, and chemiluminescent activity of neutrophils in patients with chronic endometritis and adnexitis. The study involved 89 women of reproductive age (18 to 45 years) with chronic endometritis (n = 48) and adnexitis (n = 41). As a control, we have examined 98 healthy age-matched women. Phenotypic composition of Th and T regulatory cells was studied by flow cytometry using direct immunofluorescence of whole peripheral blood. The state of the respiratory burst in neutrophilic granulocytes was examined by chemiluminescence analysis. Luminol and lucigenin were used as indicators of chemiluminescence. An increase in the number of non-activated and activated Th cells and Treg has been established in blood of patients with chronic endometritis. High intensity of neutrophil respiratory burst was determined as increased level of primary and secondary reactive oxygen species (ROS) synthesis. However, a long infectious and inflammatory process accompanied by chronic endometritis could lead to depletion of metabolic reserves in the neutrophil granulocytes, in terms of primary ROS synthesis. Only activated (CD62L- expressing) Th cells show interrelations with neutrophil respiratory burst indices in this disease, as demonstrated by reduced activation time of NADPH-oxidase and stimulation of secondary antigen-induced ROS synthesis. The contents of Th cells in peripheral blood of the patients with chronic adnexitis corresponded to the control range, whereas amount of Treg, as well as activated Th cells and Treg significantly exceeds the control range. The respiratory burst of blood neutrophils in patients with chronic adnexitis exhibited a synthetic imbalance of primary and secondary ROS: along with reduction in NADPH-oxidase activity, there is a high level of secondary ROS synthesis. By means of correlation analysis, we have revealed that, in chronic adnexitis, there is a unique relationship between the level of T helpers and neutrophil respiratory burst indices, thus characterizing a negative effect of Th cells upon the neutrophil activation index. At the same time, numerous and close positive relationships between the number of non-activated and activated Treg and virtually all indices of respiratory neutrophil blast were found in this clinical condition. It is assumed that the long-term stimulating effect of Th cells and Treg on neutrophilic granulocytes leads to depletion of metabolic reserves necessary for implementation of a respiratory burst. This finding could be one of mechanisms supporting immunopathogenesis which contributes to chronization of infectious and inflammatory process.

Keywords: Th cells, T regulatory cells, neutrophils, respiratory burst, chronic endometritis, chronic adnexitis

Введение

В структуре гинекологических инфекционно-воспалительных заболеваний лидирующее положение занимает острый и хронический эндометрит и аднексит [1, 32]. Они также являются наиболее частой причиной тяжелых осложнений, таких как сепсис, перитонит, tuboовариальный абсцесс, спаечный процесс, бесплодие, невынашивание беременности и хроническая тазовая боль. В основе этиопатогенеза эндометритов и аднексита лежит инфекционный процесс, развивающийся в результате восходящей инфекции из цервикального канала и вызывающий развитие иммуновоспалительной реакции [5, 33]. Ключевую роль в развитии воспалительных процессов играют нейтрофильные гранулоциты. Нейтрофилы быстро мобилизуются в очаг воспаления, от их фагоцитарной активности во многом зависит эффективность противомикробной защиты организма [3, 18, 27, 30]. Обладая широким набором рецепторов, нейтрофилы очень чувствительны к окружающей среде и при малейшем нарушении гомеостаза модулируют свои функции, направленные на его восстановление. Одним из важных аспектов проявления функциональной активности нейтрофилов является респираторный взрыв, развивающийся при взаимодействии клеток с объектами фагоцитоза, интенсивность которого формируется синтезом активных форм кислорода (АФК) [4, 6, 21].

Известно, что функциональная эффективность нейтрофилов во многом регулируется Т-лимфоцитами. Так, Т-хелперы 1 и 2 типа активируют миграцию и повышают фагоцитарную активность нейтрофилов [18, 26, 29]. Более того, имеются данные, что интерлейкин-4 может опосредованно, через индукцию экспрессии хемотаксических факторов эндотелиальными клетками легких, стимулировать миграцию нейтрофильных гранулоцитов [18]. Доказано стимулирующее влияние Th17-лимфоцитов на функциональную активность нейтрофилов, активируется хемотаксис клеток [27, 34]. Значительный интерес вызывают исследования влияния Т-регуляторных клеток (Treg) на функцию нейтрофилов. Обнаружено, что Treg снижают экспрессию интегринов на поверхности клеток и уровень синтеза цитокинов нейтрофилами, что является важным фактором в хронизации инфекционных заболеваний [19, 20].

Целью исследования явилось изучение особенностей взаимосвязи содержания Th- и Т-регуляторных клеток в крови и хемилюминесцентной активности нейтрофилов у больных хроническим эндометритом и аднекситом.

Материалы и методы

Обследовано 89 женщин репродуктивного возраста (от 18 до 45 лет) с хроническим эндо-

метритом (48 чел.) и аднекситом (41 чел.). Проводилось комплексное обследование, включающее расширенную кольпоскопию, цитологические и морфологические методы. В качестве контроля обследовано 98 здоровых женщин аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипического состава Th- и Т-регуляторных клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующей панели: CD62L-FITC/CD127-PE/CD3-ECD/CD25-PC5/CD4-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [2]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [23]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, США) [22]. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 лимфоцитов.

Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа [6]. В качестве индикаторов хемилюминесценции использовали люминол и люцигенин. Оценка спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «БЛМ-3607» (Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции (Синд.) к площади спонтанной (Сспонт.) и определяли как индекс активации (Синд./Сспонт.).

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

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного

размаха в виде 1 и 3 квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Достоверность различий между показателями оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

Цитометрическое исследование фенотипа лимфоцитов периферической крови позволило установить, что только у больных хроническим эндометритом в периферической крови повышается относительное и абсолютное количество $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов (табл. 1.). Процентный уровень $CD3^+CD4^+CD62L^+$ клеток также увеличен только у больных хроническим эндометритом, тогда как абсолютное содержание данной фракции клеток повышено относительно контрольных значений и при хроническом эндометрите, и при хроническом аднексите. У больных с хроническим течением эндометрита и аднексита в крови повышено относительное и абсолютное количество $CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$ и $CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}CD62L^+$ лимфоцитов.

При исследовании активности и кинетики люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов обнаружено, что у больных хроническим эндометритом и аднекситом сокращается время выхода на максимум спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции клеток (табл. 2). Однако время выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов при хроническом аднексите снижается более выражено, чем при хроническом эндометрите. Только у больных хроническим эндометритом относительно контрольных значений и выявленных у пациенток с хроническим аднекситом обнаружено повышение максимума интенсивности и площади под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов. Причем увеличение площади под кривой индуцированной хемилюминесценции при эндометрите относительно контрольного уровня менее выражено, чем повышение площади под кривой спонтанной хемилюминесценции, что выражается в снижении величины индекса активации нейтрофилов по люцигенин-зависимой хемилюминесценции.

В то же время у больных хроническим аднекситом наблюдается понижение площади под кривой спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов относительно контрольного диапазона и значений, выявленных у пациентов с хроническим эндометритом, а также снижение максимума интенсивности и пло-

щади под кривой зимозан-индуцированной хемилюминесценции также контрольных значений и выявленных при хроническом эндометрите.

При исследовании люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови обнаружено, что у больных хроническим эндометритом повышен максимум интенсивности и площадь под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции относительно контрольных значений (табл. 3). У больных хроническим аднекситом установлено уменьшение времени выхода на максимум спонтанной и индуцированной хемилюминесценции относительно контрольных значений и выявленных у пациентов с хроническим эндометритом. При хроническом аднексите также повышается максимум интенсивности и площадь под кривой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов относительно контрольных значений. Однако площадь под кривой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции при хроническом аднексите ниже, чем при хроническом эндометрите.

С помощью корреляционного анализа исследованы особенности взаимосвязи между содержанием Th- и Т-регуляторных клеток и хемилюминесцентной активностью нейтрофилов. Обнаружено, что у лиц контрольной группы время выхода на максимум спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции отрицательно взаимосвязано с абсолютным содержанием $CD3^+CD4^+CD62L^+$ и $CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}CD62L^+$ клеток ($r = -0,51$, $p = 0,030$ и $r = -0,47$, $p = 0,049$ соответственно). Абсолютное количество $CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$ лимфоцитов также отрицательно коррелирует с максимумом интенсивности индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов ($r = -0,50$, $p = 0,034$).

У больных хроническим эндометритом относительное количество $CD3^+CD4^+CD62L^+$ лимфоцитов положительно взаимосвязано с площадью под кривой зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов ($r = 0,36$, $p = 0,029$), тогда как абсолютный уровень данного типа клеток отрицательно коррелирует с временем выхода на максимум спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции ($r = -0,32$, $p = 0,028$) и положительно – с максимумом интенсивности индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции ($r = 0,37$, $p = 0,026$).

У больных хроническим аднекситом относительное количество $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов отрицательно коррелирует с индексом активации по люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов ($r = -0,35$, $p = 0,024$). В то же время про-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ Th- И Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ И ХРОНИЧЕСКИМ АДНЕКСИТОМ (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONTENTS OF Th- AND T-REGULATORY CELLS IN BLOOD IN PATIENTS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS AND CHRONIC ADNEXITIS (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль, n = 98 Control		Эндометрит, n = 48 Endometritis		Аднексит, n = 41 Adnexitis	
	1		2		3	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	43,0	35,0-48,0	47,55	43,18-53,69	44,8	40,3-48,7
			p ₁ < 0,001			
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,83	0,56-1,16	1,02	0,85-1,26	0,87	0,74-1,13
			p ₁ = 0,001		p ₂ = 0,049	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD62L ⁺ , %	29,4	24,6-35,88	38,1	30,5-43,2	34,2	28,6-37,2
			p ₁ < 0,001		p ₂ = 0,008	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD62L ⁺ , 10 ⁹ /L	0,58	0,43-0,78	1,58	1,18-1,96	1,57	1,22-1,87
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} CD25 ^{High} , %	5,4	4,1-6,7	16,77	13,14-21,05	21,7	16,2-26,1
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,009	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} CD25 ^{High} , 10 ⁹ /L	0,10	0,07-0,14	0,35	0,25-0,52	0,44	0,30-0,63
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} CD25 ^{High} CD62L ⁺ , %	3,8	2,9-4,87	10,8	7,3-14,9	12,01	7,84-15,04
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} CD25 ^{High} CD62L ⁺ , 10 ⁹ /L	0,07	0,05-0,10	0,26	0,14-0,35	0,23	0,14-0,34
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	

Примечание. p₁ – статистически значимые различия с контрольными показателями; p₂ – -/- с показателями больных эндометритами.

Note. p₁, statistically significant differences versus controls; p₂, statistically significant differences versus patients with endometritis.

центный уровень CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High} клеток уже положительно взаимосвязан с временем выхода на максимум индуцированной люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов (r = 0,37, p = 0,017 и r = 0,32, p = 0,038 соответственно). Относительное количество CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}CD62L⁺ клеток положительно взаимосвязано с большинством хемилюминесцентных показателей нейтрофилов: максимумами интенсивности спонтанной и индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции (r = 0,47, p = 0,002 и r = 0,45, p = 0,003 соответственно), площадью под кривой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции (r = 0,46, p = 0,002, в обоих случаях), временем выхода на максимум индуцированной люцигенин-зависимой и люминол-зависимой хемилюминесценции (r = 0,32, p = 0,039 и r = 0,47, p = 0,002 соответственно), а также с максимумом интенсивности и площадью под кривой спонтанной и индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции (r = 0,45, p = 0,003, r = 0,47, p = 0,002, r = 0,56, p < 0,001

и r = 0,52, p < 0,001 соответственно). Абсолютный уровень CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}CD62L⁺ лимфоцитов также положительно коррелирует со следующими хемилюминесцентными показателями нейтрофилов: максимумом интенсивности и площадью под кривой спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции (r = 0,39, p = 0,015 и r = 0,38, p = 0,019 соответственно), площадью под кривой зимозан-индуцированной хемилюминесценции (r = 0,32, p = 0,048), временем выхода на максимум спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции (r = 0,45, p = 0,005), а также с максимумом интенсивности и площадью под кривой спонтанной и индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции (r = 0,38, p = 0,020, r = 0,46, p = 0,004, r = 0,39, p = 0,015 и r = 0,38, p = 0,018 соответственно).

Обсуждение

Т-хелперы являются наиболее многочисленной субпопуляцией Т-лимфоцитов, осуществляющих стимулирование развития адаптивных иммунных реакций при инфекционных

ТАБЛИЦА 2. ЛЮЦИГЕНИН-ЗАВИСИМАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ И ХРОНИЧЕСКИМ АДНЕКСИТОМ (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. LUCIGENIN-DEPENDENT CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS AND CHRONIC ADNEXITIS (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Контроль, n = 98 Control		Эндометрит, n = 48 Endometritis		Аднексит, n = 41 Adnexitis	
	1		2		3	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Spontaneous lucigenin-dependent chemiluminescence						
Tmax, sec.	2093	1425-2881	1456	1169-1788	1174	1083-1512
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,038	
Imax, o.e. × 10 ³ Imax, conv. units × 10 ³	7,74	2,61-16,54	21,12	9,42-38,99	6,90	1,77-16,23
			p ₁ < 0,001		p ₂ < 0,001	
S, o.e. × sec. × 10 ⁷ S, conv. units × sec. × 10 ⁷	1,52	0,40-4,11	3,70	1,64-6,29	0,85	0,23-1,82
			p ₁ = 0,001		p ₁ = 0,022 p ₂ < 0,001	
Зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced lucigenin-dependent chemiluminescence						
Tmax, sec.	1738	1389-2331	1370	1190-1556	1195	1028-1552
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	
Imax, o.e. × 10 ³ Imax, conv. units × 10 ³	14,14	7,59-28,96	29,39	17,35-47,53	8,34	3,66-23,47
			p ₁ < 0,001		p ₁ = 0,034 p ₂ < 0,001	
S, o.e. × sec. × 10 ⁷ S, conv. units × sec. × 10 ⁷	2,52	1,07-6,46	4,50	2,68-7,02	0,98	0,41-2,79
			p ₁ = 0,041		p ₁ = 0,001 p ₂ < 0,001	
Синд./ Спонт. S _{ind} /S _{sp}	1,77	1,17-3,11	1,48	1,07-1,97	1,57	1,17-1,97
			p ₁ = 0,017			

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As in Table 1. Tmax, time to maximum; Imax, maximum intensity value, reflecting the maximum reactive oxygen species level synthesis; S, area under the curve describing total synthesis of reactive oxygen species during 90 min; S_{ind}/S_{sp} , a ratio between zymosan-induced and spontaneous lucigenin-dependent chemiluminescence.

процессах [7, 8, 11]. В то же время в состав Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$ клетки) входят Treg ($CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$), осуществляющие супрессорное воздействие на развитие Т-клеточного иммунитета [7, 9, 17]. Обнаружено, что у больных хроническим эндометритом в периферической крови повышается содержание как самих Т-хелперов, так и активированных Т-хелперных клеток, экспрессирующих маркер CD62L. CD62L является мембранным гликопротеином, принадлежащим к семейству L-селектинов, который экспрессируется на широком спектре клеток иммунной системы, лигандами для него являются CD34 на эндотелии сосудов, GlyCAM-1 на HEV (high endothelial venules)

лимфоузлов и MadCAM-1 на эндотелиальных клетках GALT (gut associated lymphoid tissues) [14, 24]. Рецептор обеспечивает слабые межклеточные взаимодействия, благодаря которым движение клеток вдоль сосудистой стенки замедляется и происходит их экстравазация и «хоуминг» в периферические лимфоидные органы. У больных хроническими аднекситами количество Т-хелперов в периферической крови соответствует контрольному диапазону, тогда как абсолютное содержание активированных Т-хелперов также повышено. Уровень Treg и активированных Т-регуляторных клеток (экспрессирующих CD62L) в крови у больных хроническим эндометритом и аднекситом повышено относительно

ТАБЛИЦА 3. ЛЮМИНОЛ-ЗАВИСИМАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ И ХРОНИЧЕСКИМ АДНЕКСИТОМ (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. LUMINOL-DEPENDENT CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS AND CHRONIC ADNEXITIS (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Контроль, n = 98 Control		Эндометрит, n = 48 Endometritis		Аднексит, n = 41 Adnexitis	
	1		2		3	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция Spontaneous lucigenin-dependent chemiluminescence						
Tmax, sec.	969	567-1559	1216	322-1657	246	171-866
					p _{1,2} < 0,001	
Imax, o.e. × 10 ³ Imax, conv. units × 10 ³	10,83	4,06-30,88	67,08	22,11-86,83	44,41	11,92-83,87
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	
S, o.e. × sec. × 10 ⁷ S, conv. units × sec. × 10 ⁷	1,49	0,45-5,09	11,10	3,79-15,16	4,39	1,09-9,32
			p ₁ < 0,001		p ₁ = 0,018 p ₂ = 0,008	
Зимозан-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced lucigenin-dependent chemiluminescence						
Tmax, sec.	1072	796-1459	1116	521-1700	815	213-1088
					p _{1,2} < 0,001	
Imax, o.e. × 10 ³ Imax, conv. units × 10 ³	21,25	7,55-62,59	103,14	42,68-128,37	47,22	16,04-116,16
			p ₁ < 0,001		p ₁ = 0,020	
S, o.e. × sec. × 10 ⁷ S, conv. units × sec. × 10 ⁷	2,43	0,92-8,42	17,92	9,41-22,27	6,46	2,66-16,76
			p ₁ < 0,001		p ₁ = 0,024 p ₂ = 0,003	
Синд./ Спонт. S _{ind} /S _{sp}	1,89	1,34-2,87	1,61	1,27-2,14	1,69	1,28-2,57

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As in Table 1.

но контрольных значений. Можно предположить, что повышенное количество Т-хелперов, как не экспрессирующих, так и экспрессирующих CD62L-рецептор, у больных хроническим эндометритом определяется высоким уровнем Treg. При этом регуляторная активность Т-лимфоцитов при хронических аднекситах превалирует, так как при данном заболевании не наблюдается повышенного уровня Т-хелперов.

Состояние респираторного взрыва нейтрофилов определяется уровнями синтеза первичных и вторичных АФК и опосредует процессы фагоцитоза и киллинга [3, 6, 16]. Интенсивность респираторного взрыва была исследована с помощью двух хемилюминесцентных индикаторов: люцигенина и люминола. Люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием суперок-

сид-радикала, который определяется как первичная АФК и синтезируется в системе НАДФН-оксидазы [4, 6, 28]. Люцигенин не проходит через мембрану клеток и связывается с супероксид-радикалом только во внеклеточном пространстве. Соответственно, исследование люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов позволяет охарактеризовать состояние активности НАДФН-оксидазы и уровень выделения супероксид-радикала для реализации механизма внешнего киллинга в обследуемых группах.

Обнаружено, что уровень синтеза супероксид-радикала нейтрофилами крови в группах обследуемых больных значительно различается. Так, у больных хроническим эндометритом установлено повышение активности НАДФН-оксидазы в нейтрофилах, находящихся в состоянии отно-

сительного покоя (спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция) и при дополнительной антигенной индукции респираторного взрыва (зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция). Однако повышение интенсивности синтеза супероксид-радикала нейтрофилами при дополнительной антигенной индукции у пациентов данной группы относительно контрольных значений менее выражено, чем для клеток, находящихся в состоянии относительного покоя, что определяется снижением величины индекса активации (Синд./Спонт.). Индекс активации характеризует уровень метаболических резервов клеток, необходимых для реализации респираторного взрыва при дополнительной антигенной индукции [3]. Соответственно, можно заключить, что у больных хроническим эндометритом наблюдается истощение метаболических резервов для активации НАДФН-оксидазы в активированных нейтрофилах крови. Кроме того, у больных хроническим эндометритом выявляется сокращение времени выхода на максимум спонтанной и индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Данный показатель характеризует скорость развития респираторного взрыва от момента регуляторного или антигенного воздействия на клетку до максимальной активации ферментов, синтезирующих АФК [4]. Следовательно, синтез первичных АФК в нейтрофилах крови при хроническом эндометрите осуществляется с ускорением, характерным для активированных клеток, но при истощении метаболических резервов для стимулированной активации НАДФН-оксидазы.

В то же время у больных хроническим аднекситом обнаружено снижение активности НАДФН-оксидазы (как относительно контрольного диапазона, так и значений, выявленных у пациентов с хроническим эндометритом) в нейтрофилах крови, находящихся в состоянии относительного покоя и при дополнительной антигенной стимуляции. При этом также выявляется сокращение времени выхода на максимум спонтанной и индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Следовательно, при хроническом аднексите выявляется истощение метаболических резервов для активации НАДФН-оксидазы, что проявляется в снижении интенсивности люцигенин-зависимой хемилюминесценции и сокращении времени ее выхода на максимум.

Формирование пула вторичных АФК в нейтрофилах осуществляется целым комплексом ферментов: супероксиддисмутаза, каталаза, миелопероксидаза и др. [3, 13]. Для оценки интенсивности синтеза вторичных АФК нейтрофилами крови нами использовалась люминол-зависимая

хемилюминесценция. Люминол также способен проходить через клеточные мембраны и вступать в хемилюминесцентную реакцию, как с первичными, так и вторичными АФК внутри клетки [3, 31].

Обнаружено, что у больных хроническими эндометритом и аднекситом в нейтрофилах крови повышен уровень синтеза вторичных АФК, как для клеток, находящихся в состоянии относительного покоя, так и при дополнительной антигенной индукции респираторного взрыва. Однако при хроническом аднексите выявляется менее выраженное относительно контрольного диапазона увеличение интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции по сравнению с выявленным при хроническом эндометрите. При этом у пациентов с хроническим аднекситом наблюдается сокращение времени выхода на максимум люминол-зависимой хемилюминесценции.

С помощью корреляционного анализа установлены особенности взаимосвязи содержания Th-клеток и Treg в крови с интенсивностью респираторного взрыва нейтрофилов. Так, у здоровых людей уровень Treg в крови находится в отрицательной зависимости с уровнем максимальной активности НАДФН-оксидазы, тогда как повышение количества активированных Th-клеток и Treg в крови сокращает время активации данного фермента в нейтрофильных гранулоцитах.

У больных хроническим эндометритом также обнаружена взаимосвязь, характеризующая ускорение активации НАДФН-оксидазы нейтрофильных гранулоцитов с повышением содержания активированных Th-клеток в крови. Кроме того, повышение уровня данной фракции Т-лимфоцитов в периферической крови также приводит к увеличению интенсивности респираторного взрыва нейтрофилов за счет зимозан-индуцированного синтеза вторичных АФК.

У больных хроническим аднекситом количество Th-клеток отрицательно взаимосвязано с индексом активации нейтрофилов по люминол-зависимой хемилюминесценции, тем самым определяя, что стимулирующее влияние Т-хелперов на нейтрофилы может проявляться и в истощении метаболических резервов для реализации респираторного взрыва. При этом у пациентов данной группы выявлены многочисленные и тесные положительные взаимосвязи между количеством неактивированных и активированных Treg и практически всеми показателями респираторного взрыва нейтрофилов.

Известно, что трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), являясь одним из основных цитокинов Treg, ингибирует хемокин-индуцированную активацию нейтрофилов, снижает

мигрирующую способность клеток [10]. Механизм действия TGF- β на нейтрофилы осуществляется через ингибирование Ras-зависимого протеина, стимулирующего CalDAG-гуанин нуклеотидный обмен, что и приводит к снижению экспрессии интегринов. В то же время через PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase/serine/threonine-specific protein kinase) и MAPK (mitogen-activated protein kinase) сигнальные пути TGF- β стимулирует экспрессию АФК-продуцирующих ферментов [12, 15, 25], что и проявляется в увеличении синтеза АФК.

Таким образом, при хроническом эндометрите и аднексите установлены характерные для каждого заболевания изменения в количестве Th-клеток и Treg в периферической крови, а также изменения показателей респираторного взрыва нейтрофилов. При хроническом эндометрите установлено повышение количества в крови неактивированных и активированных Th-клеток и Treg. Высокая интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов определяется повышением уровня синтеза первичных и вторичных АФК. Однако длительный инфекционно-воспалительный процесс при хроническом эндометрите приводит к истощению метаболических резервов нейтрофильных гранулоцитов для синтеза первичных АФК. При данном заболевании с показателями респираторного взрыва нейтрофилов взаимосвязаны только активированные Th-клетки (экспрессирующие CD62L), что реализуется в сокращении времени активации НАДФН-оксидазы и стимулировании антиген-индуцированного синтеза вторичных АФК.

У больных хроническим аднекситом содержание Th-клеток в периферической крови соответствует контрольному диапазону, тогда как количество Treg, а также активированных Th-клеток и Treg, значительно превышает контрольный диапазон. Обнаружено, что у больных хроническим аднекситом респираторный взрыв нейтрофилов реализуется при дисбалансе синтеза первичных и вторичных АФК: при сниженной активности НАДФН-оксидазы наблюдается высокий уровень синтеза вторичных АФК. С помощью корреляционного анализа установлено, что при хроническом аднексите имеется единственная взаимосвязь между уровнем Т-хелперов и показателями респираторного взрыва нейтрофилов, характеризующая отрицательное влияние Th-клеток на индекс активации нейтрофилов. В то же время при данном заболевании обнаружены многочисленные и тесные положительные взаимосвязи между количеством неактивированных и активированных Treg и практически всеми показателями респираторного взрыва нейтрофилов. В целом регуляторное действие Treg на нейтрофилы может реализоваться через различные сигнальные пути, что при хроническом аднексите выражается в стимулирующем действии Treg на респираторный взрыв нейтрофилов. Однако длительное стимулирующее воздействие Th-клеток и Treg на нейтрофильные гранулоциты приводит к истощению метаболических резервов для реализации респираторного взрыва, что и является одним из механизмов иммунопатогенеза, способствующих хронизации инфекционно-воспалительного процесса.

Список литературы / References

1. Борисов А.Г., Савченко А.А., Соколовская В.К. Заболеваемость, связанная с нарушениями функции иммунной системы (на примере Красноярского края) // Здравоохранение Российской Федерации, 2014. Т. 58, № 6. С. 38-41. [Borisov A.G., Savchenko A.A., Sokolovskaya V.K. The morbidity related to disorders of immune system function as exemplified by the Krasnoyarsk region. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii = Healthcare of the Russian Federation*, 2014, Vol. 58, no. 6, pp. 38-41. (In Russ.)]
2. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
3. Савченко А.А., Здитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Новосибирск: Наука, 2013. 142 с. [Savchenko A.A., Zdzitoveckij D.E., Borisov A.G. The immune and metabolic disorders by the widespread purulent peritonitis]. Novosibirsk: Science, 2013. 142 p.
4. Савченко А.А., Здитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилуминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов и уровни концентрации цитокинов у больных распространенным гнойным перитонитом // Цитокины и воспаление, 2013. Т. 12, № 1-2. С. 115-119. [Savchenko A.A., Zdzitoveckij D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes and cytokine concentrations in patients with advanced purulent peritonitis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, Vol. 12, no. 1-2, pp. 115-119. (In Russ.)]

5. Савченко А.А., Каспаров Э.В., Арутюнян С.С., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Мошев А.В. Фенотипический состав В-лимфоцитов у женщин с хроническим эндометритом и аднекситом // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 379-384. [Savchenko A.A., Kasparov E.V., Arutyunyan S.S., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V. Phenotypic profile of B-lymphocytes in women with chronic endometritis and adnexitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 379-384. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2016-4-379-384.
6. Шкапова Е.А., Куртасова Л.М., Савченко А.А. Показатели люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у больных раком почки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2010. Т. 149, № 2. С. 201-203. [Shkapova E.A., Kurtasova L.M., Savchenko A.A. The indicators of the lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence of blood neutrophils by the patients with kidney cancer. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol. 149, no. 2, pp. 201-203. (In Russ.)]
7. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
8. Aberle J.H., Schwaiger J., Aberle S.W., Stiasny K., Scheinost O., Kundi M., Chmelik V., Heinz F.X. Human CD4⁺ T Helper Cell Responses after Tick-Borne Encephalitis Vaccination and Infection. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 10, e0140545. doi: 10.1371/journal.pone.0140545.
9. Alroqi F.J., Chatila T.A. T Regulatory cell biology in health and disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2016, Vol. 16, no. 4, p. 27.
10. Artz A., Butz S., Vestweber D. GDF-15 inhibits integrin activation and mouse neutrophil recruitment through the ALK-5/TGF- β RII heterodimer. *Blood*, 2016, Vol. 128, no. 4, pp. 529-541.
11. Bouchery T., Kyle R., Ronchese F., Le Gros G. The differentiation of CD4(+) T-Helper Cell Subsets in the Context of Helminth Parasite Infection. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 487.
12. Das S.J., Lovicu F.J., Collinson E.J. Nox4 Plays a Role in TGF- β -dependent lens epithelial to mesenchymal transition. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2016, Vol. 57, no. 8, pp. 3665-3673.
13. Douillard S., Rozec B., Bigot E., Aillet L., Patrice T. Secondary reactive oxygen species production after PDT during pulmonary tumor growth in sera of nude mice. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2013, Vol. 10, no. 1, pp. 62-71.
14. Florek M., Schneidawind D., Pierini A., Baker J., Armstrong R., Pan Y., Leveson-Gower D., Negrin R., Meyer E. Freeze and thaw of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells results in loss of CD62L expression and a reduced capacity to protect against graft-versus-host disease. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 12, e0145763. doi: 10.1371/journal.pone.0145763
15. Ge A., Ma Y., Liu Y.N., Li Y.S., Gu H., Zhang J.X., Wang Q.X., Zeng X.N., Huang M. Diosmetin prevents TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition via ROS/MAPK signaling pathways. *Life Sci.*, 2016, Vol. 153, pp. 1-8.
16. Kazumura K., Sato Y., Satozono H., Koike T., Tsuchiya H., Hiramatsu M., Katsumata M., Okazaki S. Simultaneous monitoring of superoxides and intracellular calcium ions in neutrophils by chemiluminescence and fluorescence: evaluation of action mechanisms of bioactive compounds in foods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2013, Vol. 84, pp. 90-96.
17. Khan M.A., Moez S., Akhtar S. T-regulatory cell-mediated immune tolerance as a potential immunotherapeutic strategy to facilitate graft survival. *Blood Transfus.*, 2013, Vol. 11, no. 3, pp. 357-363.
18. Lavoie-Lamoureux A., Moran K., Beauchamp G., Mauel S., Steinbach F., Lefebvre-Lavoie J., Martin J.G., Lavoie J.P. IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release *ex vivo*. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2010, Vol. 299, no. 4, pp. L472-L482.
19. Lewkowicz N., Klink M., Mycko M.P., Lewkowicz P. Neutrophil – CD4⁺CD25⁺ T regulatory cell interactions: a possible new mechanism of infectious tolerance. *Immunobiology*, 2013, Vol. 218, no. 4, pp. 455-464.
20. Lewkowicz P., Lewkowicz N., Sasiak A., Tchórzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 10, pp. 7155-7163.
21. Li H., Zhao Y., Li W., Yang J., Wu H. Critical role of neutrophil alkaline phosphatase in the antimicrobial function of neutrophils. *Life Sci.*, 2016, Vol. 157, pp. 152-157.
22. Luider J.I., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *Lab. Hematol.*, 2004, Vol. 10, pp. 102-108.
23. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.
24. Mahnke K., Useliene J., Ring S., Kage P., Jendrossek V., Robson S.C., Bylaite-Bucinskiene M., Steinbrink K., Enk A.H. Down-Regulation of CD62L Shedding in T Cells by CD39(+) Regulatory T Cells Leads to Defective Sensitization in Contact Hypersensitivity Reactions. *J. Invest. Dermatol.*, 2017, Vol. 137, no. 1, pp. 106-114.
25. Moreno-Càceres J., Mainez J., Mayoral R., Martín-Sanz P., Egea G., Fabregat I. Caveolin-1-dependent activation of the metalloprotease TACE/ADAM17 by TGF- β in hepatocytes requires activation of Src and the NADPH oxidase NOX1. *FEBS J.*, 2016, Vol. 283, no. 7, pp. 1300-1310.
26. Papadaki G., Kambas K., Choulaki C., Vlachou K., Drakos E., Bertsias G., Ritis K., Boumpas D.T., Thompson P.R., Verginis P., Sidiropoulos P. Neutrophil extracellular traps exacerbate Th1-mediated auto-

immune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, no. 11, pp. 2542-2554.

27. Pham van L., Germaud N., Ramadan A., Thieblemont N. MyD88 modulates eosinophil and neutrophil recruitment as well as IL-17A production during allergic inflammation. *Cell. Immunol.*, 2016, Vol. 310, pp. 116-122.

28. Rezende F., Prior K.K., Löwe O., Wittig I., Strecker V., Moll F., Helfinger V., Schnütgen F., Kurrle N., Wempe F., Walter M., Zukunft S., Luck B., Fleming I., Weissmann N., Brandes R.P., Schröder K. Cytochrome P450 enzymes but not NADPH oxidases are the source of the NADPH-dependent lucigenin chemiluminescence in membrane assays. *Free Radic. Biol. Med.*, 2017, Vol. 102, pp. 57-66.

29. Takele Y., Adem E., Getahun M., Tajebe F., Kiflie A., Hailu A., Raynes J., Mengesha B., Ayele T.A., Shkedy Z., Lemma M., Diro E., Toulza F., Modolell M., Munder M., Müller I., Kropf P. Malnutrition in healthy individuals results in increased mixed cytokine profiles, altered neutrophil subsets and function. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 8, e0157919. doi: 10.1371/journal.pone.0157919.

30. Tan S.Y., Weninger W. Neutrophil migration in inflammation: intercellular signal relay and crosstalk. *Curr. Opin. Immunol.*, 2016, Vol. 44, pp. 34-42.

31. Trujillo M. Analysis of the Immunity-related oxidative bursts by a luminol-based assay. *Methods Mol. Biol.*, 2016, Vol. 1398, pp. 323-329.

32. Wadhwa N., Raoot A. An unusual case of adult filarial oophoritis. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 2011, Vol. 30, no. 6, pp. 549-552.

33. Yasui T., McCann K., Gilbert R.O., Nydam D.V., Overton T.R. Associations of cytological endometritis with energy metabolism and inflammation during the periparturient period and early lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2014, Vol. 97, no. 5, pp. 2763-2770.

34. Zhang Z., Zhong W., Spencer D., Chen H., Lu H., Kawaguchi T., Rosenbaum J.T. Interleukin-17 causes neutrophil mediated inflammation in ovalbumin-induced uveitis in DO11.10 mice. *Cytokine*, 2009, Vol. 46, no. 1, pp. 79-91.

Авторы:

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; заведующий кафедрой физиологии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Каспаров Э.В. — д.м.н., профессор, директор Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера, заместитель директора ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Арутюнян С.С. — врач гинекологического отделения Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия

Authors:

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

Kasparov E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Medical Problems of the North, Deputy Director, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Arutyunyan S.S., Physician, Department of Gynecology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

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

Гвоздев И.И. — младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Мошев А.В. — младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North; Assistant Professor, Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

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

Поступила 25.03.2017
Принята к печати 02.05.2017

Received 25.03.2017
Accepted 02.05.2017

СВЯЗЬ ВАРИАБЕЛЬНОГО САЙТА *rs1041981* ГЕНА ЛИМФОТОКСИНА- α С РАЗВИТИЕМ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ИСХОДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ БЕЗ ПОДЪЕМА СЕГМЕНТА ST В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ

Шмидт Е.А.¹, Бернс С.А.^{1,3}, Жидкова И.И.¹, Макеева О.А.¹,
Гончарова И.А.¹, Нагирняк О.А.¹, Клименкова А.В.²,
Литвинова М.Н.², Барбараш О.Л.¹

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

² ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени
академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

³ ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени
А.И. Евдокимова», Москва, Россия

Резюме. Лимфотоксин- α (LTA) является одним из важнейших провоспалительных цитокинов, продуцируемых на ранних стадиях сосудистых воспалительных процессов, тем самым принимая участие в формировании атеросклеротического поражения артерий и развитии ишемической болезни сердца. Функциональные изменения в гене, кодирующем продукцию LTA, могут влиять на развитие ишемической болезни сердца с неблагоприятным течением данного заболевания. Однако результаты проведенных исследований по выявлению ассоциаций варибельного сайта *rs1041981* (C-804A) гена *LTA* с развитием острого нарушения мозгового кровообращения, инфаркта миокарда и степенью выраженности атеросклеротического поражения коронарных артерий противоречивы. Целью нашего исследования явилось изучение ассоциации варибельного сайта *rs1041981* гена *LTA* с развитием неблагоприятных исходов в течение пяти лет наблюдения у пациентов, перенесших острый коронарный синдром без подъема сегмента ST (ОКСбпST). В исследование было включено 178 пациентов с ОКСбпST из данных регистра, сформированного на базе Кемеровского кардиологического центра. Проведено генотипирование варибельного сайта *rs1041981* гена *LTA* методом TaqMan-проб на приборе «iCycler iQ» (BIO-RAD, США). Распределения генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие ожидаемым при равновесии Харди–Вайнберга с помощью критерия χ^2 . Установлено, что аллель А ($p = 0,02$) и генотип А/А ($p = 0,036$) варибельного сайта *rs1041981* гена *LTA* ассоциированы с развитием неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов в течение пяти лет наблюдения. У пациентов с генотипом А/А варибельного сайта *rs1041981* гена *LTA* в 3,8 раза чаще

Адрес для переписки:

Шмидт Евгения Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.
Тел.: 8 (3842) 64-45-71.
E-mail: e.a.shmidt@mail.ru, shmidt@kemcardio.ru

Address for correspondence:

Shmidt Evgeniya A.
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular
Diseases
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy Blvrd, 6.
Phone: 7 (3842) 64-45-71.
E-mail: e.a.shmidt@mail.ru, shmidt@kemcardio.ru

Образец цитирования:

Е.А. Шмидт, С.А. Бернс, И.И. Жидкова, О.А. Макеева,
И.А. Гончарова, О.А. Нагирняк, А.В. Клименкова,
М.Н. Литвинова, О.Л. Барбараш «Связь варибельного
сайта *rs1041981* гена лимфотоксина- α с развитием
неблагоприятных исходов у пациентов с острым
коронарным синдромом без подъема сегмента ST
в отдаленном периоде» // Медицинская иммунология, 2018.
Т. 20, № 1. С. 73–84. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-73-84
© Шмидт Е.А. и соавт., 2018

For citation:

E.A. Shmidt, S.A. Berns, I.I. Zhidkova, O.A. Makeeva,
I.A. Goncharova, O.A. Nagirnyak, A.V. Klimenkova,
M.N. Litvinova, O.L. Barbarash "Association of a
lymphotoxin- α variable site *rs1041981* with development of
long-term unfavorable outcomes in patients with acute coronary
syndrome without ST-segment elevation", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 1,
pp. 73–84. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-73-84
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-73-84

развиваются неблагоприятные сердечно-сосудистые исходы по сравнению пациентами, имеющими генотип А/С или С/С. Носительство аллеля А *rs1041981* гена *LTA* почти в два раза увеличивает риск развития неблагоприятного сердечно-сосудистого события у пациентов с ОКСбпСТ в отдаленном периоде. С помощью метода Каплана–Мейера определено, что дожитие до первой конечной точки чаще происходило у носителей генотипа А/А *rs1041981* гена *LTA*. При объединении генотипов А/С и С/С в одну группу также наиболее значимым ($p = 0,016$) в отношении развития неблагоприятных исходов был генотип А/А *rs1041981* гена *LTA*. Таким образом, у пациентов с ОКСбпСТ аллель А и генотип А/А варибельного сайта *rs1041981* гена *LTA* ассоциированы с развитием неблагоприятных кардиоваскулярных событий в течение пятилетнего периода после индексного события.

Ключевые слова: пятилетний прогноз, ОКСбпСТ, неблагоприятный исход, варибельность генов, *rs1041981* гена лимфотоксина- α , *LTA*

ASSOCIATION OF A LYMPHOTOXIN- α VARIABLE SITE *rs1041981* WITH DEVELOPMENT OF LONG-TERM UNFAVORABLE OUTCOMES IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME WITHOUT ST-SEGMENT ELEVATION

Shmidt E.A.^a, Berns S.A.^{a, c}, Zhidkova I.I.^a, Makeeva O.A.^a,
Goncharova I.A.^a, Nagirnyak O.A.^a, Klimenkova A.V.^b, Litvinova M.N.^b,
Barbarash O.L.^a

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

^b Kemerovo L.S. Barbarash Regional Clinical Cardiac Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^c Moscow State A.I. Evdokimov University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

Abstract. Lymphotoxin- α (LTA) is a major pro-inflammatory cytokine produced at the early stages of vascular inflammation, taking part in the formation of arterial atherosclerosis and development of coronary heart disease. Functional changes in the gene encoding LTA production may influence the development of coronary heart disease with unfavorable progression. However, studies for associations between *rs1041981* (C-804A) *LTA* gene variant and development of acute cerebrovascular accidents, myocardial infarction, and severity of coronary atherosclerosis have yielded contradictory results. The purpose of our study was to investigate an association of *rs1041981* gene *LTA* with risk of adverse events within five years of follow-up in the patients with acute coronary syndrome without ST elevation ST (nonST-ACS). 178 patients with nonST-ACS from the Kemerovo Cardiology Center Registry were included into the study. Genotyping of *rs1041981* site variable *LTA* gene was performed by TaqMan technique using an “iCycler iQ” device (BIO-RAD, USA). Results: we have found that the A allele and A/A genotype polymorphism in *LTA* gene (*rs1041981*) have been associated with development of adverse cardiovascular events over five years of observation (respective p levels were 0.02 and 0.036). In patients with A/A genotype, the *rs1041981* polymorphism in *LTA* gene was associated with 3.8-fold increase in adverse cardiovascular events, compared to patients having A/C or C/C genotype. Carriage of A allele in *LTA* gene (*rs1041981*) doubles the risk of adverse cardiovascular events in patients with nonST-ACS at long observation terms. By means of Kaplan-Meier method, we have determined that survival to the first endpoint occurred more often in carriers of the genotype A/A of *LTA* gene (*rs1041981*). The A/A genotype of *LTA* gene (*rs1041981*) proved to be more significant ($p = 0.016$) for development of adverse outcomes, when combining the patients with A/C and C/C genotypes. One may draw a conclusion that A allele and A/A genotype of *rs1041981* *LTA* polymorphism is associated with development of adverse cardiovascular events during the five-year period following the index event in patients with nonST-ACS.

Keywords: five-year prognosis, nonST-ACS, adverse events, variable gene sites, *rs1041981* gene *LTA*

Сокращения: АГ — артериальная гипертония; АНК — артерии нижних конечностей; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота; ИБС — ишемическая болезнь сердца; ИМ — инфаркт миокарда; ИМбпST — инфаркт миокарда без подъема сегмента ST; ИМТ — индекс массы тела; КА — коронарная артерия; КАГ — коронароангиография; КК-МВ — МВ изофермент креатинкиназы; ККТ — композитные конечные точки; КШ — коронарное шунтирование; НС — нестабильная стенокардия; ОКС — острый коронарный синдром; ОКСбпST — острый коронарный синдром без подъема сегмента ST; ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения; ОР — относительный риск; ОСН — острая сердечная недостаточность; ПИКС — постинфарктный кардиосклероз; СД 2 типа — сахарный диабет; СКФ — скорость клубочковой фильтрации; ТП — трепетание предсердий; ФВ ЛЖ — фракция выброса левого желудочка; ФП — фибрилляция предсердий; ХСН — хроническая сердечная недостаточность; ЧКВ — чрескожное коронарное вмешательство; ЭКГ — электрокардиография; ЭХОКГ — эхокардиография; GRACE — Global Registry of Acute Coronary Events; *LTA* — ген лимфотоксина-α; MRDRD — Modification of diet in renal disease; Q_{0,25} — 25-й квартиль; Q_{0,75} — 75-й квартиль; Syntax Score — Systematic Coronary Risk Evaluation.

Введение

Наиболее распространенной причиной госпитализации пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) является острый коронарный синдром (ОКС), причем в большей степени — ОКС без подъема сегмента ST (ОКСбпST) [16]. Больные ОКСбпST представляют гетерогенную по прогнозу группу: у одних данное заболевание может протекать весьма благоприятно, у других же — сопровождаться высокой смертностью. Актуальным в настоящее время является вопрос о прогнозировании неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов при ОКСбпST, при этом знание генетических факторов имеет важное прогностическое значение.

Лимфотоксин-α (*LTA*) является одним из важнейших провоспалительных цитокинов, продуцируемых на ранних стадиях сосудистых воспалительных процессов, тем самым принимая участие в формировании атеросклеротического поражения артерии и развитии ИБС [2]. Атерогенные эффекты *LTA* связаны с активацией некоторых хемокинов (RANTES, IP-10, MCP-1, BLC, SLC, ELC) и молекул клеточной адгезии (VCAM, ICAM, E-selectin, MAdCAM-1) в эндотелиальных клетках [8].

Функциональные изменения в гене, кодирующем продукцию *LTA*, могут влиять на развитие

воспаления в стенке сосудов и, тем самым, повышать приверженность носителя к атеросклеротическому поражению и развитию ИБС с неблагоприятным течением данного заболевания. Однако результаты проведенных исследований по выявлению ассоциаций варибельного сайта *rs1041981* (C-804A) *LTA* с развитием острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), инфаркта миокарда (ИМ) и степенью выраженности атеросклеротического поражения коронарных артерий (КА) противоречивы. По результатам одних исследований, варибельный сайт *rs1041981* гена *LTA* не ассоциирован с коронарным атеросклерозом и развитием ИМ [4, 5, 10, 11, 17], в ряде других публикаций показано, что аллель 804A ассоциирован с острыми формами ИБС [7, 9, 12, 13, 14]. Учитывая значительное количество публикаций, освещающих неблагоприятную роль носительства аллеля А варибельного сайта *rs1041981* гена *LTA*, целесообразно изучение влияния данного гена с неблагоприятным течением ИБС.

Цель исследования — изучение ассоциации варибельного сайта *rs1041981* гена *LTA* с развитием неблагоприятных исходов в течение пяти лет наблюдения у пациентов, перенесших острый коронарный синдром без подъема сегмента ST.

Материалы и методы

С 2009 года в Научно-исследовательском институте комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний на базе МБУЗ «Кемеровский кардиологический диспансер» создан регистр, в который включались пациенты с ОКСбпST. За период с 15.01.2009 по 28.12.2009 в регистр включено 415 последовательно госпитализированных пациентов с ОКСбпST. Критериями включения участников исследования являлись: 1) подписанная пациентом форма информированного согласия на участие в исследовании; 2) возраст старше 18 лет; 3) возникшие в течение 48 часов до госпитализации Q-необразующий ИМ или нестабильная стенокардия (НС). Критерием исключения явился ОКСбпST, осложнившийся чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ) или коронарное шунтирование (КШ), а также наличие острых или обострение хронических воспалительных заболеваний, почечной и печеночной недостаточности, заболеваний легких и онкологической патологии. Протокол данного исследования одобрен локальным этическим комитетом. Схема обследования пациентов включала: сбор анамнеза и жалоб, объективный осмотр кардиолога, в последующем записывалась электрокардиография (ЭКГ) в 16 отведениях на скорости 50 мм/с, определялись в крови кардиоспецифические маркеры тропонин-Т, МВ

изофермент креатинфосфокиназы (КФК-МВ), показатели общего и биохимического анализов крови, осуществлялся контроль показателей системной гемодинамики, проводилось эхокардиографическое (ЭХОКГ) исследование с определением зон гипо- и акинезии, фракции выброса левого желудочка (ФВЛЖ). В случае подписания информированного согласия пациенту проводилась диагностическая коронарография (КАГ) с последующим ЧКВ по показаниям. В условиях стационара все пациенты при отсутствии противопоказаний получали антикоагулянтную, антиагрегантную терапию, бета-блокаторы, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, статины, диуретики, блокаторы медленных кальциевых каналов, антагонисты верошпирона.

Всего в группу пациентов с известным 5-летним прогнозом вошло 385 пациентов, из них 56,8% были мужчинами, медиана возраста составила 61 (55; 69) лет. Соотношение диагнозов ИМбпСТ/НС при выписке имели 50,9/49,1%. У 141 пациента (36,62%) в анамнезе имелся постинфарктный кардиосклероз (ПИКС), у 47 пациентов (12,21%) — ОНМК, 301 (78,18%) пациент имел до включения в регистр стенокардию длительностью два или более месяца. Реваскуляризация ранее проводилась у 60 пациентов (15,6%), из них у 23 (5,9%) — КШ и у 37 (9,6%) — ЧКВ. Сахарный диабет 2 го типа (СД 2 типа) был выявлен у 74 (19,2%), артериальная гипертензия (АГ) — у 346 (89,9%) пациентов. Индекс массы тела (ИМТ) $> 25 \text{ кг/м}^2$ на момент поступления был выявлен у 305 (69,2%) пациентов, 156 человек (40,5%) имели стаж курения. Для проведения генотипирования была сформирована выборка пациентов ($n = 178$) не отличающаяся от общей группы. Характеристика исследуемых групп пациентов по основным клинико-анамнестическим критериям приведена в таблице 1.

Забор крови для определения генетических маркеров производился в течение госпитального периода на 10-13 сутки от момента поступления в стационар. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) выделялась из лейкоцитов крови модифицированным методом фенол/хлороформной экстракции по Т. Маниатис и соавт. [1]. Генотипирование проводили методом TaqMan-проб на приборе “iCycler iQ” (BIO-RAD, США). Полимеразная цепная реакция для TaqMan-генотипирования выполнялась согласно инструкции Applied Biosystems, США. Распределения генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие ожидаемым при равновесии Харди–Вайнберга с помощью критерия χ^2 .

Неблагоприятным исходом считали госпитализации с НС, ИМ, ОНМК и смерть от любых

причин и объединяли понятием «композитная конечная точка» (ККТ). Наличие ККТ отслеживали с момента выписки из стационара. Семь пациентов умерли на стационарном этапе. Поэтому не вошли в дальнейший анализ. В зависимости от наличия неблагоприятного исхода были сформированы 2 группы: группа I ($n = 178$) — пациенты с наличием ККТ и группа II ($n = 200$) — пациенты без развития ККТ в течение пяти лет наблюдения.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ STATISTICA 8.0 for Windows фирмы StatSoft (США), MedCalc Version 16.2.1 фирмы Softwa (Бельгия). Качественные показатели представлены в виде частот и процентов. Количественные показатели представлены в виде медианы с указанием квартильного размаха в скобках ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Сравнение двух групп по количественному признаку проводилось с помощью U-критерия Манна–Уитни. При сравнении групп по качественному показателю использовалось построение таблиц сопряженности с последующим расчетом χ^2 Пирсона. Для прогнозирования выживаемости использовался метод Каплана–Мейера. Рассчитывался относительный риск (ОР) с 95% доверительным интервалом (95%ДИ). Различия в сравниваемых группах считались достоверными при уровне двусторонней статистической значимости (p) менее 0,05.

Результаты

В течение 60 месяцев после выписки из стационара у 178 (47,1%) из 378 пациентов зарегистрировано развитие одной и более конечных точек (КТ). Общая смертность за 60 месяцев наблюдения составила 61 (15,8%) человек, 7 (1,8%) умерли на госпитальном этапе от ИМ, 54 пациента (14,0%) — в течение последующих 60 месяцев, из них 39 (72,2% от умерших) от сердечно-сосудистых заболеваний. За 60 месяцев у 52 (13,8%) человек развился ИМ. У 29 (7,7%) пациентов произошло развитие ОНМК, у 101 (26,7%) пациента были госпитализации с НС. Самая высокая смертность (6,5%), и максимальное число госпитализаций с ИМ (41,1%) и НС (49,6%) были отмечены в течение первых 12 месяцев.

По результатам проведенного анализа пациенты с неблагоприятным исходом были значимо старше, чаще имели ПИКС и проведенное КШ в анамнезе, более высокий балл по шкале GRACE при поступлении в стационар по сравнению с пациентами, характеризующимися благоприятным исходом. У пациентов с наличием ККТ значимо чаще диагностировались ишемические изменения по ЭКГ при поступлении и более низкая ФВ ЛЖ по сравнению с пациентами из группы бла-

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЩЕЙ ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ С ОКС_нST И ГРУППЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF GENERAL nonST-ACS GROUP, AND GENOTYPED PATIENTS

Характеристики Characteristics	Общая группа, General group with nonST-ACS n = 385	Группа генотипирования, Genotyped patients with nonST-ACS n = 178	p
Мужчины, n (%) Males, n (%)	222 (57,7)	95 (53,4)	0,34
Возраст, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}), лет Age, Mediane (Q _{0,25} -Q _{0,75}), years	61 (55; 69)	60 (54; 69)	0,87
Диагноз при выписке ИМ, n (%) Diagnosis of myocardial infarction, n (%)	196 (50,9)	84 (48,3)	0,41
Застойная ХСН в анамнезе, n (%) Congestive heart failure in history, n (%)	65 (16,9)	27 (15,2)	0,61
Стенокардия в анамнезе, n (%) Stable angina pectoris, n (%)	303 (78,1)	135 (75,8)	0,27
ПИКС, n (%) Postinfarction cardiosclerosis, n (%)	141 (36,6)	61 (34,3)	0,59
ОНМК в анамнезе, n (%) Ischemic stroke in history, n (%)	47 (12,2)	26 (14,6)	0,43
АГ в анамнезе, n (%) Arterial hypertension, n (%)	346 (89,9)	156 (87,6)	0,43
СД 2 типа, n (%) Type 2 diabetes, n (%)	74 (19,2)	30 (16,9)	0,5
ЧКВ в анамнезе, n (%) Percutaneous Coronary Intervention in history, n (%)	37 (9,61)	15 (8,4)	0,65
КШ в анамнезе, n (%) Coronary Artery Bypass Graft in history, n (%)	23 (5,9)	10 (5,6)	0,87
Курение, n (%) Smoker, n (%)	156 (40,5)	65 (36,5)	0,37
Класс ОЧН по Killip II-IV, n (%) Acute heart failure Killip II-IV, n (%)	20 (5,2)	9 (5,1)	0,94
ИМТ > 25 кг/м², n (%) Body mass index > 25 kg/m ² , n (%)	305 (79,2)	134 (75,3)	0,29
Синусовый ритм на ЭКГ, n (%) Sinus rhythm, n (%)	339 (88,1)	157 (88,2)	0,96
Ишемические изменения ЭКГ, n (%) Ischemic changes on an electrocardiogram, n (%)	223 (57,9)	96 (53,9)	0,37
ФВ ЛЖ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}), % Left ventricular ejection fraction, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}), %	58 (50; 63)	59 (51; 62)	0,43
ФВ ЛЖ ≤ 40%, n (%) Left ventricular ejection fraction, ≤ 40%, n (%)	43 (10,4)	17 (9,6)	0,58
СКФ MDRD, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}), мл/мин/1,73 м² Glomerular filtration MDRD, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}), ml/min/1,73 m ²	67,9 (55,7; 82,3)	65,4 (54,8; 78,9)	0,95
Шкала GRACE, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}), балл Risk GRACE, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}), points	99 (83; 120)	100 (79; 120)	0,56

Примечание. ХСН – хроническая сердечная недостаточность; ОЧН – острая сердечная недостаточность; СКФ – скорость клубочковой, фильтрации; MDRD – Modification of diet in renal disease, формула расчета СКФ; шкала GRACE – Global Registry of Acute Coronary Events.

Note. MDRD, Modification of diet in renal disease; GRACE, Global Registry of Acute Coronary Events.

ТАБЛИЦА 2. ИСХОДНАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА В ГРУППАХ ПАЦИЕНТОВ С ОКС_нST В ЗАВИСИМОСТИ ОТ 5-ЛЕТНЕГО ИСХОДА

TABLE 2. CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE PATIENTS WITH nonST-ACS IN GROUPS WITH DIFFERENT 5-YEARS OUTCOMES

Параметры Characteristics	Группы Groups		p
	ККТ за 5 лет (I) 5-year adverse events (I) n = 178	Благоприятный исход (II) Favorable outcome (II) n = 200	
Пол мужской, n (%) Male, n (%)	78 (56,18)	118 (59,0)	0,58
Возраст, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), лет Age, Mediane ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), years	62 (57; 70)	60 (53; 67)	0,003
Диагноз ИМ при выписке, n (%) Diagnosis of myocardial infarction, n (%)	80 (44,94)	92 (46,0)	0,84
ПИКС, n (%) Postinfarction cardiosclerosis, n (%)	82 (46,07)	55 (27,5)	0,0001
ОНМК в анамнезе, n (%) Ischemic stroke in history, n (%)	23 (12,92)	23 (11,5)	0,67
ЧКВ в анамнезе, n (%) PCI in history, n (%)	20 (11,2)	17 (8,5)	0,37
КШ в анамнезе n (%) Coronary Artery Bypass Graft in history, n (%)	17 (9,55)	6 (3,0)	0,008
СД 2 типа, n (%) Type 2 diabetes, n (%)	38 (21,35)	33 (16,5)	0,23
ХСН в анамнезе, n (%) Congestive heart failure in history, n (%)	34 (19,1)	28 (14,00)	0,18
АГ, n (%) Arterial hypertension, n (%)	162 (91,01)	179 (89,5)	0,62
Стенокардия в анамнезе, n (%) Stable angina pectoris, n (%)	145 (81,46)	152 (76,00)	0,2
Курение, n (%) Smoker, n (%)	69 (38,76)	83 (42,0)	0,59
ФП/ТП, n (%) Atrial fibrillation, n (%)	25 (14,04)	19 (9,5)	0,17
ИМТ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), кг/м ² Body mass index, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), 25 kg/m ²	28,7 (25,24; 32,65)	29,0 (25,51; 32)	0,88
ИМТ > 25 кг/м ² , n (%) Body mass index > 25 kg/m ² , n (%)	137 (76,97)	160 (80,0)	0,47
Риск GRACE, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), балл Risk GRACE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), points	104 (88; 123)	94 (79; 115)	< 0,0001
Ишемические изменения по ЭКГ, n (%) Ischemic changes on an electrocardiogram, n (%)	112 (62,9)	105 (52,5)	0,04
ФВ ЛЖ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), % Left ventricular ejection fraction, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), %	54 (47; 63)	61 (53; 64)	0,0002
ФВ ЛЖ ≤ 40%, n (%) Left ventricular ejection fraction, ≤ 40%, n (%)	24 (13,48)	16 (8,00)	0,008

Параметры Characteristics	Группы Groups		p
	ККТ за 5 лет (I) 5-year adverse events (I) n = 178	Благоприятный исход (II) Favorable outcome (II) n = 200	
СКФ по формуле MDRD, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), мл/мин/1,73 м ² Glomerular filtration MDRD, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), ml/min/1,73 m ²	67,71 (54,78; 80,64)	68,74 (57,58; 84,25)	0,36
Killip II-IV, n (%)	12 (6,74)	6 (3,00)	0,088
Характеристики коронарного русла Characteristics of coronary artery			
КАГ госпитально, n (%) Coronaroangiography in hospital period, n (%)	138 (77,53)	159 (79,5)	0,64
Число пораженных КА, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) Number of coronary artery with stenoses, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	2 (2; 3)	3 (1; 3)	0,67
Поражение КА > 50%, n (%) Coronary artery with stenoses > 50%, n (%)	115 (83,3)	132 (83,02)	0,78
Поражение ствола ЛКА > 50%, n (%) Stenosis of trunk LCA > 50%, n (%)	13 (9,42)	10 (6,29)	0,31
ЧКВ госпитально, n (%) PCI in hospital period, n (%)	62 (44,93)	74 (37,0)	0,66
Syntax Score, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), балл Syntax Score, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), points	13 (6; 22)	12 (3; 21)	0,45
SYNTAX Высокий балл (n = 22), n (%) Средний балл (n = 34), n (%) Низкий балл (n = 81), n (%) SYNTAX High score (n = 22), n (%) Middle score (n = 34), n (%) Low score (n = 81), n (%)	9 (6,52) 15 (10,87) 84 (60,87)	13 (8,18) 19 (11,95) 94 (59,12)	0,81

Примечание. Шкала Syntax Score – Systematic Coronary Risk Evaluation; ЛКА – ствол левой коронарной артерии; ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство.

Note. Syntax Score, Systematic Coronary Risk Evaluation; LCA, left coronary artery; PCI, percutaneous coronary intervention.

гоприятного прогноза. Частота проведения КАГ и ЧКВ на госпитальном этапе не различалась у пациентов исследуемых групп. По остальным клинико-anamnestическим характеристикам пациенты исследуемых групп достоверно не различались между собой (табл. 2).

Далее был проведен анализ ассоциации распространности генотипов и аллелей исследуемого варибельного сайта rs1041981 гена LTA с развитием ККТ и отдельно со смертельным исходом, ИМ, НС, ОНМК, развившихся в течение пяти лет наблюдения. В таблице 3 представлена распространенность генотипов и аллелей варибельного сайта rs1041981 гена LTA для смертельного исхода, ККТ и отдельных КТ.

Выявлена ассоциация аллеля А (p = 0,02) и генотипа А/А (p = 0,036) варибельного сайта rs1041981 гена LTA с развитием ККТ. Установлено, что у пациентов с генотипом А/А варибельного сайта rs1041981 гена LTA в 3,8 раза чаще развивалась ККТ по сравнению пациентами, имеющими генотип А/С или С/С. Носительство аллеля А rs1041981 гена LTA почти в два раза увеличивает риск развития ККТ у пациентов с ОКСбпСТ в отдаленном периоде. В отношении других КТ статистически значимых ассоциаций выявлено не было в связи с малым количеством пациентов в группах. С помощью метода Каплана–Мейера определено, что дожитие до первой КТ чаще

ТАБЛИЦА 3. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОГО САЙТА rs1041981 ГЕНА LTA В ЗАВИСИМОСТИ ОТ 5-ЛЕТНЕГО ИСХОДА У БОЛЬНЫХ ОКСбнСТ

TABLE 3. DISTRIBUTION OF LTA GENE POLYMORPHISM (rs1041981): ALLELES AND GENOTYPES IN PATIENTS WITH nonST-ACS WITH DIFFERENT 5-YEARS OUTCOMES

Генотипы, аллели Genotypes and alleles	ККТ Overall adverse events		ОР (95%ДИ) OR (95% confidence interval)	Смерть Death		ИМ Myocardial infarction		ОНМК Ischemic stroke		НС Unstable angina	
	наличие, n (%) yes, n (%)	отсут- ствие, n (%) no, n (%)		наличие, n (%) yes, n (%)	отсут- ствие, n (%) no, n (%)	наличие, n (%) yes, n (%)	отсут- ствие, n (%) yes, n (%)	наличие, n (%) yes, n (%)	отсут- ствие, n (%) no, n (%)	наличие, n (%) yes, n (%)	отсут- ствие, n (%) no, n (%)
AA	12 (15,79)	4 (4,71)	3,8 (1,1-12,3)	3 (12)	13 (9,22)	2 (12,5)	14 (9,66)	1 (10)	15 (9,93)	7 (16,67)	4 (4,71)
AC	35 (46,05)	37 (43,53)	1,1 (0,59-2,06)	12 (48)	62 (43,97)	11 (68,75)	61 (42,07)	3 (30)	69 (45,7)	18 (42,86)	37 (43,53)
CC	29 (38,16)	44 (51,67)	0,57 (0,31-1,08)	10 (40)	66 (46,81)	3 (18,75)	70 (48,28)	6 (60)	67 (44,47)	17 (40,48)	44 (51,76)
p	0,036			0,79		0,07		0,6		0,07	
A	59 (38,82)	45 (26,47)	1,76 (1,19-12,39)	18 (36)	88 (31,21)	15 (46,88)	89 (30,69)	5 (25)	99 (32,78)	32 (38,1)	45 (26,47)
C	93 (61,18)	125 (73,53)	0,57 (0,59-2,06)	32 (64)	194 (68,79)	17 (53,12)	201 (69,31)	15 (75)	203 (67,22)	52 (61,9)	125 (63,53)
p	0,02			0,45		0,06		0,47		0,06	

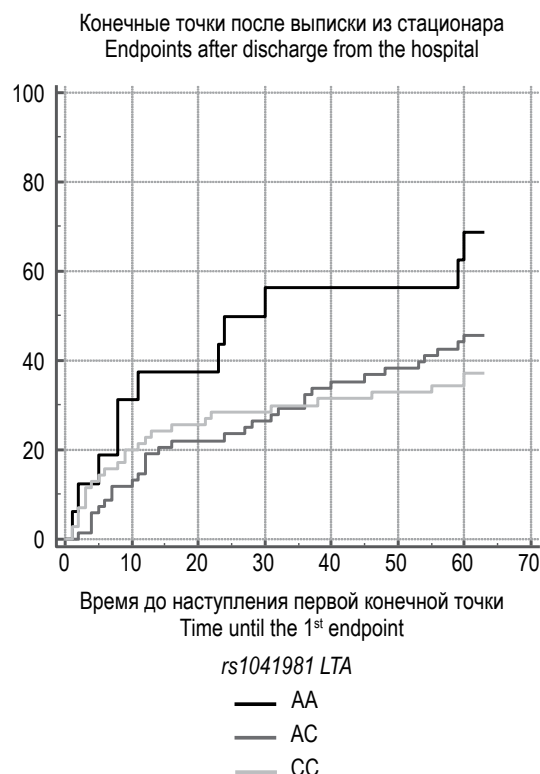


Рисунок 1. Анализ Каплана–Мейера для разных генотипов (A/A, A/C, C/C) варибельного сайта *rs1041981* гена *LTA*

Примечание. В качестве события взята ККТ, время – месяцы до наступления первой КТ. Logrank test: $p = 0,0564$.

Figure 1. Kaplan–Meier analysis for different genotypes (A/A, A/C, C/C) of the variable *LTA* site *rs1041981*

Note. Endpoint is taken as an event; Time, time of the 1st endpoint. Logrank test: $p = 0.0564$.

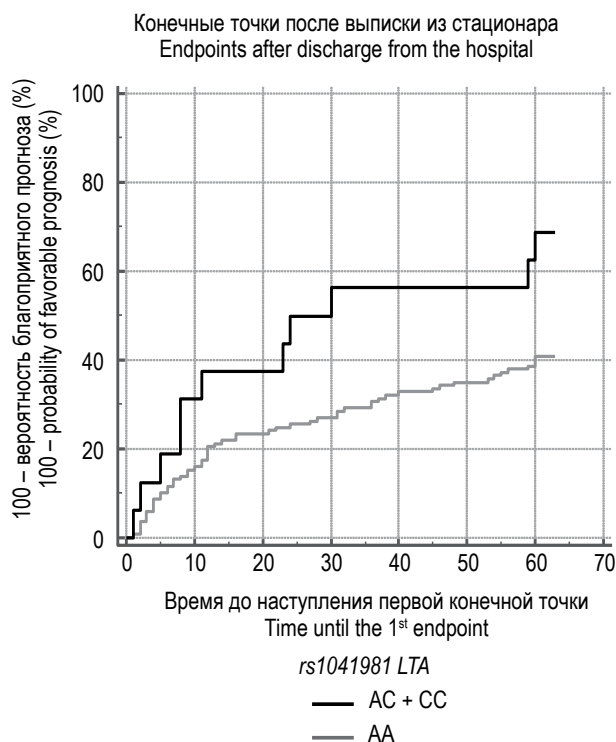


Рисунок 2. Анализ Каплана–Мейера для генотипов A/A и A/C+С/С варибельного сайта *rs1041981* гена *LTA*

Примечание. В качестве события взята ККТ, время – время наступления первой КТ). Logrank test: $p = 0,016$.

Figure 2. Kaplan–Meier analysis for A/A and A/C+С/С of *rs1041981 LTA* gene polymorphism

Note. Endpoint is taken as an event; Time, time of the 1st endpoint). Logrank test: $p = 0.016$.

происходило у носителей генотипа A/A *rs1041981* гена *LTA* (рис. 1).

При объединении генотипов A/C и C/C в одну группу также наиболее значимым ($p = 0,016$) в отношении развития ККТ был генотип A/A *rs1041981* гена *LTA* (рис. 2).

Обсуждение

Частота развития неблагоприятных кардиоваскулярных событий за пятилетний период наблюдения у больных ОКСбпСТ в нашем исследовании была сопоставима с таковой в европейских исследованиях [3, 15, 18]. Наряду с такими известными предикторами неблагоприятного прогноза как старший возраст, ПИКС, высокий балл по шкале GRACE и сниженная ФВ ЛЖ в нашем исследовании определена неблагоприятная роль генотипа A/A варибельного сайта *rs1041981* гена *LTA* в отношении развития неблагоприятного исхода в течение пяти лет наблюдения после индексного ОКС. Полученные результаты согласуются с исследованием PROSPER (5804 пациен-

та), где у носителей аллеля А гена *LTA* достоверно чаще регистрировалась ККТ и ОНМК, особенно у мужчин [14]. Laxton R. и соавт. (2005) описали связь между варибельным сайтом С-804А и выраженностью атеросклероза КА [6]. Носители аллеля А, по их данным, имели риск более тяжелого атеросклеротического поражения. Более того, такая тенденция наблюдалась только у мужчин. В Японии также выявлена взаимосвязь атеросклеротического поражения КА и аллеля А *rs1041981* гена *LTA* у лиц старшей возрастной независимо от пола [5]. В то время как в исследовании Liu Y. (2011) частота аллеля С в контрольной группе и группе коронарного атеросклероза достоверно не отличалась, генотип СС варибельного сайта С-804А достоверно чаще встречался в группе больных с поражением КА [8].

Данные об ассоциации аллеля А с развитием ИМ были представлены в 2002 году Ozaki K. и соавт.: риск развития ИМ у гомозигот А/А превышал в 1,78 раза таковой в группе носителей генотипа С/С и гетерозигот А/С [9]. Частота ал-

леля А полиморфизма С-804А для европейцев составляет 0,30 (95%ДИ: 0,27-0,33), что значительно меньше таковой в контрольной группе японцев — 0,37 (0,34-0,40), а также в группе пациентов с ИМ — 0,41 (0,38-0,44). Таким образом, носители аллеля А варибельного сайта С-804А имеют предрасположенность к развитию острых форм ИБС [13]. Похожие данные были получены и в другом исследовании [12]. В 2014 году опубликованы данные метаанализа, основанного на данных 15 исследований, проведенных в различных популяциях. В общей сложности проанализировано 22 549 больных ИМ и 16 105 здоровых людей. По результатам данного анализа аллель А *rs1041981* (С804А) ассоциирован с повышенным риском развития ИМ [7]. При длительном наблюдении (в течение 3,5 лет) за пациентами старшей возрастной группы аллель А варибельного сайта *rs1041981* гена *LTA* ассоциировался с развитием неблагоприятного коронарного события (смерть или нелетальный ИМ) и/или ОНМК [14], похожие данные получены и в нашем исследовании. Из представленных выше данных можно сделать вывод о достаточном количестве результатов, подтверждающих ассоциацию аллеля А с неблагоприятным прогнозом у пациентов после ОКСбпСТ. Механизм данной взаимосвязи можно объяснить тем, что указанный ген кодирует выработку в организме провоспалительного цитокина — лимфотоксина-α, играющего важную роль в процессе неспецифического воспаления и принимающего участие в развитии атеросклероза КА, а также влияющего на нестабильное течение ИБС.

Следует отметить, что в ряде исследований взаимосвязи между варибельным сайтом *rs1041981* и развитием ОНМК, ИМ и коронарным атеросклерозом выявлено не было. Так, в исследовании, опубликованном в 2004 году Yamada A. и соавт., не получено ассоциаций *rs1041981* как с развитием ИМ, так и с большинством ФР развития ИБС [17]. По результатам других работ, аллельный вариант данного гена также не показал связи с коронарным атеросклерозом или ИМ [4, 10, 11]. В исследовании Ikeda S. ассоциации варибельного сайта *rs1041981* с ИМ также выявлено не было [5]. Несмотря на это накоплено достаточное количество научных данных для того, чтобы учитывать данный генетический маркер в определении прогноза пациентов с ОКСбпСТ.

Заключение

Таким образом, пациенты с ОКСбпСТ, безусловно, являются группой риска в отношении развития неблагоприятных кардиоваскулярных событий, в том числе — в отдаленном периоде, что и определяет проведение более тщательных исследований, направленных на уточнение прогноза у данной категории пациентов. У пациентов с ОКСбпСТ аллель А и генотип А/А варибельного сайта *rs1041981* гена *LTA* ассоциированы с развитием неблагоприятных кардиоваскулярных событий в течение пятилетнего периода после индексного события. Использование комплексного подхода в прогнозировании, когда наряду с традиционными факторами риска применяются более тонкие генетические маркеры, позволяет улучшить качество определения прогноза в отдаленном периоде у пациентов с ОКСбпСТ.

Список литературы / References

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с. [Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. Methods of genetic engineering. Molecular cloning]. Moscow: World, 1984. 480 p.
2. Asselbergs F.W., Pai J.K., Rexrode K.M., Hunter D.J., Rimm E.D. Effects of lymphotoxin-alpha gene and galectin-2 gene polymorphisms on inflammatory biomarkers, cellular adhesion molecules and risk of coronary heart disease. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2007, Vol. 112, no. 5, pp. 291-298.
3. Bassan F., Bassan R., Esporcatte R., Santos B., Tura B. Very long-term prognostic role of admission BNP in non-ST segment elevation acute coronary syndrome. *Arq. Bras. Cardiol.*, 2016, Vol. 106, no. 3, pp. 218-225.
4. Hagiwara N., Kitazono T., Kamouchi M., Kuroda J., Ago T., Hata J., Ninomiya T., Ooboshi H., Kumai Y., Yoshimura S., Tamaki K., Fujii K., Nagao T., Okada Y., Toyoda K., Nakane H., Sugimori H., Yamashita Y., Wakugawa Y., Kubo M., Tanizaki Y., Kiyohara Y., Ibayashi S., Iida M. Polymorphisms in the lymphotoxin alpha gene and the risk of ischemic stroke in the Japanese population. The Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama Study. *Cerebrovasc. Dis.*, 2008, Vol. 25, no. 5, pp. 417-422.
5. Ikeda S., Tanaka N., Arai T., Chida K., Muramatsu M., Sawabe M. Polymorphisms of LTA, LGALS2, and PSMA6 genes and coronary atherosclerosis: a pathological study of 1503 consecutive autopsy cases. *Atherosclerosis*, 2012, Vol. 221, no. 2, pp. 458-460.
6. Laxton R., Pearce E., Kyriakou T., Ye S. Association of the lymphotoxin-alpha gene Thr26Asn polymorphism with severity of coronary atherosclerosis. *Genes. Immun.*, 2005, Vol. 6, no. 6, pp. 539-541.
7. Li N., Liu R., Zhai H., Yin Y., Zhang J., Xia Y. Polymorphisms of the LTA gene may contribute to the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 3, e92272. doi: 10.1371/journal.pone.0092272.

8. Liu Y., Sheng H., Lu L., Wu Z., Chen Q., Xiao H., Jin W. Haplotype-based association of four lymphotoxin-alpha gene polymorphisms with the risk of coronary artery disease in Han Chinese. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 224, no. 2, pp. 119-125.
9. Ozaki K., Tanaka T. Genome-wide association study to identify SNPs conferring risk of myocardial infarction and their functional analyses. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, Vol. 62, no. 16, pp. 1804-1813.
10. Saade S., Cazier J.B., Ghassibe-Sabbagh M., Youhanna S., Badro D.A., Kamatani Y., Hager J., Yeretzian J.S., El-Khazen G., Haber M., Salloum A.K., Douaihy B., Othman R., Shasha N., Kabbani S., el Bayeh H., Chammass E., Farrall M., Gauguier D., Platt D.E., Zalloua P.A. Large scale association analysis identifies three susceptibility loci for coronary artery disease. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 12, e29427. doi: 10.1371/journal.pone.0029427.
11. Shiffman D., Ellis S.G., Rowland C.M., Malloy M.J., Luke M.M., Iakoubova O.A., Pullinger C.R., Cassano J., Aouizerat B.E., Fenwick R.G., Reitz R.E., Catanese J.J., Leong D.U., Zellner C., Sninsky J.J., Topol E.J., Devlin J.J., Kane J.P. Identification of four gene variants associated with myocardial infarction. *Am. J. Hum. Genet.*, 2005, Vol. 77, no. 4, pp. 596-605.
12. Tanaka T., Ozaki K. Inflammation as a risk factor for myocardial infarction. *J. Hum. Genet.*, 2006, Vol. 51, pp. 595-604.
13. The PROCARDIS Consortium. A trio family study showing association of the lymphotoxin-alpha N26 (804A) allele with coronary artery disease. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2004, Vol. 12, no. 9, pp. 770-774.
14. Trompet S., de Craen A.J., Slagboom P., Shepherd J., Blauw G.J., Murphy M.B., Bollen E.L., Buckley B.M., Ford I., Gaw A., Macfarlane P.W., Packard C.J., Stott D.J., Westendorp R.G., Jukema J.W. Lymphotoxin-alpha C804A polymorphism is a risk factor for stroke. The PROSPER study. *Exp. Gerontol.*, 2008, Vol. 43, no. 8, pp. 801-805.
15. Vagnarelli F., Taglieri N., Ortolani P., Norscini G., Cinti L., Bacchi Reggiani M.L., Marino M., Lorenzini M., Bugani G., Corsini A., Semprini F., Nanni S., Tricoci P., De Palma R., Rapezzi C., Melandri G. Long-term outcomes and causes of death after acute coronary syndrome in patients in the Bologna, Italy, Area. *Am. J. Cardiology*, 2015, Vol. 115, no. 2, pp. 171-177.
16. Windecker S., Kolh P., Alfonso F., Collet J.-P., Cremer J., Falk V., Filippatos G., Hamm C., Head S.J., Jüni P., Kappetein A.P., Kastrati A., Knuuti J., Landmesser U., Laufer G., Neumann F.-J., Richter D.J., Schauerte P., Uva M.S., Stefanini G.G., Taggart D.P., Torracca L., Valgimigli M., Wijns W., Witkowski A. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) APCI. *Eur. Heart J.*, 2014, Vol. 35, no. 37, pp. 2541-2619.
17. Yamada A., Ichihara S., Murase Y., Kato T., Izawa H., Nagata K., Murohara T., Yamada Y., Yokota M. Lack of association of polymorphisms of the lymphotoxin alpha gene with myocardial infarction in Japanese. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2004, Vol. 82, no. 7, pp. 477-483.
18. Zhang B., Shen D.P., Zhou X.C., Liu J., Huang R.C., Wang Y.E., Chen A.M., Zhu Y.R., Zhu H. Long-term prognosis of patients with acute non-ST-segment elevation myocardial infarction undergoing different treatment strategies. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2015, Vol. 128, no. 8, pp. 1026-1031.

Авторы:

Шмидт Е.А. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории патологии кровообращения отдела мультифокального атеросклероза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Бернс С.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патологии кровообращения отдела мультифокального атеросклероза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово; профессор кафедры внутренних болезней ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова», Москва, Россия

Authors:

Shmidt E.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Circulation Pathology, Division of Multifocal Atherosclerosis, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Berns S.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Circulation Pathology, Division of Polyvascular Diseases, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo; Professor, Chair of Internal Medicine, Moscow State A.I. Evdokimov University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

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

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

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

Нагирняк О.А. — младший научный сотрудник лаборатории патологии кровообращения отдела мультифокального атеросклероза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Клименкова А.В. — к.м.н., заведующая приемным отделением ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

Литвинова М.Н. — кардиолог ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

Барбараш О.Л. — д.м.н., член-корр. РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

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

Makeeva O.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Goncharova I.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Nagirnyak O.A., Junior Research Associate, Laboratory of Circulation Pathology, Division of Multifocal Atherosclerosis, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Klimenkova A.V., PhD (Medicine), Head, Admission Department, Kemerovo L.S. Barbarash Regional Clinical Cardiac Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Litvinova M.N., Cardiologist, Kemerovo L.S. Barbarash Regional Clinical Cardiac Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Barbarash O.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 04.05.2017

Отправлена на доработку 21.06.2017

Принята к печати 18.07.2017

Received 04.05.2017

Revision received 21.06.2017

Accepted 18.07.2017

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НОРМАТИВНЫХ ЗНАЧЕНИЙ TREC И KREC В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ РАЗНОГО СРОКА ГЕСТАЦИИ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Дерябина С.С.^{1,2,3}, Тузанкина И.А.^{2,3,4}, Шершнева В.Н.^{3,5}

¹ ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр „Охрана здоровья матери и ребенка“», г. Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

³ ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

⁴ ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

⁵ ФГБУН «Институт промышленной экологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. В ходе подготовительного этапа работы по внедрению генетического тестирования на тяжелый комбинированный иммунодефицит в программу неонатального скрининга в Свердловской области проведено исследование по количественному определению маркеров Т- и В-клеточного неогенеза (TREC и KREC соответственно) в крови условно здоровых новорожденных. Материалом исследования служили архивные образцы сухих пятен крови, собранных на тест-бланки для рутинного неонатального скрининга у 26 девочек и 26 мальчиков, родившихся доношенными и не имевших тяжелых заболеваний на первом году жизни. Дополнительно исследовано влияние гестационного возраста плода на количество данных маркеров (TREC и KREC) у недоношенных новорожденных разного срока гестации. Обследованы образцы крови 55 недоношенных детей, родившихся преждевременно (23-36 недель гестации). Показано, что уровни TREC и KREC последовательно возрастали с увеличением срока гестации, однако динамика данных изменений концентрации маркеров оказалась различной. В связи с этим рекомендуемый срок взятия образца крови для скрининга на ТКИН полностью соответствует срокам взятия образцов, принятым для большинства наследственных скринируемых заболеваний. Исключение составляет получение результата с полным отсутствием TREC или KREC в образце крови новорожденного любой степени недоношенности (при валидном количестве копий контрольного гена), что должно служить сигналом для незамедлительного назначения этому ребенку консультации врача-иммунолога и проведения углубленного иммунологического обследования, поскольку это может явиться первым прогностическим признаком фатального заболевания. Для получения корректных пороговых уровней TREC/KREC необходимы дополнительные исследования на большей выборке новорожденных (1000-5000) с последующей валидацией полученных референсных границ в исследованиях с включением больных с разными формами первичных иммунодефицитов.

Ключевые слова: тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, первичные иммунодефициты, TREC, KREC, массовое обследование новорожденных, ретроспективная диагностика

Адрес для переписки:

Дерябина Светлана Степановна
ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр „Охрана
здоровья матери и ребенка“»
620041, Россия, г. Екатеринбург, ул. Флотская, 52.
Тел/факс: 8 (343) 374-31-10.
E-mail: ssderyabina@gmail.com

Address for correspondence:

Deryabina Svetlana S.
Medical Centre "Health Care of Mother and Child"
620041, Russian Federation, Ekaterinburg, Flotskaya str., 52.
Phone/Fax: 7 (343) 374-31-10.
E-mail: ssderyabina@gmail.com

Образец цитирования:

С.С. Дерябина, И.А. Тузанкина, В.Н. Шершнева
«Определение нормативных значений TREC и KREC в сухих
пятнах крови новорожденных разного срока гестации
в Свердловской области» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 1. С. 85-98.

doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-85-98

© Дерябина С.С. и соавт., 2018

For citation:

S.S. Deryabina, I.A. Tuzankina, V.N. Shershnev
"Determination of reference values for TREC and KREC
in dry blood spots of newborns from different gestation ages
in Sverdlovsk Region", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 1,
pp. 85-98. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-85-98

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-85-98

DETERMINATION OF REFERENCE VALUES FOR TREC AND KREC IN DRY BLOOD SPOTS OF NEWBORNS FROM DIFFERENT GESTATION AGES IN SVERDLOVSK REGION

Deryabina S.S.^{a, b, c}, Tuzankina I.A.^{b, c, d}, Shershnev V.N.^{c, e}

^a Medical Center "Health Care of Mother and Child", Ekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

^c B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

^d Regional Children Clinical Hospital No. 1, Ekaterinburg, Russian Federation

^e Institute of Industrial Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. As a preparatory stage for implementation of genetic testing for severe combined immunodeficiency under a neonatal screening program, a study was performed in Sverdlovsk Region which concerned quantitative determination of T and B cell neogenesis markers (TREC and KREC, respectively) in blood of conditionally healthy newborns. Archived samples of dry blood spots collected in test-forms for routine neonatal screening were used as biological material for the study of full-term 26 girls and 26 boys who did not exhibit serious illnesses during first year of their life. In addition, we investigated potential effects of foetal gestational age upon the number of TREC and KREC in preterm infants. Blood samples from 55 preterm infants (23 to 36 gestational weeks) were also examined. It was shown that the levels of TREC and KREC increased sequentially with the increased gestation terms, but the quantitative changes of markers showed different dynamics. In this respect, the recommended terms of blood sample collection for SCID screening is entirely consistent with timing of blood sampling for routine newborn screening. An alternative result was obtained with a complete absence of TREC or KREC in blood sample of a newborn, irrespectively of prematurity degree (at valid copy numbers of a control gene) which should serve as an indication for immediate consulting of the child by immunologist and in-depth immunological examination, because it may be a first prognostic sign of a fatal disease.

In order to obtain correct cut-off levels for TREC/KREC, additional studies are needed on a larger sample of newborns (1.000 to 5.000), followed by validation of the obtained reference boundaries in studies involving patients with different forms of primary immunodeficiencies.

Keywords: severe combined immunodeficiency, primary immunodeficiency, TREC, KREC, newborn screening, retrospective diagnosis

Введение

Современные достижения иммунологии все явственнее указывают на то, что в патогенезе многих заболеваний существенная роль отводится иммунной системе [5, 7, 10]. Работы последних лет в области фундаментальной иммунологии, клеточной биологии, белковой и геномной инженерии позволили по-новому взглянуть на некоторые механизмы функционирования иммунной системы и определить спектр и локализацию нарушений, приводящих к развитию различных видов иммунопатологии, в том числе первичных иммунодефицитных состояний (ПИД).

Повышенная восприимчивость новорожденных к инфекции является общей проблемой в неонатологии и считается одной из самых главных уязвимостей ребенка в неонатальный период жизни: инвазивные неонатальные инфекции являются причиной почти 36% случаев ранней

младенческой смертности [40, 41, 52], выжившие после сепсиса новорожденные имеют повышенный риск длительного пребывания в стационаре, развития бронхолегочной дисплазии и плохо поддающихся коррекции отклонений в психомоторном развитии [9, 27, 40, 44, 45, 50].

Результаты недавних исследований [28] ясно показывают, что «зерно» для проявления различных иммунологически опосредованных заболеваний, впервые проявляющихся в зрелом возрасте, закладывается в раннем послеродовом периоде жизни. Именно на протяжении этого периода иммунная система новорожденного подвергается тонкой самонастройке с помощью различных функциональных «клавиш» и в условиях прямой стимуляции факторами окружающей среды [25, 28, 38].

Многие исследователи объясняют «несостоятельность» первичного иммунного ответа ново-

рожденного незрелостью его иммунной системы на момент родов, ее функциональной неполноценностью по аналогии с не полностью сформированными органами (мозг, легкие) и системами (нервная, дыхательная) [28, 29]. Другая теория рассматривает угнетенное состояние иммунной системы, наблюдаемое и у плода, и у матери, как обязательное условие их взаимного симбиоза в течение всей беременности, обеспечивающее «сдерживание» иммунного конфликта. После рождения иммунная система ребенка начинает активно «дозреть» и вскоре приобретает все черты специфической реактивности взрослого [1, 29, 37].

Однако рецидивирующие хронические инфекции, а также симптомы обычных инфекций, особенностью которых является тяжелое или атипичное течение и отсутствие ответа на стандартные терапевтические воздействия, нередко могут быть настораживающими признаками особой группы заболеваний – первичных иммунодефицитов [6, 13, 14, 21]. В этой связи особую важность для врача-клинициста приобретает возможность выявления ребенка с первичным иммунодефицитом, у которого «сбой» иммунного ответа обусловлен не физиологическим состоянием новорожденности, а наличием генетического дефекта, нарушающего нормальное функционирование одного или нескольких ключевых компонентов иммунной системы.

Особого внимания заслуживают дети, родившиеся на малом сроке гестации (до 32 нед.) и дети, родившиеся с экстремально низкой массой тела. Известно, что распространенность сепсиса новорожденных обратно коррелирует с гестационным возрастом и массой тела при рождении [40, 44, 45] следовательно, дети, рожденные преждевременно, могут быть отнесены к группе риска по развитию инфекций. Поскольку состояние иммунодефицита у недоношенных детей не подвергалось всесторонней оценке до начала скринирования на данную патологию, в настоящее время такие дети рассматриваются как имеющие повышенный риск развития инфекций и требуют соответствующих условий выхаживания [17, 20, 33]. В этом контексте, незрелость иммунной системы как фактор, имеющий временный эффект, обусловленный гестационным возрастом, трудноотделим от специфических факторов, связанных с состоянием здоровья недоношенных новорожденных: врожденных аномалий, инфекционных, эндокринных осложнений и нарушений обмена веществ. [25, 28, 38]. Поэтому крайне важно иметь алгоритм уточнения дефектных механизмов, лежащих в основе иммунных реакций

у новорожденных любого гестационного возраста, который будет способствовать раннему распознаванию пациентов с врожденной иммунной недостаточностью.

Благодаря возросшему в последнее время вниманию к данной проблеме со стороны Всемирного общества здравоохранения (ВОЗ) и международных медицинских организаций (ESID, J-Project, JMF) отмечается постепенное исчезновение «диагностического провала» среди больных ПИД за счет появления надежных методов диагностики тяжелых форм иммунной недостаточности (ТКИН) [26, 33, 46]. Во многих странах мира разрабатываются и внедряются в национальные программы массового обследования новорожденных новые, улучшенные методы скринирования на расширенный список иммунодефицитных состояний, тем самым подчеркивается значительный потенциал этой превентивной стратегии здравоохранения [18, 20].

Попытки создать единую российскую базу данных больных первичными иммунодефицитами пока не увенчались успехом. По данным отечественных исследователей, в России ежегодно фиксируется около 180 новых случаев ПИД [14].

В Свердловской области регистр ПИД за 5 лет (2010–2015) увеличился со 163 (взрослых 43) до 372 (взрослых 104) пациентов. Ежегодно регистр пополняется на 20–70 человек, что составляет от 15 до 43% всероссийского регистра. В то же время большое количество пациентов с первичным иммунодефицитом до сих пор не имеют точного диагноза, что означает безвозвратную потерю времени для назначения адекватной терапии, необратимые повреждения внутренних органов и, как следствие, невозможность вернуть человека на иной, качественно новый уровень жизни.

На сегодняшний день эффективным способом оценки пролиферации Т-лимфоцитов признано определение TREC (T-cell receptor excision circle). TREC представляют собой кольцевые фрагменты ДНК, образующиеся при реаранжировке Т-клеточного рецептора (ТКР) и содержащие определенные константные последовательности, по которым их можно обнаружить [2, 12].

Количество копий TREC в образце ДНК измеряется с помощью количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР-РВ) и отражает число наивных Т-клеток, вышедших из тимуса в кровоток. Любой генетический дефект, который нарушает развитие Т-клеток, индуцирует их апоптоз или блокирует их дифференцировку в тимусе, приводит к Т-клеточной лимфопении и низкому уровню TREC [4, 20, 33, 46]. Таким образом,

количественная оценка уровня TREC позволяет выявить детей с типичной ТКИН, а также с другими заболеваниями, затрагивающими численность и функционирование Т-клеточного звена иммунной системы (например, синдром Ди Джорджи или синдром CHARGE).

Новорожденные дети с ТКИН имеют очень низкие или неопределяемые уровни TREC, именно это позволяет выявлять таких детей на первой неделе жизни как угрожаемых по данному заболеванию и направлять на углубленное иммунологическое исследование до манифестации клинических проявлений болезни.

По состоянию на сентябрь 2016 года неонатальный скрининг на ТКИН полностью реализован в 41 штате США и находится в стадии разработки еще в нескольких других штатах. Израиль также выполняет скринирование на ТКИН в рамках государственной программы, несколько пилотных проектов осуществляются в странах Европы, Ближнего Востока и Азии [19, 32, 39, 42, 51].

Проблема идентификации больных с В-клеточными дефектами, приводящими к развитию не менее тяжелых и угрожающих жизни состояний (агаммаглобулинемия Брутона, гипериммуноглобулинемия М, ТКИН с отсутствием В-клеток), в настоящее время решается скринированием на KREC (kappa-deleting recombination exercise circle) [22, 42, 47].

KREC — аналог кольцевой молекулы TREC, образующийся в процессе созревания В-клеток в костном мозге. Как и в случае TREC, KREC не может реплицироваться в клетке, является стабильной структурой и встречается более чем в 50% В-лимфоцитов [34, 47]. Тестирование новорожденных на KREC потенциально полезно для выявления больных с дефектами раннего созревания В-клеток в костном мозге [33, 34, 47].

Большим преимуществом является возможность комбинировать данные тесты: TREC и KREC могут быть измерены одновременно в реакции мультиплексной ПЦР, что позволяет обнаруживать суммарно больше первичных иммунодефицитов, чем при отдельном тестировании TREC или KREC. Благодаря применению такой комбинации маркеров возрастает количество больных детей, получивших возможность на основании результата скрининга своевременно начать адекватную патогенетически обоснованную терапию, что, в конечном итоге, ведет к снижению общей заболеваемости и младенческой смертности, обусловленных данными нозологиями.

В Российской Федерации в настоящее время ПИД, включая и его фатальную форму — ТКИН, диагностируется после манифестации клинических признаков. Учитывая то, что ПИД имеет несколько фенотипических масок и часто «микрирует» под другие заболевания, а у врачей первичного звена отсутствует настороженность относительно данной нозологии, российским больным приходится преодолевать «диагностическую одиссею» — длинную последовательность клинических диагностических исследований и направлений, предшествующих окончательной диагностике состояния. Между тем, только по данным областной детской клинической больницы № 1 (ОДКБ № 1) г. Екатеринбурга, ежегодно в получении консультации специалиста-иммунолога нуждаются около 12 000 детей с патологическими нарушениями функционирования иммунной системы, не редко находящиеся уже в состоянии крайней тяжести по причине инфекционных, воспалительных, аутоиммунных и других осложнений. Осложнения, которые получает больной ребенок во время данного диагностического пути, зачастую становятся необратимыми, несмотря на проводимое лечение.

Возможность на основании сниженного количества в крови TREC и KREC формировать группу риска по ПИД среди детей еще в неонатальный период позволило бы вывести диагностику данных заболеваний на новый качественный уровень, своевременно назначать пораженным детям адекватную, патогенетически обоснованную терапию и, в конечном итоге, достичь стабильного общего состояния таких пациентов.

Поскольку подобных исследований в российской популяции новорожденных не проводилось, первоочередной задачей в этом направлении является определение нормативных значений содержания копий TREC и KREC в лимфоцитах условно здоровых детей данного возраста и недоношенных детей с разным сроком гестации.

Материалы и методы

Образцы и экстракция ДНК

В ходе исследования было выполнено количественное определение копий TREC, KREC и гена рецептора интерлейкина 17— *IL17RA* (в качестве внутреннего контроля взятия материала) в лимфоцитах 52 условно здоровых новорожденных (26 девочек и 26 мальчиков) и 55 новорожденных, родившихся преждевременно.

Материалом для исследования служили образцы крови детей, родившихся в Свердловской области в период с 01.01.2011 по 31.07.2016, у которых брали кровь на фильтровальные карточки

для неонатального скрининга 903 Wallac Russia CE Card (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, США). Фильтровальные карточки хранились в Лаборатории неонатального скрининга ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр „Охрана здоровья матери и ребенка“» (КДЦ «ОЗМР», г. Екатеринбург, главный врач — Е.Б. Николаева), хранение карточек производилось при комнатной температуре.

В исследование были включены условно здоровые дети, отобранные случайным образом из архива лаборатории неонатального скрининга. Критерием отбора в данную группу служили отрицательные результаты неонатального скрининга по 16 заболеваниям [8] и отсутствие данных о тяжелых заболеваниях ребенка на первом году жизни.

Для выяснения характера влияния гестационного возраста плода на количество образующихся TREC и KREC в исследование были включены 55 недоношенных новорожденных (11 детей, родившихся на сроке 23-25 недель гестации, 15 — на сроке 27-28 недель, 16 — на сроке 30-32 недели и 15 детей, родившихся на сроке 35-36 недель гестации).

Экстракция ДНК из сухих пятен крови для методики количественной ПЦР в реальном времени проводилась с помощью набора «ДНК-сорб-В» (Амплисенс, Россия). Поскольку в дальнейшем требовалось количественно оценивать наличие маркеров TREC и KREC в единице объема цельной крови в пересчете на определенное количество лейкоцитов пациента, было принято решение о модификации протокола, заявленного фирмой-производителем. Учитывались следующие моменты:

- биологический материал из фильтровальной карточки должен быть взят в минимальном количестве;
- этого количества должно быть достаточно для выделения качественной ДНК;
- цифровое значение количества должно быть удобным для последующих расчетов.

Исходя из этого, в реакцию выделения ДНК брали 3 диска, выбитых из сухих пятен крови на фильтре ручным дыроколом (Single Hole Punch, 1/8" Hole Size, США). Учитывая, что один выбитый стандартный диск размером 3,2 мм содержит в себе 3,0-3,2 мкл цельной крови [47], приняли, что объем крови, взятой для экстракции ДНК, в нашем случае приблизительно равен 10 мкл.

Указанные диски (3 шт. от каждого образца) выбивали в пробирки объемом 1,5 мл типа «Эппендорф», заливали 150 мкл лизирующего буфе-

ра (из набора), тщательно встряхивали на шейкере и после краткосрочного центрифугирования в течение 15 с инкубировали в термостате при 65 °С в течение 30-45 минут. Для исключения контаминации соседних образцов область ножа пробойника после каждого образца обрабатывали 70% раствором этанола и обжигали в пламени. По окончании инкубации пробирки помещали в центрифугу “Mini Spin” (Eppendorf, США), после чего центрифугировали в течение 1 минуты 12 500 оборотов/мин. Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку и добавляли 15 мкл Сорбента, входящего в состав набора. Дальнейшая процедура экстракции не отличалась от инструкции фирмы-производителя. С целью концентрирования образца ввиду малого количества материала ДНК элюировали в 50 мкл ТЕ-буфера. Хранение образцов ДНК проводили при -30 °С без удаления сорбента.

Количественный анализ TREC и KREC методом ПЦР в режиме реального времени

Количественное определение маркеров наивных Т- и В-клеток было проведено с помощью мультиплексной тест-системы, разработанной в Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск) и Новосибирского государственного исследовательского университета (г. Новосибирск) совместно с ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 (ДГКБ № 9) им. Г.Н. Сперанского» (Москва) [2].

Мультиплексную ПЦР в режиме реального времени проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США), для построения калибровочных кривых использовали входящие в состав набора калибраторы с концентрацией 10^7 , 10^5 , 5×10^3 копий в 1 мл каждого аналита (TREC/KREC/IL17RA). Количество копий анализируемых ДНК мишеней рассчитывали, исходя из полученных калибровочных кривых с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (Bio-rad, США). Тангенс угла наклона калибровочной кривой составлял не менее -3,2 с коэффициентом корреляции $R^2 > 0,98$, что соответствовало общепринятым значениям [35]. Разница в пороговом цикле между дублями составляла не более 0,5 цикла.

Использование в исследуемой тест-системе референсного гена IL17RA в качестве внутреннего контрольного образца позволяло контролировать этапы экстракции ДНК и проведения реакции амплификации. Это явилось также своеобразным показателем адекватности количества материала, взятого для исследования,

поскольку фильтровальные карточки отдельных образцов имели различные сроки хранения (от нескольких месяцев до 3-х лет), что могло сказаться на эффективности экстракции ДНК. В дальнейшем экспериментальным путем было подтверждено, что данный объем крови (3 диска) отвечает всем вышеуказанным требованиям. Концентрация полученных растворов ДНК составляла 10-30 нг/мкл, отношение поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (коэффициент A_{260}/A_{280}) находилось в пределах 1,7-1,9, что свидетельствовало о высокой чистоте препаратов. Измерение концентрации ДНК и степени ее чистоты определяли спектрофотометрическим методом с использованием NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США).

Методы математической обработки данных

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel, Statistica 7.0 for Windows. Методы описательной статистики применялись на предварительном этапе сопоставления показателей различных групп. На основании варьирования показателя, численности выборок, а также закономерности распределения использовали непараметрические методы представления данных в виде медианы и интерквартильного размаха (25%-75%). Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического критерия Краскела—Уоллиса и Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Необходимо отметить, что зарубежные исследователи используют различные подходы к оценке уровня содержания TREC и KREC: количество копий мишеней в расчете на 10^6 мононуклеаров, TREC/CD45⁺T-клеток, TREC/KREC на микролитр крови или TREC/KREC на миллиграмм ДНК [2, 12, 46].

Согласно инструкции используемой нами тест-системы, абсолютное количество молекул TREC, KREC и нормировочного локуса *IL17RA* в анализируемом образце ДНК определяется с помощью калибровочных кривых. Поскольку концентрации TREC, KREC и нормировочного локуса *IL17RA* в калибровочных кривых выражены в копиях молекул на миллилитр, то и количество данных маркеров для каждого исследуемого образца, определяемое в течение реакции, выражается в тех же единицах — копий на миллилитр. Учитывая количество взятого в реакцию объема раствора ДНК, можно получить размерность маркеров в копиях на реакцию, однако для клинициста-иммунолога гораздо важнее знать не абсолютное количество TREC и KREC на один

миллилитр цельной крови пациента или на одну абстрактную реакцию, а долю наивных Т- и В-клеток (суррогатными маркерами которых и являются TREC и KREC соответственно) среди всех клеток лейкоцитарного ряда. Таким образом, зная количество ядродержащих клеток в единице объема цельной крови, взятой в реакцию выделения ДНК, можно легко пересчитать количество TREC (KREC) на количество лейкоцитов.

При исследовании ДНК, выделенной из цельной крови, количество копий TREC(KREC) в образце рассчитывают на 10^5 лейкоцитов с учетом внутреннего контроля, осуществляемого нормировочным локусом *IL17RA*, по формуле [2]:

$$\text{TREC (KREC)} = \frac{\text{TREC (KREC) в 1 мл}}{\text{IL17RA в 1 мл}} \times 200\,000.$$

Данная формула учитывает количество ядродержащих клеток в образце крови, взятой для выделения ДНК (100 мкл): 1 мл крови содержит примерно 10^6 лейкоцитов, следовательно, в 0,1 мл их 10^5 , к тому же, количество клеток в 2 раза меньше копий *IL17RA* (в связи с диплоидным набором хромосом у человека).

При исследовании ДНК, выделенной из сухих пятен крови разработанным нами способом, количество копий TREC(KREC) в образце рассчитывают на 10^4 лейкоцитов с учетом внутреннего контроля *IL17RA*:

$$\text{TREC (KREC)} = \frac{\text{TREC (KREC) в 1 мл}}{\text{IL17RA в 1 мл}} \times 20\,000.$$

Данная формула также учитывает количество ядродержащих клеток в образце крови: количество клеток в 2 раза меньше копий *IL17RA*, а объем материала для выделения ДНК (3 диска, выбитых из сухого пятна) в нашем случае составил 10 мкл (0,01 мл) цельной крови. С учетом объема реакции и в пересчете на лейкоциты числитель равен 2×10^4 (20 000).

Таким образом, в ходе исследования были получены количественные значения маркеров TREC и KREC в лимфоцитах 52 условно здоровых новорожденных (табл. 1).

Полученные количественные значения TREC не имели статистически значимых различий по полу (критерий Манна—Уитни $p = 0,11$, рис. 1), что соответствует результатам, полученным зарубежными исследователями [36, 43].

Количество копий KREC, определенных для девочек и мальчиков, значимо отличалось (критерий Манна—Уитни $p = 0,01$) (рис. 2). Однако значимость данного различия, на наш взгляд,

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЗНАЧЕНИЯ УРОВНЕЙ TREC И KREC, ОПРЕДЕЛЕННЫЕ В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

TABLE 1 CONCENTRATION OF TREC AND KREC, QUANTIFIED BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION IN DRY BLOOD SPOTS OF HEALTHY NEWBORNS

Статистические параметры Statistical parameters	TREC, копий на 10^4 лейкоцитов TREC, copies per 10^4 leucocytes	KREC, копий на 10^4 лейкоцитов KREC, copies per 10^4 leucocytes
ME	641,9	147,3
$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	419,0-855,0	88,3-232,4
Min-Max	261,9-1620,1	25,4-973,0

Примечание. В таблице для каждого маркера отображены: медиана (Me), квартильный размах ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), размах (минимум, максимум, Min-Max) переменной.

Note. For each marker, the following indexes are shown: median (Me), $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$; minimal and maximal values, (Min-Max).

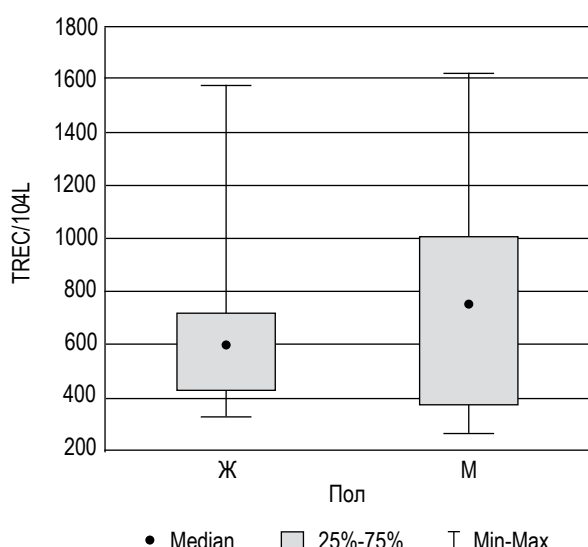


Рисунок 1. Количество копий TREC на 10^4 лейкоцитов в группе условно здоровых девочек (Ж) и мальчиков (М)
Примечание. На диаграмме для каждой группы отображены: медиана, квартильный размах ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), размах (минимум, максимум) переменной.

Figure 1. TREC values (copy numbers per 10^4 leukocytes) in the group of healthy newborns: 26 girls (F) and 26 boys (M)

Note. Minimum, first quartile; median, third quartile and maximum are depicted in the figure.

не является определяющим фактором при установлении порогового уровня для KREC при разделении нормального и патологичного результатов анализа у детей любого пола и требует дополнительной проверки на расширенной выборке испытуемых.

Все используемые в настоящее время в мировой практике скрининг-тесты имеют хорошо скорректированные диагностические пороги для четкого алгоритма дифференцировки «больных» и «здоровых» новорожденных. Очевидно, что для качественного и надежного разделения здоровых детей и детей с риском развития

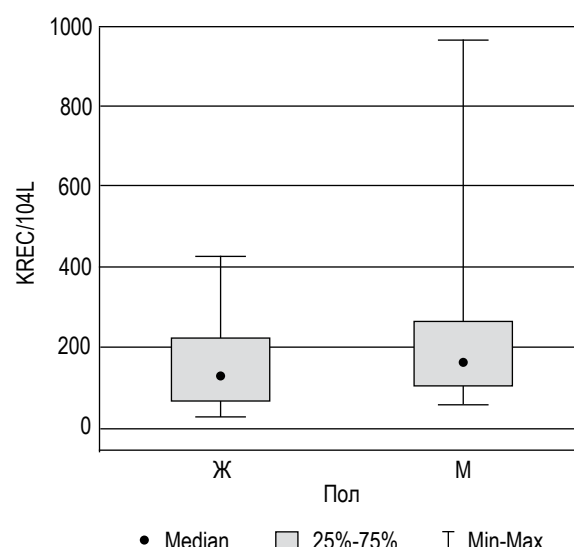


Рисунок 2. Количество копий KREC на 10^4 лейкоцитов в группе условно здоровых девочек (Ж) и мальчиков (М)
Примечание. На диаграмме для каждой группы отображены: медиана, квартильный размах ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), размах (минимум, максимум) переменной.

Figure 2. KREC values (copy numbers per 10^4 leukocytes) in the group of healthy newborns: 26 girls (F) and 26 boys (M)

Note. Minimum, first quartile; median, third quartile and maximum are depicted in the figure.

первичного иммунодефицита также требуется определить корректные уровни отсечения — cut-off — для каждого из исследуемых маркеров. Как правило, количественные значения TREC и KREC, определенные в общей популяции населения, не имеют нормального распределения, поэтому для выбора подходящих диагностических уровней отсечения должно быть проанализировано от 5 000 до 10 000 новорожденных популяции обследуемого региона [20].

Однако скрининговые исследования на тяжелый комбинированный иммунодефицит, проводимые в настоящее время в США и странах

Европы, до сих пор не стандартизованы методологически, что приводит к значительной разнице в определении уровня cut-off между разными лабораториями [2, 31, 33, 46]. Полученные нами количественные показатели маркеров Т- и В-клеточного неогенеза (TREC и KREC) могут быть использованы в качестве «локальных» нормативных значений для новорожденных в Свердловской области, так как разработаны на основании имеющейся базы данных обследуемой популяции.

Результаты сравнительного анализа уровней TREC и KREC, полученных у детей с иммунозависимой патологией, развившейся на первом году жизни, и у новорожденных в контрольной группе, показали, что у 40% детей с клиническими признаками первичных иммунодефицитов содержание TREC и/или KREC в сухом пятне крови уже на первой неделе жизни было значительно ниже рассчитанных нами нормативных интервалов [3]. Таким образом, своевременное проведение исследований по количественной оценке TREC/KREC у новорожденных могло сыграть решающую роль в ранней диагностике ПИД у таких пациентов и тем самым предотвратить неминуемые фатальные осложнения, случившиеся на первом году их жизни.

Определение количества TREC и KREC в образцах сухих пятен крови новорожденных с разным сроком гестации

Преждевременные роды являются одной из самых значимых проблем современного здравоохранения. Показано, что количество проведенных мероприятий интенсивного терапевтического и реанимационного воздействия обратно пропорционально гестационному возрасту плода. Ежегодно в отделения интенсивной терапии детских больниц поступают до 88% детей, рожденных на сроке до 34 недель, 12% родившихся на сроке 35-37 недель и только 2,6% младенцев, родившихся в срок [25].

Младенцы, родившиеся в срок до 32 недель гестации, в большей мере подвержены различным сердечно-сосудистым, неврологическим, метаболическим и желудочно-кишечным заболеваниям, а также имеют повышенную восприимчивость к инфекциям органов дыхания и мочевыводящих путей [38, 45]. Хотя многие из этих факторов риска действительно связаны с преждевременными родами, некоторые случаи тяжелой патологии новорожденных не могут быть объяснены только физиологической незрелостью жизненно важных органов и систем. Кроме того, в дополнение к незрелости иммунной системы, недоношенные дети подвергаются по-

вышенному риску приобретения рецидивирующих бактериальных инфекций в течение первых недель жизни из-за частого назначения инвазивных процедур, таких как катетеризация сосудов, парентеральное питание или искусственная вентиляция легких [28, 40, 45].

В развитых странах уровень недоношенных новорожденных составляет от 5 до 18% с тенденцией к росту [11]. Согласно данным из отчета областной службы охраны здоровья матери и ребенка, в Свердловской области за 5 лет (2010-2015 гг.) количество детей, родившихся при сроке гестации 22-36 недель, увеличилось с 5,9% до 7,2%.

Тенденция к увеличению доли детей, родившихся с низкой и экстремально низкой массой тела, создает дополнительные трудности в области неонатологии и педиатрии в целом и предъявляет определенные требования к осуществлению Программ неонатального скрининга в частности, поскольку зачастую требует пересмотра пороговых уровней биохимических маркеров и использования дополнительного (ретестового) исследования для данной категории новорожденных.

Более высокая частота аномальных результатов количества TREC у недоношенных новорожденных отмечается во многих исследованиях [16, 20, 32, 48]. В этом контексте незрелость иммунной системы как фактор, имеющий временный эффект, обусловленный гестационным возрастом, трудно отделим от специфических факторов, связанных с состоянием здоровья недоношенных новорожденных. Эти факторы могут включать в себя врожденные аномалии, инфекционные, эндокринологические осложнения и нарушения обмена веществ, которые также могут приводить к нарушениям функции тимуса и, как следствие, к снижению числа тимических мигрантов в периферической крови [15, 20]. Поэтому крайне важно найти алгоритм уточнения дефектных механизмов, лежащих в основе иммунных реакций у новорожденных, который будет способствовать раннему распознаванию пациентов с врожденной иммунной недостаточностью.

В отличие от многочисленных упоминаний о низких уровнях TREC среди недоношенных, данные о диапазоне значений KREC в этой группе в литературе представлены весьма незначительно [24].

С целью исследования влияния гестационного возраста плода на количество маркеров Т- и В-клеточного неогенеза (TREC и KREC) мы провели исследования данных маркеров среди групп новорожденных с разным сроком гестации: до 25-ти недель (n = 13), в 27-28 недель (n = 11), 30-32 недели (n = 15), 35-36 недель (n = 16).

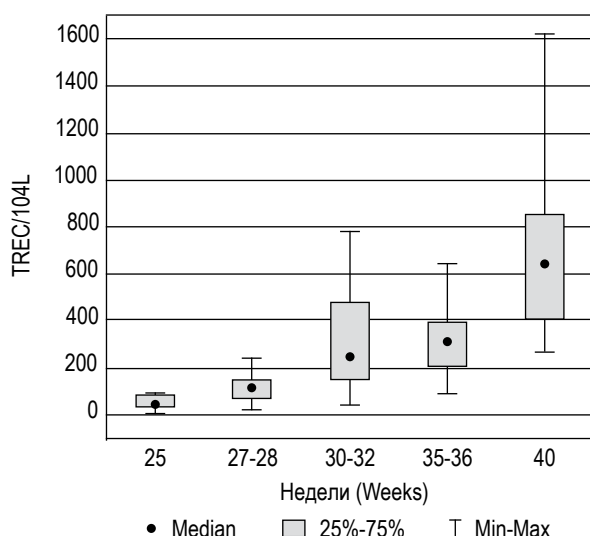


Рисунок 3. Значения TREC (копий/10⁴L) у новорожденных с разным гестационным возрастом
Примечание. На диаграмме для каждой группы отображены: медиана, квартильный размах ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), размах (минимум, максимум) переменной.

Figure 3. TREC data from premature infants in groups at different gestational age (< 25, 27-28, 30-32, 35-36 weeks) and full-term infants (40 weeks [$p = 0.001$, Mann-Whitney test])
Note. TREC concentration (copies per 10^4 leucocytes) is represented in box plot showing median, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$, minimal and maximal values.

Как и следовало ожидать, уровни TREC и KREC последовательно возрастали с увеличением срока гестации, однако динамика данных изменений концентрации маркеров оказалась различной, что, по нашему мнению, соответствовало динамике созревания самих Т- и В-лимфоцитов в антенатальном периоде.

Известно, что концентрация В-клеток значительно возрастает в системе кровообращения плода с середины второго триместра беременности и остается на высоком уровне в течение всего третьего триместра, заметно снижаясь перед самым рождением [29]. Прирост концентрации Т-клеток в тимусе в конце второго и особенно третьего триместра беременности заметно отстает по срокам от созревания В-клеток, почти полностью завершающегося к 30-й неделе [24, 38]. Отражением данных процессов созревания Т- и В-лимфоцитов явилось изменение определяемых уровней TREC и KREC. Так, количество копий TREC заметно возрастало с увеличением гестационного возраста: 47,3 (23-25 недель), 114,6 (27-28 недель), 243,5 (30-32 недели), 312,8 (35-36 недель) копий/10⁴L (здесь и далее указаны значения медиан), оставаясь достоверно ниже нормативных значений TREC (469,0 копий/10⁴L) у всех недоношенных детей с 24 по 36 недели гестации (критерий Манна-Уитни, $p = 0,001$)

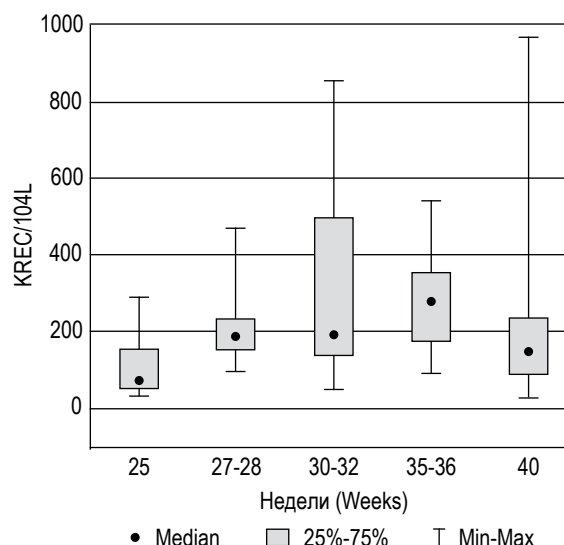


Рисунок 4. Значения KREC (копий/10⁴L) у новорожденных с разным гестационным возрастом ($p = 0,001$, тест Манна-Уитни)

Примечание. На диаграмме для каждой группы отображены: медиана, квартильный размах ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), размах (минимум, максимум) переменной.

Figure 4. KREC data from premature infants in groups at different gestational age (< 25, 27-28, 30-32, 35-36 weeks) and full-term infants (40 weeks [$p = 0.001$, Mann-Whitney test])
Note. KREC concentration (copies per 10^4 leucocytes) is represented in box plot showing median, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$, minimal and maximal values.

(рис. 3). Наиболее выраженный прирост концентрации Т-клеток наблюдался на протяжении третьего триместра беременности, что еще раз подтверждает данные о том, что последние недели внутриутробной жизни являются критическим кульминационным периодом для созревания иммунной системы плода [23, 24, 49].

Известно, что процесс созревания и дифференцировки лимфоцитов в тимусе заметно отстает по срокам от созревания В-клеток в костном мозге [30], поэтому у недоношенных детей нередко регистрируются низкие уровни маркера Т-клеточного неогенеза (TREC) при «нормальных» уровнях KREC [24]. В-клетки, впервые регистрируемые в печени плода с 8-й недели гестации, на 13-й неделе заселяют костный мозг, который к середине срока гестации становится преобладающим местом В-клеточного развития, а с 30-й недели остается единственным органом, поставляющим в кровь зрелые В-лимфоциты [38]. Концентрация В-клеток значительно возрастает в системе кровообращения плода с середины второго триместра беременности и остается на высоком уровне в течение всего третьего триместра, снижаясь перед самым рождением [29].

Поскольку эксцизионные кольца В-клеточного рецептора являются суррогатным маркером В-клеточного неогенеза, логично предполо-

жить, что динамика изменения количества копий KREC будет соответствовать динамике созревания самих В-лимфоцитов.

В нашем исследовании количество копий KREC у недоношенных достоверно возрастало в период с 22-й по 28-ю недели гестации: 72,4 (23-25 недель), 191,1 (27-28 недель), 187,8 (30-32 недели), 269,0 (35-36 недель) (критерий Манна-Уитни, $p = 0,01$) и после 28-й недели даже превысило уровень KREC доношенных новорожденных (147,3 копий/ 10^4 L) (рис. 4.).

Вполне вероятно, что это связано с усиленной пролиферацией В-клеточного пула лимфоцитов (как известно, количество KREC при этом не увеличивается) и процессом перераспределения В-клеток в организме ребенка, необходимым для выполнения адаптационных механизмов поддержания гомеостаза в меняющихся условиях окружающей среды. Таким образом, количество копий KREC, полученное в сухом пятне крови новорожденного со сроком гестации старше 28 недель, не ниже рассчитанных нормативных значений, служит своего рода сигналом адекватного (правильного) прохождения процесса созревания В-клеток в костном мозге и не требует взятия повторного образца для исследования данного маркера по достижении ребенком 37 недель («возраста доношенности»).

Однако, поскольку в качестве теста для программы неонатального скрининга на ТКИН предлагается использовать мультиплексную методику, т.е. одновременное исследование в сухом пятне крови сразу двух маркеров (TREC и KREC), оптимальный срок выполнения такого тестирования будет определяться маркером, для которого свойственно более позднее появление в системе кровообращения плода. В данном случае таковым является TREC.

Это означает, что рекомендуемый срок взятия образца крови для скрининга на ТКИН должен быть не ранее 37 недель гестации, поскольку именно в этом возрасте гарантировано получение наиболее информативных данных о состоянии иммунной системы ребенка. В этом контексте тестирование на ТКИН полностью соответствует срокам взятия образцов, принятым для большинства наследственных скринируемых заболеваний.

Однако необходимо учитывать, что полное отсутствие TREC или KREC в образце крови новорожденного любой степени недоношенности (при валидном количестве копий контрольного гена) должно служить сигналом для незамедлительного назначения этому ребенку консультации врача-иммунолога и проведения углубленного иммунологического обследования, поскольку именно этот факт (отсутствие маркеров наивных Т- и В-клеток) может явиться первым прогно-

стическим признаком фатального заболевания. Четкий алгоритм диагностики (ретестовое определение TREC и KREC в сухом пятне крови, УЗИ тимуса, иммунофенотипирование лимфоцитов, измерение уровней сывороточных иммуноглобулинов и др. иммунологических параметров) будет способствовать повышению уровня диагностического процесса в каждом конкретном случае и установлению истинной причины тяжелого состояния недоношенного ребенка с тяжелой лимфопенией, прогрессированием воспалительного процесса, нарастанием полиорганной недостаточности или другой иммунозависимой патологии, что было подтверждено в наших дальнейших исследованиях (неопубликованные данные).

Последующая молекулярно-генетическая верификация диагноза ПИД будет иметь значение для семейного анамнеза, поскольку знание о наследовании иммунодефицитного заболевания в семье позволит вести следующую беременность женщины с обязательным наблюдением у иммунолога и направлением на медико-генетическое консультирование.

Заключение

Как известно, клинические признаки иммунодефицитного состояния не всегда убедительно подтверждаются результатами стандартных иммунологических методов лабораторного анализа. Для дифференциации диагноза во многих случаях требуется проведение дорогостоящих специализированных иммунологических тестов: иммунофенотипирование, определение цитокинового профиля, определение химеризма лимфоцитов и др.

Напротив, предлагаемый метод генетического тестирования новорожденных на ТКИН и другие формы ПИД путем простого пятночного теста на TREC и KREC в первые дни жизни может значительно облегчить алгоритм обследования детей с подозрением на первичный иммунодефицит и другие формы иммунозависимой патологии, поскольку позволит формировать среди новорожденных группу риска по данным заболеваниям и заметно ускорять время постановки корректного диагноза в каждом конкретном случае. Однако для выбора корректных диагностических уровней отсечения необходимы дополнительные исследования на большей выборке (от 5 000 до 10 000 новорожденных популяции обследуемого региона) с последующей валидацией полученных референсных границ в исследованиях с включением больных с разными формами первичных иммунодефицитов.

Список литературы / References

1. Валиуллина А.Я., Ахмадеева Э.Н., Крывкина Н.Н. Проблемы и перспективы успешного выхаживания и реабилитации детей, родившихся с низкой и экстремально низкой массой тела // Вестник современной клинической медицины, 2013. Т. 6, № 1. С. 34-41. [Valiullina A.Ya., Akhmadeeva E.N., Kryvkina N.N. Problems and prospects for successful nursing and rehabilitation of newborns with low and extremely low body weight. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Bulletin of Modern Clinical Medicine*, 2013, Vol. 6, no. 1, pp. 34-41. (In Russ.)]
2. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филипенко М.Л., Протеус А.П. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 467-478. [Gordukova M.A., Oskorbin I.P., Mishukova O.V., Zimin S.B., Zinovieva N.V., Davydova N.V., Smirnova A.S., Nikitina I.A., Korsunsky I.A., Filipenko M.L., Prodeus A.P. Development of real-time multiplex pcr for the quantitative determination of TREC's and KREC's In whole blood and in dried blood spots. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 467-478. (In Russ.) doi:10.15789/1563-0625-2015-5-467-478.
3. Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Власова Е.В., Шершнева В.Н. Количественная оценка кольцевых структур TREC и KREC у детей с нарушениями функции иммунной системы на первом году жизни // Медицинская генетика, 2015. № 2. С. 53-54. [Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Vlasova E.V., Shershnev V.N. Quantitative assessment of TREC and KREC for children with impaired function of their immune system in the first year of life. *Meditsinskaya genetika = Medical Genetics*, 2015, no. 2, pp. 53-54. (In Russ.)]
4. Донецкова А.Д., Ярилин А.А. Т-рецепторные эксцизионные кольца и значимость их определения в клинике // Иммунология, 2013. Т. 34, № 4. С. 220-226. [Donetskova A.D., Yarilin A.A. T-receptor excision circles and the significance of their determination in the clinic. *Immunologiya = Immunology*, 2013, Vol. 34, no. 4, pp. 220-226. (In Russ.)]
5. Кузьменко Н.Б., Варламова Т.В., Мерсиянова И.В. Молекулярно-генетическая диагностика первичных иммунодефицитных состояний: (обзор лит. и собств. клин. наблюдения) // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2016. № 1. С. 10-16. [Kuzmenko N.B., Varlamova T.V., Mersiyanova I.V. Molecular genetic diagnosis of primary immunodeficiencies (Review of literature and clinical case reports). *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Questions of Hematology/Oncology and Immunopathology in Pediatrics*, 2016, no. 1, pp. 10-16. (In Russ.)]
6. Латышева Е.А. Первичные иммунодефициты: состояние проблемы на сегодняшний день: Jmf-центры в России // Вопросы современной педиатрии, 2013. Т. 12, № 6. С. 73-77. Latysheva E.A. Primary immunodeficiency: status of a problem today. Russian network of Jmf-centers. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2013, Vol. 12, no. 6, pp. 73-77. (In Russ.)]
7. Литвицкий П.Ф., Синельникова Т.Г. Врожденный иммунитет: механизмы реализации и патологические синдромы: ч. 2. // Вопросы современной педиатрии, 2009. Т. 8, № 2. С. 59-67. [Litvitsky P., Sinelnikova T. Inborn immunity: mechanisms of realization and pathological syndromes. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2009, Vol. 8, no. 2, pp. 52-58. (In Russ.)]
8. О совершенствовании массового обследования новорожденных детей на наследственные заболевания на территории Свердловской области: приказ Минздрава Свердл. обл. № 166-П от 02.03.2012: [Электронный ресурс] // Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации: <http://docs.cntd.ru/document/412369518> (дата обращения: 28.04.15). [On the improvement of the mass newborn screening for hereditary diseases in the Sverdlovsk region: the law of Health of the Sverdlovsk region No. 166-P of 02/03/2012: [URL] // Electronic Fund of legal and normative-technical documentation. Access mode: <http://docs.cntd.ru/document/412369518> (date of access: 2015, April 28).
9. Овсянников Д.Ю., Илларионова Т.Ю., Пушко Л.В., Кузьменко Л.Г. Часто болеющие дети: что еще кроме инфекций? // Вопросы современной педиатрии, 2013. Т. 12, № 1. С. 74-86. [Ovsyannikov D.Yu., Illarionova T.Yu., Pushko L.V., Kuz'menko L.G. Frequently ill children: what else besides infections? *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2013, Vol. 12, no. 1, pp. 74-86. (In Russ.)]
10. Парахонский, А.П. Пути и трудности развития клинической иммунологии // Современные наукоемкие технологии, 2010. № 10. С. 71-75. [Parakhonsky A.P. Ways and difficulties of the clinical immunology development. *Sovremennyye naukoemkie tekhnologii = Modern Science-Intensive Technologies*, 2010, no. 10, pp. 71-75. (In Russ.)]
11. Совершенствование практических подходов в акушерстве и фетальной медицине: информационный бюллетень: рек. Междунар. федерации акушеров-гинекологов (FIGO) 2015 года / под ред. В.Е. Радзинского. М.: Редакция журнала StatusPraesens, 2015. 8 с. [Recommendations of the International Federation of Obstetricians and Gynecologists (FIGO) 2015. Perfection of practical approaches in obstetrics and fetal medicine. Information Bulletin (Ed. V.E. Radzinsky)]. Moscow: Editorial office of the journal StatusPraesens, 2015. 8 p.

12. Стеганцева М.В., Кустанович А.М., Шарапова С.О., Определение кольцевых структур ДНК Т-клеточного (TREC) и В-клеточного (KREC) рецептора как маркера эффективности функционирования иммунной системы // Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии: сб. науч. тр. Минск, 2012. С. 206-214. [Stegantseva M.V., Kustanovich A.M., Sharapova S.O. Determination of T-cell (TREC) and B-cell (KREC) receptor excision circles as a markers for the effectiveness of the immune system functioning. *Aktual'nye voprosy detskoy onkologii, gematologii i immunologii: sbornik nauchnykh trudov = Actual Questions of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology: a Collection of Scientific Papers*, Minsk, 2012, pp. 206-214. (In Russ.)]
13. Тузанкина И.А. К вопросу диагностики иммунопатологии // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 6. С. 485-496. [Tuzankina I.A. About problem of immunopathology's diagnostics. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 6, pp. 485-496. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2010-6-485-496.
14. Щербина А.Ю. Маски первичных иммунодефицитных состояний: проблемы диагностики и терапии // Российский журнал детской гематологии и онкологии, 2016. Т. 3, № 1. С. 52-58. [Shcherbina A.Yu. Masks of primary immunodeficiency disorders: diagnostic and therapeutic problems. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Children Hematology and Oncology*, 2016, Vol. 3, no. 1, pp. 52-58. (In Russ.)]
15. Accetta D.J. Cause of death in neonates with inconclusive or abnormal T-cell receptor excision circle assays on newborn screening. *J. Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 31, no. 6, pp. 962-967.
16. Adams S.P., Rashid S., Premachandra T., Harvey K., Ifederu A., Wilson M.C., Gaspar H.B. Screening of neonatal UK dried blood spots using a duplex TREC screening assay. *J. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 34, no. 3, pp. 323-330.
17. Adkins B., Leclerc C., Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nature Reviews Immunology*, 2004, Vol. 4, no. 7, pp. 553-564.
18. Arkwright P.D., Gennery A.R. Ten warning signs of primary immunodeficiency: a new paradigm is needed for the 21st century. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2011, Vol. 123, no. 8, pp. 7-14.
19. Audrain M., Thomas C., Mirallie S., Bourgeois N., Sebille V., Rabetrano H., Durand-Zaleski I., Boisson R., Persyn M., Pierres C., Mahlaoui N., Fischer A. Evaluation of the T-cell receptor excision circle assay performances for severe combined immunodeficiency neonatal screening on Guthrie cards in a French single centre study. *Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 150, no. 2, pp. 137-139.
20. Borte S., von Döbeln U., Fasth A., Wang N., Janzi M., Winiarski J., Sack U., Pan-Hammarström Q., Borte M., Hammarström L. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 11, pp. 2552-2555.
21. Chapel H., Prevot J., Gaspar H.B., Español T., Bonilla F.A., Solis L., Drabwell J. Primary immune deficiencies – principles of care. *Frontiers in Immunology*, 2014, Vol. 5, no. 627, pp. 1-15.
22. Chiarini M., Zanotti C., Serana F., Sottini A., Bertoli D., Caimi L., Imberti L. T-cell receptor and K-deleting recombination excision circles in newborn screening of T- and B-cell defects: review of the literature and future challenges. *Journal of Public Health Research*, 2013, Vol. 2, no. 1, pp. 9-16.
23. Clapp D.W. Developmental regulation of the immune system. *Semin. Perinatol.*, 2006, Vol. 30, no. 2, pp. 69-72.
24. de Felipe B., Olbrich P., Lucenas J.M. Prospective neonatal screening for severe T- and B-lymphocyte deficiencies in Seville. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2016, Vol. 27, no. 1, pp. 70-77.
25. Escobar G.J., Greene J.D., Hulac P., Kincannon E., Bischoff K., Gardner M.N., Armstrong M.A., France E.K. Rehospitalization after birth hospitalization: patterns among infants of all gestations. *Arch. Dis. Child*, 2005, Vol. 90, no. 2, pp. 125-131.
26. Geha R.S., Notarangelo L.D., Casanova J.L., Chapel H., Conley M.E., Fischer A., Hammarström L., Nonoyama S., Ochs H.D., Puck J.M., Roifman C., Seger R., Wedgwood J. Primary immunodeficiency diseases: an update from the international Union of Immunological Societies Primary immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 120, no. 4, pp. 776-794.
27. Glass H.C., Bonifacio S.L., Chau V., Glidden D., Poskitt K., Barkovich A.J., Ferriero D.M., Miller S.P. Recurrent postnatal infections are associated with progressive white matter injury in premature infants. *Pediatrics*, 2008, Vol. 122, no. 2, pp. 299-305.
28. Holt P.G., Jones C.A. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy*, 2000, Vol. 55, no. 8, pp. 688-697.
29. Huenecke S., Fryns E., Wittekindt B., Buxmann H., Königs C., Quaiser A., Fischer D., Bremm M., Klingebiel T., Koehl U., Schloesser R., Bochennek K. Percentiles of lymphocyte subsets in preterm infants according to gestational age compared to children and adolescents. *Human Immunology*, 2016, Vol. 84, no. 5, pp. 291-298.
30. Ito T., Liu Y.J., Kadowaki N. Functional diversity and plasticity of human dendritic cell subsets. *Int. J. Hematol.*, 2005, Vol. 81, no. 3, pp. 188-196.

31. Kalman L., Lindegren M.L., Kobrynski L., Vogt R., Hannon H., Howard J.T., Buckley R. Mutations in genes required for T-cell development: IL7R, CD45, IL2RG, JAK3, RAG1, RAG2, ARTEMIS, and ADA and severe combined immunodeficiency: HuGE review. *Genet. Med.*, 2004, Vol. 6, no. 1, pp. 16-26.
32. Kwan A., Abraham R.S., Currier R., Brower A., Andruszewski K., Abbott J.K., Baker M., Ballow M., Bartoshesky L.E., Bonilla F.A., Brokopp C., Brooks E., Caggana M., Celestin J., Church J.A., Comeau A.M., Connelly J.A., Cowan M.J., Cunningham-Rundles C., Dasu T., Dave N., De La Morena M.T., Duffner U., Fong C.T., Forbes L., Freedenberg D., Gelfand E.W., Hale J.E., Hanson I.C., Hay B.N., Hu D., Infante A., Johnson D., Kapoor N., Kay D.M., Kohn D.B., Lee R., Lehman H., Lin Z., Lorey F., Abdel-Mageed A., Manning A., McGhee S., Moore T.B., Naides S.J., Notarangelo L.D., Orange J.S., Pai S.Y., Porteus M., Rodriguez R., Romberg N., Routes J., Ruehle M., Rubenstein A., Saavedra-Matiz C.A., Scott G., Scott P.M., Secord E., Seroogy C., Shearer W.T., Siegel S., Silvers S.K., Stiehm E.R., Sugerman R.W., Sullivan J.L., Tanksley S., Tierce M.L. 4th, Verbsky J., Vogel B., Walker R., Walkovich K., Walter J.E., Wasserman R.L., Watson M.S., Weinberg G.A., Weiner L.B., Wood H., Yates A.B., Puck J.M., Bonagura V.R. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA*, 2014, Vol. 312, no. 7, pp. 729-738.
33. Kwan A., Puck J.M. History and current status of newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Semin. Perinatol.*, 2015, Vol. 39, no. 3, pp. 194-205.
34. Nakagawa N., Imai K., Kanegane H., Sato H., Yamada M., Kondoh K., Okada S., Kobayashi M., Agematsu K., Takada H., Mitsuiki N., Oshima K., Ohara O., Suri D., Rawat A., Singh S., Pan-Hammarström Q., Hammarström L., Reichenbach J., Seger R., Ariga T., Hara T., Miyawaki T., Nonoyama S. Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 128, no. 1, pp. 223-225.
35. Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. Quantification of mRNA Using Real-Time RT-PCR / T. Nolan, R.E. Hands, S.A. Bustin. *Nature Protocols*, 2006, Vol. 1, no. 3, pp. 1559-1582.
36. Ou X., Zhao H., Sun H., Yang Z., Xie B., Shi Y., Wu X. Detection and quantification of the age-related sjTREC decline in human peripheral blood. *International Journal of Legal Medicine*, 2011, Vol. 125, no. 4, pp. 603-608.
37. Pérez A., Gurbindo M.D., Resino S., Aguarón A., Muñoz-Fernández MA. NK cell increase in neonates from the preterm to the full-term period of gestation. *Neonatology*, 2007, Vol. 92, no. 3, pp. 158-163.
38. Quinello C., Silveira-Lessa A.L., Ceccon M.E.J.R., Cianciarullo M.A., Carneiro-Sampaio M., Palmeira P. Phenotypic differences in leucocyte populations among healthy preterm and full-term newborns. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 80, pp. 57-70.
39. Rozmus J., Junker A., Thibodeau M.L., Grenier D., Turvey S.E., Yacoub W., Embree J., Haddad E., Langley J.M., Ramsingh R.M., Singh V.A., Long R., Schultz K.R. Severe combined immunodeficiency (SCID) in Canadian children: A national surveillance study. *J. Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 33, no. 8, pp. 1310-1316.
40. Shane A.L., Stoll B.J. Neonatal sepsis: progress towards improved outcomes. *Journal of Infection*, 2014, Vol. 68, no. 1, pp. 24-32.
41. Sharma A.A., Jen R., Butler A., Lavoie P.M. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. *Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 145, no. 1, pp. 61-68.
42. Somech R., Lev A., Simon A.J., Korn D., Garty B.Z., Amariglio N., Rechavi G., Almashanu S., Zlotogora J., Etzioni A. Newborn screening for severe T and B cell immunodeficiency in Israel: a pilot study. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2013, Vol. 15, no. 8, pp. 404-409.
43. Sottini A., Ghidini C., Zanotti C., Chiarini M., Caimi L., Lanfranchi A., Moratto D., Porta F., Imberti L. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. *Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 136, no. 2, pp. 217-227.
44. Stoll B.J., Hansen N., Fanaroff A.A., Wright L.L., Carlo W.A., Ehrenkranz R.A., Lemons J.A., Donovan E.F., Stark A.R., Tyson J.E., Oh W., Bauer C.R., Korones S.B., Shankaran S., Laptook A.R., Stevenson D.K., Papile L.A., Poole W.K. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 2002, Vol. 110, no. 2, Pt 1, pp. 285-291.
45. Stoll B.J., Hansen N.I., Higgins R.D., Fanaroff A.A., Duara S., Goldberg R., Laptook A., Walsh M., Oh W., Hale E. Very low birth weight preterm infants with early onset neonatal sepsis: the predominance of gram-negative infections continues in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 2002-2003. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2005, Vol. 24, no. 7, pp. 635-639.
46. van der Spek J., Groenwold R.H., van der Burg M., van Montfrans J.M. TREC based newborn screening for severe combined immunodeficiency disease: a systematic review. *J. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 35, no. 4, pp. 416-430.
47. van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J. PID comes full circle: application of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Front. Immunol.*, 2011, Vol. 2, p. 12.
48. Vogel B.H., Bonagura V., Weinberg G.A., Ballow M., Isabelle J., DiAntonio L., Parker A., Young A., Cunningham-Rundles C., Fong C.T., Celestin J., Lehman H., Rubinstein A., Siegel S., Weiner L., Saavedra-Matiz C., Kay D.M., Caggana M. Newborn screening for SCID in New York State: experience from the first two years. *J. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 34, no. 3, pp. 289-303.

49. Wang M.L., Dorer D.J., Fleming M.P., Catlin E.A. Clinical outcomes of near-term infants. *Pediatrics*, 2004, Vol. 114, no. 2, pp. 372-376.
50. Whelan M.A., Hwan W.H., Beausoleil J., Hauck W.W., McGeedy S.J. Infants presenting with recurrent infections and low immunoglobulins: characteristics and analysis of normalization. *J. Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 26, no. 1, pp. 7-11.
51. Yu H.H., Lee W.I., Tsai L.P., Hsu L.W., Hu M.H., Hwu W.L. Incidence of severe combined immunodeficiency through newborn screening in a Chinese population. *J. Formos Med. Assoc.*, 2015. Vol. 114, no. 1, pp. 12-16.
52. Zasada M., Kwinta P., Durlak W., Bik-Multanowski M., Madetko-Talowska A., Pietrzyk J.J. Development and Maturation of the Immune System in Preterm Neonates: Results from a Whole Genome Expression Study. *BioMed Research International*, 2014. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/498318/> (Accessed 19 February 2017).

Авторы:

Дерябина С.С. — заведующая лабораторией молекулярной диагностики ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр „Охрана здоровья матери и ребенка“»; младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; младший научный сотрудник кафедры иммунохимии ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

Тузанкина И.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; ведущий научный сотрудник кафедры иммунохимии ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина; врач аллерголог-иммунолог научного отдела ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Шершнева В.Н. — к.ф.-м.н., доцент, ФГБУН «Институт промышленной экологии» Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры вычислительной техники, ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Deryabina S.S., Head, Laboratory of Molecular Diagnostics, Medical Center “Health Care of Mother and Child”; Junior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Junior Research Associate, Department of Immunochemistry, B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Tuzankina I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Leading Research Associate, Department of Immunochemistry, B.N. Yeltsin Ural Federal University; Clinical Allergologist/Immunologist, Research Department, Regional Children Clinical Hospital No. 1, Ekaterinburg, Russian Federation

Shershnev V.N., PhD (Physics/Mathematics), Associate Professor, Institute of Industrial Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Assistant Professor, Department of Computer Science, B.N. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 11.06.2017

Отправлена на доработку 21.06.2017

Принята к печати 13.07.2017

Received 11.06.2017

Revision received 21.06.2017

Accepted 13.07.2017

ТРИПТАЗА РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ И IgE-АНТИТЕЛА КАК МАРКЕР АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

Карпук И.Ю.

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

Резюме. Целью исследования явилось определение концентрации триптазы тучных клеток (ТТК) в ротовой жидкости (РЖ) и IgE-антител в крови у пациентов с симптомами непереносимости стоматологических материалов (НСМ) до и после удаления причинных ортопедических конструкций.

Проведено обследование пациентов, обратившихся с жалобами на НСМ, которые были разделены на 2 группы в зависимости от временного интервала между окончанием зубопротезирования и появлением патологических симптомов: 1 группа (n = 19) – от 1 до 14 суток (возникновение симптомов отмечалось сразу после протезирования, а в последующем они нарастали); 2 группа (n = 18) – от полугода до 5 лет; 3 группа (n = 16) – контрольная – без жалоб на НСМ. Образцы ротовой жидкости (РЖ) для измерения ТТК собирались у пациентов до снятия причинных ортопедических конструкций и через месяц после снятия.

В группе пациентов с НСМ и возникновением симптомов НСМ на 1-е – 14-е сутки после протезирования ТТК в РЖ выявлялась у 16 (84,2%) пациентов до снятия причинных ортопедических конструкций, а через месяц после снятия ортопедических конструкций ТТК в РЖ не определялась ($p \leq 0,001$). У пациентов контрольной группы ТТК в РЖ не определялась до и после снятия ортопедических конструкций. Таким образом, ТТК в РЖ является диагностическим маркером аллергии на КСМ. У пациентов с возникновением симптомов НСМ на 1-е – 14-е сутки после протезирования выявлены IgE-антитела к: Ni-HSA – у 78,9% пациентов, Cr-HSA – у 68,4% пациентов, Co-HSA – у 52,6% пациентов. Уровень ТТК в РЖ сильно коррелировал с уровнем IgE-антител к Ni-HSA ($R_{\text{Spearman}} = 0,9$; $p < 0,05$) и Cr-HSA – умеренно ($R_{\text{Spearman}} = 0,7$; $p < 0,05$). Полученные данные указывают на превалирование немедленного типа реакции на КСМ. Выраженное локальное повышение уровня ТТК представляет собой важный патогенетический маркер местной инициации воспалительного процесса в полости рта. ТТК в РЖ выявлена только у 3 (16,7%) пациентов с возникновением симптомов НСМ от полугода до 5 лет (n = 18), и у них же IgE-антитела к металлам в сыворотке крови, что указывает на IgE-зависимый характер реакции у них. У остальных пациентов 2 группы, по-видимому, имеется иной тип аллергической реакции – замедленный, или гранулоцитопосредованный.

Для достоверной диагностики аллергии на компоненты стоматологических материалов целесообразно измерение ТТК в РЖ до и после снятия ортопедических конструкций. Мониторинг уровня ТТК в РЖ позволяет оценить причинность ортопедических конструкций в возникновении НСМ и необходимость замены их замены.

Ключевые слова: аллергия, IgE-антитела, триптаза, тучные клетки, ротовая жидкость, стоматологические материалы

Адрес для переписки:

Карпук Иван Юрьевич
УО «Витебский государственный медицинский университет»
210602, Республика Беларусь, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27.
Тел.: +375 (212) 22-53-80.
E-mail: ikarpuk@mail.ru

Address for correspondence:

Karpuk Ivan Yu.
Vitebsk State Medical University
210602, Republic of Belarus, Vitebsk, Frunze ave, 27.
Phone: +375 (212) 22-53-80.
E-mail: ikarpuk@mail.ru

Образец цитирования:

И.Ю. Карпук «Триптаза ротовой жидкости и IgE-антитела как маркер аллергического воспаления слизистой оболочки полости рта» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 99–106.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-99-106
© Карпук И.Ю., 2018

For citation:

I.Yu. Karpuk “Tryptase of oral liquid and IgE-antibodies as a marker of allergic inflammation in the oral mucosa”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 99–106.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-99-106
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-99-106

TRYPTASE OF ORAL LIQUID AND IgE-ANTIBODIES AS A MARKER OF ALLERGIC INFLAMMATION IN THE ORAL MUCOSA

Karpuk I.Yu.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Abstract. The goal of present study was to determine the levels of mast cell tryptase (MCT) in whole saliva, and blood serum IgE antibodies in patients with intolerance for dental prosthetic materials (IDM) before and after removal of prosthetic constructs.

We have conducted examination of the patients suffering from the IDM symptoms, who were divided into 2 groups depending on the time span between the end of prosthetic treatment and emergence of pathological symptoms: group 1 (n = 19), 1 to 14 days (symptoms emerged immediately after treatment); group 2, (n = 18), IDM symptoms occurring 6 months to 5 years later; group 3 (n = 16), controls without complaints for IDM. Whole saliva (WS) samples were collected before removal of prosthetic constructs and 1 month later. In group 1, salivary MCT was detected in 16 subjects (84.2%) before removal of prosthetic constructs, while 1 month after MCT not detectable in saliva ($p < 0.001$). Salivary MCT in control group was not detected both before and after removal of prosthetic constructions. Hence, mast cell tryptase in whole saliva could be a diagnostic marker for intolerance to dental materials. In group 1 of the patients, we detected IgE antibodies to Ni-HSA in 78.9% of patients, IgE antibodies to Cr-HSA in 68.4% of patients and IgE to Co-HSA in 52.6% of patients. Salivary MCT levels strongly correlated with IgE levels to Ni-HSA ($R_{\text{spearman}} = 0.9$; $p < 0.05$), showing moderate correlation with Cr-HSA ($R_{\text{spearman}} = 0.7$; $p < 0.05$). The data obtained suggest some prevalence of immediate type immune reaction against dental materials. Notable local increase of MCT level could be an important diagnostic marker of local inflammatory process initiation. MCT in whole saliva was found only in 3 patients (16.7%) from group 2; those had IgE antibodies to metal ions in blood serum, thus indicating IgE-dependent reaction type. Other patients from group 2 were likely to develop a different type of allergic reaction, e. g. delayed or granulocyte-mediated response.

To perform reliable diagnostics of allergy to the components of dental materials, it is reasonable to measure salivary MCT before and after removal of prosthetic constructs. Salivary MCT level monitoring allows to confirm a role of prosthetic constructs in IDM emergence, and a need for their replacement.

Keywords: allergy, IgE-antibodies, tryptase, mast cells, whole saliva, dental materials

Введение

Тучные клетки (ТК) являются иммунными клетками гемопоэтического происхождения. Они относятся к врожденной ветви иммунной системы и проявляют ряд морфологических и функциональных сходств с базофилами, включая общую клетку-предшественника, вырабатывающую триптазу [20]. Большинство ТК располагаются в местах взаимодействия между организмом и окружающей средой, например, коже, слизистых оболочках, которые являются идеальным местом для ТК, реагирующие на антигены и аллергены. ТК участвуют в иммунной регуляции, от начала поступления патогена до разрешения воспаления [15]. Однако наиболее заметна роль ТК в эффекторной фазе немедленных аллергических реакций: массивной дегрануляции с высвобождением накопленных медиаторов в ответ на мощный стимул, основой которого является агрегация иммуноглобулин-(Ig)-Е-несущих FcRI-рецепторов мультивалентным аллергеном, за которым следует вторая волна отсроченной секреции медиатора [8]. В процессе дегрануля-

ции, вызванной IgE, секреторные гранулы (СГ) тучных клеток сливаются между собой и с плазматической мембраной, выделяясь затем во внеклеточное пространство [9]. СГ несут десятки предварительно сформированных медиаторов, включая зрелую триптазу [10]. Имеется различие между индуцированной IgE дегрануляцией ТК, которая вовлекает СГ-область очень крупных гранул (диаметром до 0,5-1 мкм), и процессом экзоцитоза, на различные стимулы, вызывающим вовлечение небольших секреторных везикул, обычно 80 нм или менее [5]. Триптазы тучных клеток (ТТК) представляют собой семейство трипсиноподобных сериновых протеаз, присутствующих в больших количествах в секреторных гранулах человека [16]. Подобно химазам, другой группе сериновых протеаз ТК, триптазы являются высокоспецифичными для ТК. Обнаружение триптазы или химазы дает информацию об участии ТК, количестве активации в зависимости от клинического состояния [17].

Технически измерение уровня ТТК является высокоспецифичным, хотя сообщалось о лож-

но повышенных уровнях ТТК в сыворотке крови, содержащей гетерофильные антитела, такие как ревматоидный фактор [13]. Такие помехи являются редким явлением и оказывают незначительное влияние на измеренные уровни ТТК [14].

Ранее ТТК рассматривалась главным образом как маркер либо острых аллергических реакций, либо исходного состояния тучных клеток. Согласно недавно опубликованной глобальной унифицирующей классификации расстройств тучных клеток [18], диагностическое значение определения триптазы включает: синдром активации тучных клеток, мастоцитоз, гиперплазию тучных клеток и миеломастоцитарные состояния [18].

При диагностике аллергии для выявления антител к компонентам стоматологических материалов (КСМ), связанных с лейкоцитами пациента, обычно используется прямой тест дегрануляции базофилов [3, 12].

Несмотря на внедрение в клиническую практику широкого спектра методов диагностики аллергии на КСМ, соответствующих тем или иным звеньям ее патогенеза, важной и нерешенной проблемой остается поиск новых патогенетических маркеров, сопровождающих воспалительно-деструктивные изменения в тканях при непереносимости стоматологических материалов (НСМ).

Увеличение концентрации триптазы тучных клеток (ТТК) в жидких средах организма является диагностическим маркером функционирования тучных клеток. Впервые это было обнаружено в сыворотке пациентов с анафилактическими реакциями [7]. После местной провокационной пробы уровень ТТК возрастал в назальном секрете [11], слезной [19], бронхоальвеолярной жидкости [6].

Измерение концентраций ТТК в РЖ до и после провокационного теста у пациентов с пищевой аллергией показало возможность использования ТТК в диагностических целях [12].

Таким образом, уровни исходной ТТК в биологических жидкостях дают информацию о потенциальной реакции тучных клеток, которые увеличивают риск развития аллергии. Даже уровни ТТК в пределах обычного «нормального диапазона» оказывают влияние на риск аллергии. Поэтому измерение пиковых и базовых уровней ТТК у пациентов с НСМ является весьма актуальным.

Цель работы — определение концентрации ТТК в РЖ и IgE-антител в крови у пациентов с симптомами с НСМ до и после удаления причинных ортопедических конструкций.

Материалы и методы

Проведено обследование 37 пациентов, обратившихся с жалобами на НСМ в клинику кафедр общей стоматологии с курсом ортопедиче-

ской стоматологии клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «ВГМУ» в возрасте 55,7 [41; 67] года, из них 6 мужчин и 31 женщина.

Контрольную группу составили пациенты, сопоставимые по полу, возрасту, типу конструкций и количеству зубопротезных единиц, с пациентами опытной группы согласившиеся пройти обследование на наличие гиперчувствительности к зубопротезным материалам, перед плановой заменой ортопедических конструкций.

Пациенты с жалобами на НСМ были разделены на 2 группы в зависимости от временного интервала между окончанием зубопротезирования и появлением патологических симптомов:

1 группа (n = 19) — от 1 до 14 суток (возникновение симптомов отмечалось сразу после протезирования, а в последующем они нарастали); медиана возраста пациентов данной группы составила 53,4 [33; 69] года, из них 3 мужчин и 16 женщин;

2 группа (n = 18) — от полугода до 5 лет; медиана возраста пациентов данной группы составила 58 [51,5; 63,5] лет, из них 3 мужчин и 15 женщин;

3 группа (n = 16) — контрольная — 2 мужчин и 15 женщин в возрасте 56,5 лет [45; 67] лет без жалоб на НСМ.

Все пациенты 1 и 2 групп указывали на наличие причинно-следственной связи между возникновением симптомов непереносимости зубопротезного материала и фактом контакта с ним.

Клиническими проявлениями у пациентов 1 группы были уртикарные высыпания, локальный зуд и отечность, отеки губ и щек по типу отека Квинке с выраженным нарушением самочувствия и признаками нейровегетативной дисрегуляции. Диагноз аллергии обосновывался клиникой и специфическим аллергологическим обследованием в условиях специализированного аллергологического отделения.

При клиническом обследовании у пациентов 2 группы диагностированы следующие локальные объективные симптомы: контактный аллергический стоматит, локализованный гингивит, глоссит, хронический рецидивирующий афтозный стоматит. Наиболее частым клиническим симптомом явился стоматит, локализованный в области причинных ортопедических конструкций.

При постановке диагноза мы имели в виду следующие закономерности, помимо клинически видимых проявлений:

1. Быстрое обратное развитие клиники после снятия причинно-значимой ортопедической конструкции.

2. Реакция на малые по протяженности ортопедические конструкции (даже на 1 коронку).

В 70% случаев имела связь с аллергией на металлические изделия.

У 40% пациентов в анамнезе имела аллергия на лекарства. Из них: полусинтетические пе-

нициллины — 55% случаев, сульфаниламидные препараты — 15%, местные анестетики — 10% случаев, эритромицин — 10% случаев, элиниум, седуксен — 7%, нестероидные противовоспалительные препараты — 3% случаев.

Исходя из современных представлений о механизмах неблагоприятного действия стоматологических материалов на слизистую оболочку полости рта (СОПР) мы провели тщательный отбор пациентов в эту группу, исключая реакции, связанные с дисметаболизмом и функциональной недостаточностью печени, других органов желудочно-кишечного тракта и почек, имеющих иногда сходные, но по сути неаллергические проявления. По фоновым заболеваниям это были пациенты с повторными заболеваниями инфекционно-воспалительного генеза со стороны органов дыхания, с органической патологией желудочно-кишечного тракта (язва желудка, хронический гастродуоденит), 2 пациента с острой ревматической лихорадкой, 6 пациентов были клинически здоровы.

Все пациенты, включенные в исследование, дали и собственноручно заполнили добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Непрямая реакция дегрануляции тучных клеток (нРДТК).

1. Подготовка исследуемой сыворотки

Кровь пациента, взятую путем венепункции, в количестве 5-7 мл обводили по краю стеклянной палочкой, отстаивали до образования сгустка, затем центрифугировали при 1500 об/мин, после этого отбирали сыворотку в пробирку. Сыворотку хранили при -20 °С до исследования, не допуская повторного замораживания и оттаивания.

2. Получение тучных клеток мыши

Мышь декапитировали, в брюшную полость вводили 5-8 мл подогретого до 37 °С 0,9% раствора NaCl, приготовленного на 0,15 М фосфатном буфере pH 7,2, и оставляли мышь на 20 минут, периодически массируя ее переднюю брюшную стенку. Затем послойно вскрывали брюшную полость и пинцетом выводили петлю кишечника. Тушку переворачивали в воронку так, чтобы содержимое брюшной полости стекало по петле в пробирку, содержащую 1 мл забуференного физиологического раствора с 1-2 каплями гепарина. Перитонеальные клетки отмывали путем центрифугирования при 1000 об/мин по 3-5 минут дважды, добавляя по 2 мл забуференного физиологического раствора. Полученную суспензию тучных клеток разбавляли до концентрации $2,5 \times 10^5$ мл забуференным физиологическим раствором (80-100 тучных клеток в камере Горяева).

Для определения концентрации клеток в лунку круглодонной планшеты вносили 0,02 мл суспензии тучных клеток и 0,02 мл красителя толу-

идинового синего и подсчитывали в камере Горяева окрашенные клетки.

3. Приготовление растворов аллергенов в рабочей концентрации

В качестве аллергенов использовали 0,01% растворы NiCl₂, CrCl₃, CoCl₂ разведенные физиологическим раствором.

4. Приготовление красителя толуидинового синего 0,025% спиртового раствора: 25 мл краски растворяли в 100 мл 30% этилового спирта, pH которого доводили до 3,2-3,4 добавлением ледяной уксусной кислоты, 0,03-0,04 мл на 10 мл красителя.

5. Постановку реакции осуществляли в планшетах для иммунологических исследований. В опытную лунку вносили 0,02 мл суспензии тучных клеток, добавляли равные объемы растворов аллергенов и инкубировали 15 минут при 37 °С.

Параллельно ставили два контроля: 1) тучные клетки + сыворотка больного + раствор Хенкса; 2) тучные клетки + раствор Хенкса + раствор аллергена.

В опыт и два контроля добавляли 0,02 мл красителя и проводили учет реакции в камере Горяева. Подсчитывали количество тучных клеток, учитывая только целые неповрежденные окрашенные клетки в горизонтальных рядах сетки всей камеры. Разница между контролем и опытом указывала на количество дегранулированных клеток.

Результат реакции рассчитывали по формуле:

$$X = (K - O) : K \times 100\%,$$

где:

X — процент дегранулированных тучных клеток;

K — количество клеток в контроле;

O — количество клеток в опыте.

Реакцию считали положительной, если число окрашенных клеток в опыте уменьшалось на 20% и более по сравнению с контролем.

Для качественной оценки степени дегрануляции базофилов у конкретного пациента выделяли три степени дегрануляции:

— прирост до 10% — «-» — отрицательная реакция;

— прирост 10 — 19% — «±» — сомнительная реакция;

— прирост 20 — 40% — «+» — положительная реакция;

— прирост более 40% — «++» — резкоположительная реакция.

Определение IgE-антител к металлам в сыворотке крови

Для выявления IgE-антител к ионам металлов мы использовали стандартную иммуноферментную тест-систему фирмы EUROIMMUN (Германия).

В качестве аллергенов были использованы аллергодиски с Ni-HSA, Cr-HSA, Co-HSA, Gold-HSA.

Концентрацию IgE в исследуемых образцах определяли, внося полученные значения оптиче-

ской плотности в калибровочный график. Уровни антител определяли согласно инструкции.

Определение триптазы осуществляли согласно инструкции производителя тест-системы (Human TPS (Tryptase) ELISA kit, кат. номер № E-EL-H1262).

Оценку реакции проводили на фотометре при длине волны 450 нм.

Забор РЖ пациента

Пациенты за сутки до забора РЖ не употребляли алкоголь, продукты с кофеином, никотин, за двое суток — противоаллергические лекарственные средства (антигистаминные, глюкокортикостероиды), исключали потенциально аллергенные продукты и напитки.

Пациент ополаскивал рот 50 мл 0,9% раствора хлорида натрия в течение 3 мин, после чего раствор выплевывал. Через 10 мин РЖ в объеме 1 мл собирали в две микропробирки, закрывали крышкой (исходная проба № 1).

Через 1 неделю после устранения причинных ортопедических конструкций снова забирали РЖ у пациента в объеме 1 мл в микропробирки и закрывали крышкой (проба № 2).

Образцы РЖ (1-1,5 мл) центрифугировали при 7000 об/мин в течение 20 минут.

Далее шприцем (5 мл) забирали надосадочную часть РЖ и фильтровали в стерильную пробирку через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Все пробы РЖ после их забора хранили в жидком азоте при -90°C .

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

Результаты

Определение триптазы тучных клеток в ротовой жидкости

До снятия причинных ортопедических конструкций ТТК в РЖ была обнаружена у 16 (84,2%) из 19 пациентов 1 группы (медиана — 4,76 нг/мл, диапазон 2,57–7,32, среднее $4,64 \pm 3,11$ нг/мл), а через неделю после снятия ортопедических конструкций ТТК в РЖ была обнаружена лишь

у 2 (10,5%) пациентов в более низкой концентрации ($p \leq 0,001$) (табл. 1).

Лишь у 3 (16,6%) пациентов 2 группы ТТК была обнаружена до снятия причинных ортопедических конструкций, а через неделю после снятия — у 1 (5,5%) пациентов. Однако результаты выявления ТТК у пациентов 2 группы достоверно не отличались от пациентов 3 группы (контрольной).

Определение IgE-антител

Положительные результаты, т.е. наличие IgE-антител к Ni-HSA, в 1 группе пациентов выявлены у 15 (78,9%) пациентов в ИФА, а также у 4 (22,2%) пациентов 2 группы. При обследовании сывороток крови пациентов контрольной группы IgE-антитела к Ni-HSA были выявлены у 1 (6,3%) пациента (табл. 2).

IgE-антитела к Cr-HSA в 1 группе пациентов обнаружены у 13 (68,4%) пациентов; во 2 группе пациентов — у 2 (11,1%) пациентов. У пациентов контрольной группы обнаружены IgE-антитела к Cr-HSA методом ИФА у 1 (6,3%) пациента.

Методом ИФА IgE-антитела к Co-HSA в 1 группе пациентов выявлены у 10 (52,6%) пациентов, а также у 3 (16,7%) пациентов 2 группы. В контрольной группе пациентов IgE-антитела к Co-HSA выявлены не были.

Как видно из приведенных данных (табл. 2), IgE-антитела к металлам в сыворотке крови у пациентов 1 группы встречались чаще, чем у пациентов других групп.

Результаты выявления IgE-антител у пациентов 1 группы с симптомами НСМ, возникшими сразу после протезирования, указывает на IgE-зависимую клиническую форму повышенной чувствительности к комплексу металл—белок.

Непрямая реакция дегрануляции тучных клеток (нРДТК)

У пациентов 1 группы положительные результаты к раствору соли NiCl_2 по нРДТК выявлены у 12 (63,15%), а у пациентов 2 группы нРДТК была положительна у 3 (16,7%) пациентов; к раствору соли CrCl_3 нРДТК была положительна у 17 (85%) пациентов 1 группы и у 4 (22,2%) пациентов 2 группы; к раствору соли CoCl_2 нРДТК была положительна у 14 (73,7%) пациентов 1 группы и у 3 (16,7%) пациентов 2 группы (табл. 3).

В контрольной группе пациентов к раствору соли NiCl_2 и CoCl_2 по нРДТК выявлено по 1 (6,3%) положительному результату, а к раствору соли CoCl_2 по нРДТК сенсibilизация отмечена у 2 (12,5%) пациентов.

Корреляционный анализ между уровнем ТТК в РЖ до снятия ортопедических конструкций и результатами выявления гиперчувствительности к металлам у пациентов 1 группы выявил следующие зависимости: прямую сильную взаимосвязь с результатами ИФА и прямую умеренную корреляцию с нРДТК (табл. 4).

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЕЙ ТРИПТАЗЫ В РЖ У ПАЦИЕНТОВ КОНЦЕНТРАЦИЯ ТТК ДО И ЧЕРЕЗ 1 МЕСЯЦ ПОСЛЕ СНЯТИЯ ОРТОПЕДИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ, нг/мл

TABLE 1. COMPARISON OF SALIVARY TRYPTASE LEVELS IN PATIENTS. MCT LEVELS BEFORE AND 1 MONTH AFTER REMOVAL OF PROSTHETIC CONSTRUCTIONS, ng/ml

1 группа Group 1			2 группа Group 2			3 группа Group 3		
Пациент Patient No.	До Before	После After	Пациент Patient No.	До Before	После After	Пациент Patient No.	До Before	После After
1	0	0	1	0	0	1	0	0
2	8,91	1,45	2	2,34	0	2		0
3	1,42	0	3	0	0	3	0	0
4	5,65	0	4	0	0	4	0	0
5	2,57	0	5	0	0	5	0	0
6	3,16	0	6	0	0	6	0	0
7	7,32	0	7	0	0	7		
8	0	0	8	0	0	8	0	0
9	6,43	0	9	0	0	9	0	0
10	5,52	0	10	0	0	10	1,5	0
11	2,85	0	11	0	0	11	0	0
12	8,12	2,61	12	3,47	1,41	12	0	0
13	4,33	0	13	0	0	13	0	0
14	10,58	0	14	0	0	14	0	0
15	3,18	0	15	0	0	15	0	0
16	5,92	0	16	1,45	0	16	0	0
17	0	0	17	0	0	—	—	—
18	7,47	0	18	0	0	—	—	—
19	4,76	0	—	—	—	—	—	

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА НАЛИЧИЯ IgE-АНТИТЕЛ К МЕТАЛЛАМ У ПАЦИЕНТОВ

TABLE 2. FREQUENCY OF METAL-INDUCED IgE DETECTION IN PATIENTS

Группы пациентов Patient groups	Ni-HSA n (%)	Cr-HSA n (%)	Co-HSA n (%)
1 группа Group 1 (n = 19)	15 (78,9%)*	13 (68,4%)*	10 (52,6%)*
2 группа Group 2 (n = 18)	4 (22,2%)*	2 (11,1%)	3 (16,7%)*
3 группа Group 3 (n = 16)	1 (6,3%)	1 (6,3%)	0

Примечание. * – отличие между группами с $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; + – отличие между 1 группой с $p < 0,05$ по сравнению со 2 группой.

Note. *, difference between groups with $p < 0.05$ compared to the control group; +, difference between group 1 with $p < 0.05$ compared to group 2.

У пациентов 2 и 3 групп корреляция ТТК в РЖ с нРДТК и ИФА не была установлена.

Обсуждение

Результаты определения уровня ТТК в РЖ у пациентов 1 группы указывают на наличие выброса ТТК под воздействием причинных ор-

топедических конструкций. Повышение концентрации ТТК в РЖ пациентов 1 группы было ассоциировано с возникновением симптомов НСМ, в виде аллергических реакций, сразу после протезирования.

Рост уровня ТТК в РЖ был выявлен в подавляющем большинстве проб (84,2%) пациентов 1 группы, что соотносилось с симптомами в поло-

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВО ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ нРДТК У ПАЦИЕНТОВ

TABLE 3. NUMBER OF POSITIVE iMCDA RESULTS IN PATIENTS

Группы пациентов Patient groups	NiCl ₂ n(%)	CrCl ₃ n (%)	CoCl ₂ n (%)
1 группа Group 1 (n = 19)	12 (63,2%) *+	10 (52,6%)*+	14 (73,7%)*+
2 группа Group 2 (n = 18)	3 (16,7%)	4 (22,2%)	3 (16,7%)
3 группа Group 3 (n = 16)	1 (6,3%)	2 (12,5%)	1 (6,3%)

Примечание. * – отличие между группами с $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; + – отличие между 1 группой с $p < 0,05$ по сравнению со 2 группой.

Note. *, difference between groups with $p < 0.05$ compared to the control group; +, difference between group 1 with $p < 0.05$ compared to group 2.

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ МЕЖДУ УРОВНЕМ ТТК В РЖ ДО СНЯТИЯ ОРТОПЕДИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ И РЕЗУЛЬТАТАМИ ВЫЯВЛЕНИЯ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К МЕТАЛЛАМ У ПАЦИЕНТОВ 1 ГРУППЫ

TABLE 4. CORRELATION QUOTIENTS BETWEEN THE SALIVARY MCT LEVELS BEFORE REMOVAL OF PROSTHETIC CONSTRUCTS AND RESULTS OF HYPERSENSITIVITY DETECTIONS TO METALS IN GROUP 1 PATIENTS

Ионы металлов Metal ions	ИФА (R _{Spearman}) ELISA (R _{Spearman})	нРДТК (R _{Spearman}) iMCDA (R _{Spearman})
Ni ²⁺	0,9*	0,61
Cr ³⁺	0,83*	0,45
Co ²⁺	0,71	0,59

Примечание. * – $p < 0,05$.

Note. *, $p < 0.05$.

сти рта после контакта с ортопедическими конструкциями и временем их возникновения. Отсутствие ТТК в РЖ как у 3 пациентов 1 группы, до снятия причинных ортопедических конструкций, так и во 2 группе можно объяснить другими механизмами аллергии или наличием неспецифической гиперчувствительности [18].

Отсутствие ТТК в РЖ не может исключить аллергию на КСМ. С другой стороны, выявление ТТК в РЖ в комбинации с клиническими симптомами должно, по сравнению только лишь с наличием или отсутствием клинических симптомов, значительно упрощать постановку диагноза «аллергия или гиперчувствительность на стоматологические материалы».

Сравнительно высокий процент ТТК у пациентов 1 группы с НСМ в совокупности с выявлением IgE-антител к металлам в ИФА и нРДТК указывает на наличие у них немедленной аллергии на компонентам стоматологических материалов (КСМ).

Измерение аллергениндуцированной ТТК в РЖ может быть перспективным новым диагностическим методом для подтверждения причинности аллергенности стоматологических конструкций в развитии симптомов НСМ у пациентов.

Заключение

В группе пациентов с НСМ и возникновением симптомов НСМ на 1-е – 14-е сутки после протезирования ТТК в РЖ выявлялась у 16 (84,2%) пациентов до снятия причинных ортопедических конструкций, а через месяц после снятия ортопедических конструкций ТТК в РЖ не определялась ($p \leq 0,001$). У пациентов контрольной группы ТТК в РЖ не определялась до и после снятия ортопедических конструкций. Таким образом, ТТК в РЖ является диагностическим маркером аллергии на КСМ.

У пациентов с возникновением симптомов НСМ на 1-е – 14-е сутки после протезирования выявлены IgE-антитела к: Ni-HSA – у 78,9% пациентов, Cr-HSA – у 68,4% пациентов, Co-HSA – у 52,6% пациентов. Уровень ТТК в РЖ сильно коррелировал с уровнем IgE-антител к Ni-HSA ($R_{\text{Spearman}} = 0,9$; $p < 0,05$) и Cr-HSA – умеренно ($R_{\text{Spearman}} = 0,7$; $p < 0,05$). Полученные данные указывают на превалирование немедленного типа реакции на КСМ. Выраженное локальное повышение уровня ТТК представляет собой важный патогенетический маркер местной инициации воспалительного процесса в полости рта. Мониторинг уровня ТТК в РЖ позволяет оценить причинность ортопедических конструкций

в возникновении HCM и необходимость замены их замены.

ТТК в РЖ выявлена только у 3 (16,7%) пациентов с возникновением симптомов HCM от полугода до 5 лет ($n = 18$), и у них же IgE-антитела к металлам в сыворотке крови, что ука-

зывает на IgE-зависимый характер реакции у них. У остальных пациентов 2 группы, по-видимому, имеется иной тип аллергической реакции — замедленный, или гранулоцитопосредованный [4]. Такие реакции мы ранее наблюдали на компоненты протезных материалов [1].

Список литературы / References

1. Карпук Н.А., Карпук И.Ю. Диагностика аллергии на металлические изделия в реакции аллерген-индуцированного повреждения лейкоцитов // Медицинские новости, 2012. № 6. С. 75-76. [Karpuk N.A., Karpuk I.Yu. Diagnosis of allergy to metal products in the reaction of allergenic-induced leukocyte damage. *Meditsinskie novosti = Medical News*, 2012, no. 6, pp. 75-76. (In Russ.)]
2. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология: руководство. М.: Медицинская литература, 2009. 464 с. [Novikov D.K., Novikov P.D. Clinical immunopathology: a guide]. Moscow: Medical Literature, 2009. 464 p.
3. Новиков Д.К., Сергеев Ю.В., Новиков П.Д. Лекарственная аллергия. М.: Национальная академия микологии, 2001. 313 с. [Novikov D.K., Sergeev Yu.V., Novikov P.D. Medicinal allergy]. Moscow: National Academy of Mycology, 2001. 313 p. (In Russ.)]
4. Новиков П.Д., Новиков Д.К., Титова Н.Д. Диагностика аллергии и гиперчувствительности: ведущее значение клеточных методов // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2016. № 4. С. 25-39. [Novikov P.D., Novikov D.K., Titova N.D. Diagnosis of allergy and hypersensitivity: the leading importance of cellular methods. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2016, no. 4, pp. 25-39. (In Russ.)]
5. Blank U. The mechanisms of exocytosis in mast cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2011, Vol. 716, pp. 107-122.
6. Chen S., Mu D., Cui M., Ren C., Zhang S., Guo L., Gao W. Dynamic changes and clinical significance of serum tryptase levels in STEMI patients treated with primary PCI. *Biomarkers*, 2014, Vol. 19, no. 7, pp. 620-624.
7. Jogie-Brahim S., Min H.K., Fukuoka Y., Xia H.Z., Schwartz L.B. Expression of alpha-tryptase and beta-tryptase by human basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004, Vol. 113, no. 6, pp. 1086-1092.
8. Kumar V., Sharma A. Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Mol. Immunol.*, 2010, Vol. 48, no. 1-3, pp. 14-25.
9. Lorentz A., Baumann A., Vitte J., Blank U. The SNARE machinery in mast cell secretion. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, p. 143.
10. Lundquist A., Pejler G. Biological implications of preformed mast cell mediators. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, no. 6, pp. 965-975.
11. Niedozytko M., Chelmińska M., Chelmiński K., Knopińska-Posłuszny W., Gruchała-Niedozytko M., Jassem E. Late-phase allergic reaction in nasal provocation with fungal allergens. *Allergy Asthma Proc.*, 2008, Vol. 29, no. 1, pp. 35-39.
12. Ruëff F., Friedl T., Arnold A., Kramer M., Przybilla B. Release of mast cell tryptase into saliva: a tool to diagnose food allergy by a mucosal challenge test? *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2011, Vol. 155, no. 3, pp. 282-288.
13. Sargur R., Cowley D., Murng S., Wild G., Green K., Shrimpton A., Egner W. Raised tryptase without anaphylaxis or mastocytosis: heterophilic antibody interference in the serum tryptase assay. *Clin. Exp. Immunol.*, 2011, Vol. 163, no. 339-345.
14. Schliemann S., Seyfarth F., Hipler U.C., Elsner P. Impact of age and heterophilic interference on basal serum tryptase, a risk indication for anaphylaxis, in 1092 dermatology patients. *Acta Derm. Venereol.*, 2012, Vol. 92, no. 5, pp. 484-489.
15. St. John A.L., Abraham S.N. Innate immunity and its regulation by mast cells. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 9, pp. 4458-4463.
16. Trivedi N.N., Caughey G.G. Mast cell peptidases. Chameleons of innate immunity and host defense. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2010, Vol. 42, no. 3, pp. 257-267.
17. Valent P. Mast cell activation syndromes: definition and classification. *Allergy*, 2013, Vol. 68, no. 4, pp. 417-424.
18. Valent P., Akin C., Arock M., Brockow K., Butterfield J.H., Carter M.C., Castells M., Escribano L., Hartmann K., Lieberman P., Niedozytko B., Orfao A., Schwartz L.B., Sotlar K., Sperr W.R., Triggiani M., Valenta R., Horny H.P., Metcalfe D.D. Definitions, criteria and global classifications of mast cell disorders with special reference to mast cell activation syndromes: a consensus proposal. *Int. Arch. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 157, no. 3, pp. 215-225.
19. Vitte J. Human mast cell tryptase in biology and medicine. *Mol. Immunol.*, 2015, Vol. 63, no. 1, pp. 18-24.
20. Voehringer D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, pp. 362-375.

Автор:

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

Author:

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

Поступила 04.05.2017

Отправлена на доработку 21.06.2017

Принята к печати 13.07.2017

Received 04.05.2017

Revision received 21.06.2017

Accepted 13.07.2017

ДЕЙСТВИЕ ПРОЛИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА НА АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ

Жаркова М.С.¹, Копейкин П.М.¹, Афиногенов Г.Е.², Орлов Д.С.^{1,2},
Артамонов А.Ю.¹, Сафиуллина К.Э.¹, Сухарева М.С.¹,
Цветкова Е.В.^{1,2}, Мильман Б.Л.¹, Афиногенова А.Г.^{2,3}, Шамова О.В.^{1,2}

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

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Резистентность патогенных микроорганизмов к применяемым в медицине антибиотикам в последние годы стремительно растет, повышается смертность от внутрибольничных инфекций. Поэтому поиск новых лекарственных средств для борьбы с антибиотикоустойчивыми бактериями является одной из первоочередных задач биомедицины. Есть все основания считать, что природные соединения, содержащиеся в защитных клетках человека и животных, могут послужить прототипами принципиально новых антибиотических препаратов. К таким соединениям относятся антимикробные пептиды врожденного иммунитета, в частности группа пролин-богатых пептидов. Целью данной работы явилось исследование антимикробной активности пролин-богатых пептидов семейства бактенецинов в отношении ряда клинических изолятов антибиотикоустойчивых грамотрицательных бактерий. Объектами исследования послужили бактенецины, обнаруженные ранее в лейкоцитах домашней козы *Capra hircus*: ChBac3.4, ChBac5, miniChBac7.5N α , miniChBac7.5N β . Установлено, что химически синтезированные нами аналоги этих пептидов проявляют выраженную антимикробную активность в отношении *Escherichia coli* и *Acinetobacter baumannii* (минимальные ингибирующие концентрации (МИК), определенные методом серийных разведений в жидкой питательной среде, находились в пределах 1–4 мкМ) и в несколько меньшей степени в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae* (МИК – 2–16 мкМ) *in vitro*. Показано, что антибактериальная активность пептидов может повышаться при их совместном использовании с антибиотиками, применяемыми в медицине. Выявлен синергический эффект при действии бактенецина mini-ChBac7.5N α в комбинации с амикацином на *E. coli* (минимальный индекс фракционной ингибирующей концентрации (иФИК) – 0,375), *A. baumannii* (иФИК 0,5) и *K. pneumoniae* (иФИК – 0,325), а также с офлоксацином – на *K. pneumoniae* (иФИК – 0,5). Важной характеристикой исследуемых пептидов является отсутствие у этих соединений гемолитической активности в отношении эритроцитов человека при применении их в концентрациях, в несколько раз превышающих антимикробные. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего исследования рассматриваемых пролин-богатых пептидов и их структурных модификаций для разработки на основе этих соединений новых комбинированных

Адрес для переписки:

Шамова Ольга Валерьевна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 12
Тел.: 8 (911) 253-09-29.
E-mail: oshamova@yandex.ru

Address for correspondence:

Shamova Olga V.,
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12
Phone: 7 (911) 253-09-29.
E-mail: oshamova@yandex.ru

Образец цитирования:

М.С. Жаркова, П.М. Копейкин, Г.Е. Афиногенов,
Д.С. Орлов, А.Ю. Артамонов, К.Э. Сафиуллина,
М.С. Сухарева, Е.В. Цветкова, Б.Л. Мильман,
А.Г. Афиногенова, О.В. Шамова «Действие пролин-
богатых пептидов врожденного иммунитета
на антибиотикоустойчивые штаммы бактерий»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 107–114.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-107-114
© Жаркова М.С. и соавт., 2018

For citation:

M.S. Zharkova, P.M. Kopeykin, G.E. Afinogenov, D.S. Orlov,
A.Yu. Artamonov, K.E. Safiullina, M.S. Sukhareva,
E.V. Tsvetkova, B.L. Milman, A.G. Afinogenova, O.V.
Shamova “Effects of proline-rich peptides of the innate
immune system on drug-resistant bacterial strains”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,
Vol. 20, no. 1, pp. 107–114.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-107-114
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-107-114

лекарственных средств для борьбы с антибиотикоустойчивыми микроорганизмами: различных препаратов местного применения, компонентов изделий медицинского назначения, в частности венозных катетеров, стентов, а также раневых покрытий.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, антибиотикорезистентные бактерии, пролин-богатые пептиды, бактенецины

EFFECTS OF PROLINE-RICH PEPTIDES OF THE INNATE IMMUNE SYSTEM ON DRUG-RESISTANT BACTERIAL STRAINS

Zharkova M.S.^a, Kopeykin P.M.^a, Afinogenov G.E.^b, Orlov D.S.^{a, b},
Artamonov A.Yu.^a, Safiullina K.E.^a, Sukhareva M.S.^a, Tsvetkova E.V.^{a, b},
Milman B.L.^a, Afinogenova A.G.^{b, c}, Shamova O.V.^{a, b}

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

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Resistance of pathogenic microorganisms to conventional antibiotics is growing rapidly in recent years, accompanying with an increase of mortality caused by hospital-acquired infections. Therefore, a search for novel drugs to combat antibiotic resistant bacteria is one of the priorities in biomedicine. Natural compounds which are contained in host defense effector cells of humans and animals, may serve as prototypes for developing principally new antibiotics. Such compounds include antimicrobial peptides of innate immunity, in particular, a group of proline-rich peptides. The aim of this work was to evaluate antimicrobial activity of proline-rich peptides, belonging to batenecins family, against several clinical isolates of drug-resistant Gram-negative bacteria. The batenecins under examination (ChBac3.4, ChBac5, mini-ChBac7.5N α , mini-ChBac7.5N β) have been previously found in leukocytes of a domestic goat *Capra hircus*. We have shown that chemically synthesized analogs of these peptides exhibited a pronounced *in vitro* antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii* (minimum inhibitory concentrations (MIC) as estimated by a broth microdilution assay varied between 1 to 4 μ M) and, to a lesser degree, against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* (MIC 2-16 μ M). It was revealed that antibacterial activity of these peptides may be increased if applied in combination with some conventional, antibiotics. E.g., synergistic antimicrobial effects against *E. coli* have been shown for mini-ChBac7.5N α batenecin combined with amikacin (minimal fractional inhibitory concentration index (FICI), 0.375), *A. baumannii* (FICI, 0.5), and *K. pneumoniae* (FICI, 0.325), and, using ofloxacin, towards *K. pneumoniae* (FICI 0.5). Lack of hemolytic activity towards human red blood cells is an important benefit of the studied peptides when used at concentrations several times higher than those showing antimicrobial effects. The data obtained presume certain prospects for further investigations of proline-rich peptides, as well as their structural modifications, for the development of new combined drugs based on these compounds, in order to combat antibiotic-resistant microorganisms, e.g., medications for local applications, various components of medical devices, in particular, venous catheters, stents and wound dressings.

Keywords: innate immunity, drug-resistant bacteria, proline-rich peptides, batenecins

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-02177.

Проблема устойчивости микроорганизмов к применяемым в медицине антибиотическим препаратам все более остро встает в последние годы. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) опубликован список «приоритетных патогенов» — 12 видов бактерий, устойчивых к действию антибиотиков и представляющих наибольшую угрозу для жизни и здоровья человека. Особое внимание в сообщении ВОЗ уделяется мульти-

резистентным грамотрицательным бактериям. К числу наиболее опасных представителей таких бактерий, отнесенных к 1 категории приоритетности, принадлежат *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и различные виды семейства Enterobacteriaceae (включая *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* и *Proteus*), устойчивые к карбопенемам и другим антибиотикам и вызывающие тяжелые, часто неизлечимые, госпитальные инфекции. Данный список приоритетных возбудителей был составлен ВОЗ, чтобы предоставить ориентиры первоочередных

разработок для научно-исследовательских организаций. Наша работа посвящена исследованиям в этом направлении, что и определяет ее актуальность. Среди возможных кандидатов на роль новых антибиотических препаратов — природные антимикробные пептиды (АМП) врожденного иммунитета. Эти пептиды содержатся в клетках организма, выполняющих защитную функцию, — в первую очередь, в фагоцитах, клетках барьерных эпителиев, а также, в меньших количествах, и во многих других типах клеток. Кроме прямого антимикробного действия многие АМП проявляют иммуномодулирующие эффекты, что тоже способствует ограничению микробной инвазии [1, 9]. Некоторые пептиды обладают и ранозаживляющим действием [2, 7]. АМП имеют разные структуры — в эту группу объединяются как пептиды, содержащие дисульфидные мостики и имеющие в составе молекулы β -слои, в том числе АМП с конформацией β -шпильки, так и линейные молекулы. К одной из обширных групп линейных пептидов относятся пролин-богатые АМП (ПБ-АМП). В составе молекулы ПБ-АМП присутствует большое количество остатков пролина (до 50%) и аргинина, что и определяет их физико-химические и биологические свойства. Подобные пептиды обнаружены у беспозвоночных, причем наиболее часто встречаются у насекомых [12], а также позвоночных — в основном выявлены в лейкоцитах животных отряда парнокопытных [13]. Известно, что многие ПБ-АМП проявляют высокую антимикробную активность в отношении грамотрицательных бактерий, в том числе и антибиотикоустойчивых, что позволяет рассматривать их в качестве прототипов новых лекарственных средств, эффективных в борьбе с патогенными микроорганизмами, резистентными к применяемым в клинике антибиотикам. В Санкт-Петербургском университете уже разработано несколько иммуномодулирующих и антимикробных препаратов на основе ПБ-АМП насекомых [3]. В Европе также создается антибактериальный препарат на базе одного из пептидов насекомых — АЗ-АРО [11]. Необходимость дальнейшего интенсивного изучения ПБ-АМП и разработки подобных препаратов в нашей стране не вызывает сомнений.

Целью данной работы явилось исследование антимикробной активности пролин-богатых пептидов семейства бактенецинов (ChBac3.4, ChBac5, miniChBac7.5N α , miniChBac7.5N β) в отношении антибиотикоустойчивых грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*). Перечисленные пептиды, относящиеся к ПБ-АМП млекопитающих, были выделены нами ранее из лейкоцитов домашней

козы *Capra hircus* и охарактеризованы [4, 14, 15]. Для сравнения использовали антимикробный пептид, имеющий другую структуру (конформацию бета-шпильки) — протегрин 1 (ПГ1) [8]. Учитывая, что, по данным ВОЗ, указанные выше грамотрицательные бактерии относятся к списку наиболее опасных патогенов, исследования, посвященные поиску новых антимикробных лекарственных средств, эффективных в борьбе с этими микроорганизмами, являются актуальными и перспективными.

Материалы и методы

Антимикробные пептиды получены методом химического твердофазного синтеза с использованием Fmoc/tBu-стратегии на 2-хлортритил-хлоридной смоле. Нарастивание пептидной последовательности проводилось в автоматическом синтезаторе Symphony X (Protein Technologies Inc., США). Для временной защиты α -аминогрупп аминокислот применялась Fmoc-защита. Активация проводилась *in situ* под действием HCTU/N-этилморфолин в среде диметилформамида. Аминокислотная последовательность отщеплялась с полимера с одновременным удалением всех защитных групп под действием трифторуксусной кислоты с добавками H₂O/Tis (триизопропилсилан). Пептиды очищали с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на установке Gold System (Beckman, США) и высушивали. Чистота полученных пептидов была не менее 95%, что подтверждалось с помощью аналитического электрофореза, ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрического анализа (MALDI-ToF MS) на приборе Ultraflextreme фирмы Bruker (Германия).

Бактерии

Использовали клинические изоляты грамотрицательных микроорганизмов: *Escherichia coli* 521/17 (устойчивость к ампициллину, амоксициллину/клавулоновой кислоте, цефотаксиму, цефтазидиму, цефелиму, азтреонаму, нетилимицину, ципрофлоксацину, триметоприму/сульфаметоксазолу), *Pseudomonas aeruginosa* 522/17 (устойчивость к меропенему, цефтазидиму, цефелиму, амикацину, гентамицину, нетилимицину, ципрофлоксацину, колистину), *Klebsiella pneumoniae* 344/17 (устойчивость к ампициллину), *Acinetobacter baumannii* 7226/16 (устойчивость к имипенему, гентамицину, тобрамицину, ципрофлоксацину, триметоприму/сульфаметоксазолу). Клинический изолят *E. coli* был получен из мочи пациента, остальные — из инфицированных ран.

Оценку антимикробной активности проводили методом серийных разведений в жидкой

питательной среде. Использовали стандартную методику, но с небольшими модификациями, разработанными с учетом специфики АМП [5]. В качестве жидкой питательной среды использовали бульон Мюллера–Хинтона (Oxoid, Германия). Двукратные серийные разведения исследуемых препаратов проводили в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 с 150 мМ NaCl (НФБ) и вносили в лунки стерильной микрокамеры Тerasaki, куда затем добавляли суспензии микроорганизмов, находящихся в фазе логарифмического роста (1×10^4 КОЕ на лунку). Пробы инкубировали при 37 °C в течение 24 или 48 часов. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали наименьшую концентрацию вещества, при использовании которой отсутствовал видимый рост микроорганизмов в соответствующих лунках микрокамеры. Для каждого разведения образца или контрольных проб результаты исследований представлены как медианы, полученные по данным трех независимых экспериментов.

Характер совместного действия пептидов и антибиотиков (наличие аддитивных, синергических, антагонистических эффектов) исследовали с использованием метода «шахматной доски» (“checkerboard assay”) [5]. При изучении совместного действия веществ А и В двукратные разведения одного из исследуемых соединений (вещество А) производили в камере Тerasaki по горизонтали, а другого (вещество В) – по вертикали. После инкубации проб с микроорганизмами в течение 24 или 48 часов определяли МИК каждого из исследуемых веществ и МИК для их комбинаций. Далее рассчитывали индексы фракционной ингибирующей концентрации (иФИК; FICI – fractional inhibitory concentration index) по формуле:

ФИК индекс = ФИК А + ФИК В = $[A]/[МИК\ A] + [B]/[МИК\ B]$,

где [А] и [В] – МИК веществ А и В, соответственно, в их смеси (комбинации), при которых наблюдается ингибирование роста бактерии; [МИК А] и [МИК В] – МИК индивидуальных фракций веществ А и В соответственно. При иФИК ≤ 0.5 совместное действие соединений рассматривали как синергическое (препараты усиливают антимикробный эффект друг друга); $0.5 < \text{иФИК} \leq 1$ – как аддитивное (антимикробный эффект препаратов аддитивно складывается); $1 < \text{иФИК} \leq 2$ – как индифферентное или независимое (эффект одного вещества никак не зависит от присутствия другого); иФИК > 2 – как антагонистическое (эффект веществ в комбинации снижается).

Для определения гемолитической активности пептидов использовали эритроциты человека. Кровь здорового донора собирали в пластиковые

гепаринизированные пробирки, центрифугировали в течение 10 мин при 250 g при 4 °C. Супернатант удаляли, к осадку добавляли 10 мл охлажденного забуференного физиологического раствора (ЗФР), pH 7,4 с 4 мМ ЭДТА, центрифугировали в течение 10 мин в тех же условиях. Надосадочную жидкость удаляли, процедуру отмывания эритроцитов ЗФР повторяли три раза. Из полученного осадка эритроцитов отбирали 280 мкл, доводили объем суспензии до 10 мл охлажденным ЗФР. Анализируемые пептиды по 3 мкл на пробу в ЗФР вносили в пластиковые пробирки объемом 0,5 мл, добавляли по 27 мкл суспензии эритроцитов и инкубировали 30 мин при периодическом перемешивании. Для получения положительного контроля (100% лизис эритроцитов) к 27 мкл раствора эритроцитов добавляли 3 мкл детергента (10% раствор Triton X-100 в ЗФР). Для получения негативного контроля (0% лизис эритроцитов) к 27 мкл раствора эритроцитов добавляли 3 мкл ЗФР. После инкубации реакцию останавливали добавлением 75 мкл охлажденного ЗФБ, пробы центрифугировали при 5000 g при 4 °C в течение 4 мин. Супернатант отбирали и проводили измерение оптической плотности проб при длине волны 540 нм на фотометре Multiscan (Labsystems, Финляндия). Процент гемолиза эритроцитов рассчитывали по формуле:

Гемолиз (%) = $[\text{OD}_{540}(\text{образца}) - \text{OD}_{540}(0\% \text{ лизис})] / [\text{OD}_{540}(100\% \text{ лизис}) - \text{OD}_{540}(0\% \text{ лизис})] \times 100\%$.

Эксперименты повторяли три раза, для каждой из опытных или контрольных проб имелось по три повторности. Результаты представлены как средние величины и среднеквадратичные отклонения.

Результаты и обсуждение

Исследована активность антимикробных пептидов (АМП) в отношении четырех видов грамотрицательных бактерий, относящихся к группам патогенов, приведенных в списке ВОЗ как одни из самых опасных для человечества видов, являющихся причиной внутрибольничных инфекций. Используемые в работе микроорганизмы проявляли резистентность к ряду применяемых в медицине антибиотиков. Данные, полученные методом серийных разведений в жидкой питательной среде, представлены в таблице 1.

Установлено, что антимикробные пептиды, относящиеся к классу пролин-богатых пептидов млекопитающих, а именно бактенецины лейкоцитов домашней козы, проявляют выраженную активность в отношении *E. coli* и *A. baumannii* и, хотя и в меньшей степени, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. Пептид протегрин 1, имеющий структуру бета-шпильки и, как показано ранее,

ТАБЛИЦА 1. МИНИМАЛЬНЫЕ ИНГИБИРУЮЩИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ (МИК) БАКТЕНЕЦИНОВ И ПРОТЕГРИНА 1, мкМ*

TABLE 1. MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATIONS (MIC) OF BACTENECINS AND PROTEGRIN 1, μM *

Вещество Substance	МИК (мкМ) в отношении бактерий MIC (μM) towards bacteria				Гемолиз эритроцитов человека, % при обработке их пептидами в указанных концентрациях Hemolysis of human red blood cells (%) in the presence of the peptides at the indicated concentrations	
	<i>Escherichia coli</i> 521/17	<i>Acinetobacter baumannii</i> 7226/16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 522/17	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 344/17	10 мкМ 10 μM	60 мкМ 60 μM
ChBac3.4	2	1	4	2	0,6 $\pm$ 0,46	1,2 $\pm$ 0,74
ChBac5	1	2	16	4	0,7 $\pm$ 0,45	1,2 $\pm$ 0,56
miniChBac7.5N α	2	2	8	16	0,2 $\pm$ 0,09	0,3 $\pm$ 0,21
miniChBac7.5N β	2	2	8	16	1,5 $\pm$ 0,09	0,3 $\pm$ 0,1
ПГ1 PG1	1	1	2	1	35,6 $\pm$ 5,4	83,4 $\pm$ 3,7
амикацин amikacin	2	8	1	0,25	—	—
офлоксацин ofloxacin	50	25	> 50	0,25	—	—

Примечание. * – данные МИК представлены как медианы, полученные по результатам 3-5 независимых экспериментов (метод серийных разведений в жидкой питательной среде). Приводятся также МИК двух антибиотиков, определенные в тех же условиях. Результаты оценки гемолитической активности указаны как средние величины и среднеквадратичные отклонения.

Note. *, all the MIC values are presented as medians derived from 3 to 5 independent experiments (broth microdilutions assays). MIC values for two antibiotics evaluated at similar conditions are also given. The data on hemolytic activity are shown as means $\pm$ standard deviations.

обладающий высокой мембранолитической активностью, проявлял значительное антибактериальное действие в отношении всех исследованных микроорганизмов. Однако его гемолитическая активность в отношении эритроцитов человека была существенно выше по сравнению с эффектами бактенецинов, которые не вызывали лизиса эритроцитов в концентрациях, значительно превышающих антимикробные (табл. 1), что свидетельствует о более высокой цитотоксичности этих соединений по отношению к прокариотическим клеткам по сравнению с клетками макроорганизма. В работах итальянских исследователей показано, что синтетические пептиды, являющиеся фрагментами бактенецина быка Vac7 (сходные по первичной структуре с мини-бактенецинами козы), тоже проявляют антимикробную активность в отношении антибиотикоустойчивых клинических изолятов [6]. Эффективность бактенецинов, вероятно, определяется тем, что эти пептиды имеют несколько молекулярных

мишеней в бактериальных клетках [10, 13]. Однако значения активности АМП могут показаться несколько более низкими по сравнению с активностью применяемых в медицине антибиотиков. Чтобы выяснить возможность повышения активности пептидов, нами исследовано их совместное действие с двумя антимикробными препаратами – амикацином и офлоксацином – для установления наличия или отсутствия синергидного эффекта. Данные анализа антибактериального действия одного из мини-бактенецинов – mini-ChBac7.5N α с перечисленными антибиотиками в отношении исследуемых клинических изолятов представлены в таблице 2.

Показано, что для трех из четырех исследованных видов бактерий наблюдается синергическое антимикробное действие мини-бактенецина с амикацином (ФИК $\leq$ 0,5), причем оно установлено и в случае *A. baumannii*, проявляющего устойчивость к ряду аминогликозидов. В комби-

ТАБЛИЦА 2. СОЧЕТАННОЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ МИНИ-БАКТЕНЕЦИНА miniChBac7.5N α С АНТИБИОТИКАМИ, ОЦЕНИВАЕМОЕ ПО ВЕЛИЧИНЕ ИНДЕКСА ФРАКЦИОННЫХ ИНГИБИРУЮЩИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ (ФИК), РАССЧИТАННОГО ДЛЯ ПРИВЕДЕННЫХ КОМБИНАЦИЙ

TABLE 2. COMBINED ACTION OF MINI-BACTENECIN miniChBac7.5N α WITH ANTIBIOTICS, ESTIMATED USING FRACTIONAL INHIBITORY CONCENTRATION INDEXES (FICI), CALCULATED FOR EACH COMBINATION

Сочетание веществ Substances combined	Минимальный индекс ФИК Minimal FICI			
	<i>E. coli</i> 521/17	<i>A. baumannii</i> 7226/16	<i>P. aeruginosa</i> 522/17	<i>K. pneumoniae</i> 344/17
miniChBac7.5N α и амикацин miniChBac7.5N α and Amikacin	0,375	0,5	0,62	0,325
miniChBac7.5N α и офлоксацин miniChBac7.5N α and Ofloxacin	1,12	0,62	–	0,5

нации с офлоксацином выявлен синергический эффект в отношении *K. pneumoniae*.

Заключение

Установлено, что пролин-богатые пептиды – синтетические аналоги бактенецинов лейкоцитов домашней козы – проявляют антимикробное действие в отношении исследованных антибиотикоустойчивых грамотрицательных бактерий, причем в ряде случаев наблюдали синергические антибактериальные эффекты при использовании пептидов с амикацином и офлоксацином. Изучаемые пептиды – бактенецины – не обладают гемолитическим действием в отношении эритроцитов человека. Полученные данные сви-

детельствуют о перспективности дальнейшего исследования рассматриваемых пролин-богатых пептидов и их структурных модификаций для разработки на их основе новых лекарственных препаратов для борьбы с микроорганизмами, представляющими серьезную опасность для пациентов. Использование пептидных препаратов в комбинации с применяемыми в клинике антибиотиками позволит повысить эффективность антимикробной терапии при местном применении, а также при создании изделий медицинского назначения, например, устройств, входящих в состав аппаратов для искусственной вентиляции легких, венозных катетеров и раневых покрытий.

Список литературы / References

1. Жаркова М.С., Орлов Д.С., Коряков В.Н., Шамова О.В. Антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения // Вестник СПбГУ. Сер. 3, 2014. Вып. 1. С. 98-114. [Zharkova M.S., Orlov D.S., Kokryakov V.N., Shamova O.V. Mammalian antimicrobial peptides: classification, biological role, perspectives of practical use. *Vestnik SPbGU. = Bulletin of St. Petersburg State University. Biology*, 2014, Iss. 1, pp. 98-114. (In Russ.)]
2. Кудряшов Б.А., Ляпина Л.А., Мазинг Ю.А., Кокряков В.Н., Кондашевская М.В., Шамова О.В. Действие дефенсина на процесс заживления асептической кожной раны и на проницаемость кровеносных сосудов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1990. Т. 59, № 4. С. 391-393. [Kudriashov B.A., Kondashevskaya M.V., Liapina L.A., Kokriakov V.N., Mazing Yu.A., Shamova O.V. Effect of defensin on the process of healing of aseptic skin wound and on the permeability of blood vessels. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1990, Vol. 59, Iss. 4, pp. 391-393. (In Russ.)]
3. Черныш С.И., Гордя Н.А. Антимикробное вещество // Патент РФ 2447896. Заявка: 2010146289/15, 15.11.2010. Опубликовано: 20.04.2012. Бюл. № 11. 27 с. [Chernysh S.I., Gordya N.A. Antimicrobial substance. Patent of the Russian Federation 2447896. Application: 2010146289/15, 15.11.2010]. Published: 20.04.2012. Bulletin No. 11. 27 p.
4. Шамова О.В., Орлов Д.С., Жаркова М.С., Баландин С.В., Ямщикова Е.В., Кнаппе Д., Хоффманн Р., Кокряков В.Н., Овчинникова Т.В. Минибактенецины ChBac7.5N-альфа и ChBac7.5N-бета – антимикробные пептиды из лейкоцитов козы *Capra hircus* // Acta Naturae, 2016. Т. 8, № 3 (30). С. 108-118. [Shamova O.V., Orlov D.S., Zharkova M.S., Balandin S.V., Yamschikova E.V., Knappe D., Hoffmann R., Kokryakov V.N., Ovchinnikova T.V. Minibactenecins ChBac7.N α and ChBac7.N β – antimicrobial peptides from leukocytes of the goat *Capra hircus*. *Acta Naturae*, 2016, Vol. 8, no. 3 (30), pp. 136-146.
5. Antibacterial peptide protocols. in: Methods in Molecular Biology, Vol. 78, 1997. Ed. Shafer W., Totowa, N.J.: Humana Press Inc., 1997. 259 p.
6. Benincasa M., Scocchi M., Podda E., Skerlavaj B., Dolzani L., Gennaro R. Antimicrobial activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates. *Peptides*, 2004, Vol. 25, Iss. 12, pp. 2055-2061.

7. Chan Y., Gallo R. PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130(Cas). *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, pp. 28978-28985.
8. Kokryakov V.N., Harvig S.S.L., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.V., Shamova O.V., Korneva E.A., Lehrer R.I. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Letters*, 1993, Vol. 327, Iss. 2, pp. 231-236.
9. Mansour S.C., Pena O.M., Hancock R.E. Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol.*, 2014, Vol. 35, Iss. 9, pp. 443-450.
10. Mardirossian M., Grzela R., Giglione C., Meinel T., Gennaro R., Mergaert P., Scocchi M. The host antimicrobial peptide Bac7 1-35 binds to bacterial ribosomal proteins and inhibits protein synthesis. *Chem. Biol.*, 2014, Vol. 21, Iss. 12, pp. 1639-1647.
11. Ostorhazi E., Holub M.C., Rozgonyi F., Harnos F., Cassone M., Wade J.D., Otvos L.Jr. Broad-spectrum antimicrobial efficacy of peptide A3-APO in mouse models of multidrug-resistant wound and lung infections cannot be explained by in vitro activity against the pathogens involved. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2011, Vol. 3, Iss. 5, pp. 480-484.
12. Otvos L. Jr. Antibacterial peptides isolated from insects. *J. Pept. Sci.*, 2000, Vol. 6, Iss. 10, pp. 497-511.
13. Scocchi M., Tossi A., Gennaro R. Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, Iss.13, pp. 2317-2330.
14. Shamova O.V., Brogden K.A., Zhao C., Nguen T., Turner J., Kokryakov V.N., Lehrer R.I. Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infection and Immunity*, 1999, Vol. 67, no. 8, pp. 4106-4111.
15. Shamova O., Orlov D., Stegemann C., Czihal P., Hoffmann R., Brogden K., Kolodkin N., Sakuta G., Tossi A., Sahl H.-G., Kokryakov V., Lehrer R.I. ChBac3.4: A novel proline-rich antimicrobial peptide from goat leukocytes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2009, Vol. 15, Iss. 1, pp. 31-35.

Авторы:

Жаркова М.С. — к.б.н., научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Копейкин П.М. — аспирант, младший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Афиногенов Г.Е. — д.м.н., профессор, профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Орлов Д.С. — к.м.н., доцент, заведующий лабораторией ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Zharkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kopeykin P.M., Postgraduate student, Junior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Afinogenov G.E., PhD, Dr. of Sci. (Medicine), MD, Professor, Dentistry Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Orlov D.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of Laboratory, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Артамонов А.Ю. — к.б.н., научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Artamonov A.Yu., PhD (Biology), Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Сафиуллина К.Э. — студент-бакалавр, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, выполняющий работу в ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Safiullina K.E., Bachelor student at the Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Сухарева М.С. — студент-бакалавр, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, выполняющий работу в ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Sukhareva M.S., Bachelor student at the Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Цветкова Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Tsvetkova E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Мильман Б.Л. — д.х.н., заведующий лабораторией ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Milman B.L., PhD, Dr. of Sci. (Chemistry), Professor, Head of Laboratory, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Афиногенова А.Г. — д.б.н., руководитель испытательного лабораторного центра ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Afinogenova A.G., PhD, Dr. of Sci. (Biology), Head, Testing Laboratory Centre, St. Petersburg L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Professor, Dentistry Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Шамова О.В. — д.б.н., доцент, заведующий отделом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; профессор кафедры биохимии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Shamova O.V., PhD, Dr. of Sci. (Biology), Associate Professor, Head of Department, Institute of Experimental Medicine; Professor, Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 01.07.2017
Отправлена на доработку 13.07.2017
Принята к печати 18.07.2017

Received 01.07.2017
Revision received 13.07.2017
Accepted 18.07.2017

СЫВОРОТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 α , ПОЛИМОРФИЗМ ЕГО ГЕНА И РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДОМ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

**Лапштаева А.В.¹, Евсегнеева И.В.², Новиков В.В.³, Сычев И.В.¹,
Караулов А.В.^{2,3}**

¹ ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

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

³ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. В последнее время все большую актуальность приобретает поиск новых прогностических критериев, определяющих успех экстракорпорального оплодотворения. Цель работы: исследование прогностической роли IL-1 α как дополнительного маркера наступления беременности в программе экстракорпорального оплодотворения. В исследование были включены 120 женщин, проходящих лечение по поводу трубно-перитонеального бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения. В зависимости от эффективности процедуры, ретроспективно было сформировано две группы: группа I (n = 40) – с наступившей беременностью и группа II (n = 80) – с ненаступившей беременностью. Методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию IL-1 α в сыворотке; методом полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием по Сенгеру исследовали полиморфный маркер rs1800587 UTR-5 области гена IL-1 α . В результате проведенного исследования выявлена гиперпродукция IL-1 α у женщин из группы I. Также у женщин этой группы выявлена положительная корреляционная взаимосвязь между IL-1 α и лютеинизирующим гормоном, пролактином, прогестероном, 17-оксипрогестероном, дегидроэпиандростерон-сульфатом. У женщин с неудачной попыткой экстракорпорального оплодотворения выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь между IL-1 α и антимюллеровым гормоном, положительная взаимосвязь между IL-1 α и 17-оксипрогестероном. Женщины-носители аллеля T полиморфного маркера rs1800587 UTR-5 области гена IL-1 α имеют шанс в 2,5 раза выше забеременеть в результате процедуры экстракорпорального оплодотворения, чем женщины-носители аллеля C (95% CI = [1,45-4,35], p = 0,0009). У женщин-носителей генотипа T/T гена IL-1 α выявлена взаимосвязь между содержанием IL-1 α и эстрадиолом, тестостероном, носителей генотипа C/T с эстрадиолом, а носителей генотипа C/C с фолликулостимулирующим гормоном.

Адрес для переписки:

Лапштаева Анна Васильевна
ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева»
430005, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск,
ул. Большевикская, 68.
Тел.: 8 (927) 177-35-55.
E-mail: av_lapshtaeva@mail.ru

Address for correspondence:

Lapshtaeva Anna V.
National Research N.P. Ogarev Mordovia State University
430005, Russian Federation, Republic of Mordovia, Saransk,
Bolshevistskaya str., 68.
Phone: 7 (927) 177-35-55.
E-mail: av_lapshtaeva@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Лапштаева, И.В. Евсегнеева, В.В. Новиков, И.В. Сычев, А.В. Караулов «Сывороточный уровень интерлейкина-1 α , полиморфизм его гена и результативность лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения» // Медицинская иммунология, 2018, Т. 20, № 1, С. 115–122.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-115-122
© Лапштаева А.В. и соавт., 2018

For citation:

A.V. Lapshtaeva, I.V. Evsegneeva, V.V. Novikov, I.V. Sychev, A.V. Karaulov “Serum level and gene polymorphism of Interleukin-1 α , and efficiency of infertility treatment by in vitro fertilization”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 115–122.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-115-122

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-115-122

мулирующим гормоном. Выявленные изменения свидетельствуют о вовлечении IL-1 α в регуляцию циклических процессов в яичнике, в том числе и в овуляции. Кроме того, вероятно, IL-1 α участвует в создании провоспалительной микросреды, необходимой для успешной имплантации blastocyst.

Ключевые слова: IL-1 α , трубно-перитонеальное бесплодие, беременность, экстракорпоральное оплодотворение

SERUM LEVEL AND GENE POLYMORPHISM OF INTERLEUKIN-1 α , AND EFFICIENCY OF INFERTILITY TREATMENT BY *IN VITRO* FERTILIZATION

Lapshataeva A.V.^a, Evsegneeva I.V.^b, Novikov V.V.^c, Sychev I.V.^a, Karaulov A.V.^{b, c}

^a National Research N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

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

^c National Research Nizhny Novgorod N.I. Lobachevskii State University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Search for novel prognostic criteria predicting successful *in vitro* fertilization remains a nonresolved problem at the present time. The aim of our study was to analyse a predictive role of IL-1 α as an additional marker of pregnancy after *in vitro* fertilization (IVF). The study included 120 women with tubo-peritoneal infertility subjected to the IVF procedure. Retrospectively, two groups were formed of this cohort, dependent on efficiency of *in vitro* fertilization. Group I included 40 women with successful pregnancy whereas group II comprised 80 women with failed pregnancy. IL-1 α concentrations in serum were detected by ELISA technique. A polymorphic *rs1800587* marker at 5'UTR region has been amplified by PCR followed by Sanger sequencing. We have shown IL-1 α hyperproduction in the women from group I. The women with effective IVF outcome exhibited positive correlation between IL-1 α and luteinizing hormone, prolactin, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone sulfate levels. The women with ineffective *in vitro* fertilization have detected a negative correlation between IL-1 α levels and anti-Muellerian hormone, a positive correlation of IL-1 α with 17-hydroxyprogesterone. The women with T allele of the polymorphic *rs1800587* marker at 5'UTR region have shown a 2.5-fold higher chance to become pregnant after IVF than the women carrying C allele (95% CI = [1.45-4.35], $p = 0.0009$). The women with T/T genotype exhibited a positive correlation between IL-1 α and estradiol, testosterone; the subjects with heterozygous C/T genotype showed correlation with estradiol, and those harboring C/C genotype exhibited correlation with follicle-stimulating hormone. The revealed changes suggest a potential involvement of IL-1 α into regulation of cyclic processes in the ovary including ovulation. Moreover, IL-1 α may participate in formation of pro-inflammatory environment for successful blastocyst implantation.

Keywords: IL-1 α , tubo-peritoneal infertility, pregnancy, *in vitro* fertilization

Работа поддержана грантом МГУ имени Н.П. Огарева № 53/63-15 от 17.12.2015.

Введение

Охрана репродуктивного здоровья населения является важнейшей медико-социальной задачей. У 40-50% infertile женщин диагностируется трубно-перитонеальная форма бесплодия (ТПБ) [3, 5, 6]. Воспалительные заболевания придатков матки специфической и неспецифической этиологии, оперативные вмешательства на органах малого таза, осложненные аборт и роды, различные лечебно-диагностические манипуляции являются причинами развития ТПБ. Изменения в маточных трубах приводят к их полной или частичной окклюзии, возникновению

спаек, нарушению сократительной функции, что приводит к нарушению транспорта яйцеклетки в полость матки.

Одним из современных методов восстановления фертильности женщин с ТПБ является экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО). Несмотря на высокую востребованность метода, его эффективность достаточно низкая — около 30% эмбрионов, перенесенных в полости матки, успешно имплантируются [1, 4]. Вследствие высокой стоимости и достаточно низкой эффективности процедуры ЭКО, особую актуальность приобретает поиск новых надежных прогностических критериев, позволяющих до включения женщин в протокол ЭКО оценить вероятность

наступления беременности и, в случае необходимости, провести коррекцию.

В настоящее время содержание фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), антимюллерова гормона (АМГ), ингибина В в сыворотке используется для диагностики получения ооцитов хорошего качества в протоколах ЭКО [12]. Вместе с тем данные показатели не способны прогнозировать наступление беременности при проведении программы.

В этой связи в настоящее время активно проводится поиск новых критериев, определяющих успех ЭКО, в том числе и иммунологических.

Целью работы явилось изучение сывороточной концентрации интерлейкина-1α (IL-1α) и полиморфизма его гена для использования их в качестве прогностических маркеров диагностики наступления беременности в протоколе ЭКО.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 120 женщин, проходящих процедуру ЭКО по поводу бесплодия трубно-перитонеального генеза, клинические обследования которых были проведены в ГБУЗ РМ «Мордовский республиканский клинический перинатальный центр». Все пациентки были включены в исследование после подписания добровольного информированного согласия на участие в исследовании и использовании их биопроб. Критерии включения пациенток в исследование: 1) возраст 18-39 лет; 2) трубно-перитонеальное бесплодие; 3) нормальный овариальный резерв; 4) отсутствие противопоказаний к ЭКО; 5) фертильная сперма партнера; 6) нормальный кариотип обоих супругов; 7) перенос эмбрионов хорошего качества. Критерии ис-

ключения пациенток из исследования: 1) другие формы бесплодия; 2) генитальная и экстрагенитальная патология, при которой проведение ЭКО противопоказано; 3) острые заболевания органов малого таза; 4) хронические заболевания в стадии обострения. В зависимости от исхода процедуры ЭКО все женщины ретроспективно были разделены на две группы: группа I (n = 40) – пациентки, у которых наступила беременность после ЭКО, группа II (n = 80) – пациентки, у которых беременность не наступила. Клиническая характеристика женщин представлена в таблице 1. Группы были сопоставимы по возрасту и анамнестическим данным (p > 0,05).

Взятие образца крови

Забор крови проводился на 3-4 день менструального цикла, предшествующего процедуре ЭКО. Образцы крови получали утром, натощак, при помощи венепункции локтевой вены в асептических условиях, в две пробирки. 1 – для иммуноферментного анализа: в пробирку с активатором свертывания, после завершения процесса свертывания (30 минут), центрифугировали при 200 g 15 минут, отбирали надосадочную жидкость, замораживали при температуре -30 °C и хранили при температуре -40-60 °C. 2 – для молекулярно-генетического исследования: в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), замораживали и хранили до проведения исследования при температуре -20 °C.

Биохимические исследования

В образцах сыворотки крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов поликлональных антител определяли содержание IL-1α (ООО «Цитокин», Россия) на иммуноферментном автоматическом

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ЖЕНЩИН

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF WOMEN PARTICIPATING IN INVESTIGATION

Показатель Index	I группа Group I n = 40	II группа Group II n = 80	Всего Total n = 120
Средний возраст, лет Mean age, years (M±m)	33,4±3,8	32,6±4,3	32,8±4,1
Средняя длительность бесплодия, лет Mean duration of infertility, years (M±m)	5,6±3,3	5,1±3,6	5,3±3,5
Наличие гинекологической патологии Gynecological disorders, n (%)	34 (85%)	66 (82,5%)	100 (83,3%)
Оперативные вмешательства на придатках матки Uterine adnexa surgery, n (%)	6 (15%)	14 (17,5%)	20 (16,7%)
Наличие экстрагенитальной патологии Extragenital disorders, n (%)	19 (47,5%)	40 (50%)	59 (49,2%)

анализаторе Personal lab (Италия) согласно инструкции производителя. Исследование гормонального статуса проводили радиоиммунным и иммуноферментным методами с применением стандартных наборов. В раннюю фолликулярную фазу на 2-3 день менструального цикла определяли концентрацию в крови ФСГ, лютеинизирующего гормона (ЛГ), кортизола, пролактина, эстрадиола, тестостерона, дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭА-сульфат), 17-оксипрогестерона (17-ОПГ) и АМГ. Во вторую фазу менструального цикла (20-22 день) в крови определяли концентрацию прогестерона.

Молекулярно-генетические исследования

Были изучены частоты встречаемости полиморфного маркера *rs1800587* (C/T) гена IL-1 α . Выделение ДНК из образцов жидкой крови осуществляли на автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот и белков QIAcube с использованием набора реагентов QIAamp DNA Mini Kit (оборудование и реагенты производства QIAGEN, Германия). Методом ПЦР с последующим секвенированием по Сенгеру исследовали полиморфный маркер *rs1800587* (UTR-5 области гена). Амплификацию фрагмента гена IL-1 α , содержащего полиморфный локус, проводили с использованием подобранных в рамках настоящего исследования праймеров в двух отдельных реакциях. Для подбора праймеров использовали Интернет-ресурс Primer-BLAST и референтную нуклеотидную последовательность NM_000575.4 из Базы данных NCBI. Продукты амплификации очищали от избытка дезоксинуклеотидтрифосфатов и праймеров на микроколонках (QIAGEN, Германия). Секвенирование очищенных продуктов ПЦР осуществляли с одним из праймеров, использованных на стадии ПЦР, на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 с использованием наборов для циклического секвенса BigDye[®] Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit и соответствующего программного обеспечения к прибору, согласно инструкции производителя (Applied Biosystems, США). Завершающий этап анализа нуклеотидных последовательностей для исследуемых образцов выполняли с помощью программ PeakTrace, Sequence Scanner v.1.0, Chromas Lite 2.1.1, Vector NTI Advance 10.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью стандартного пакета прикладных программ StatSoft Statistica 10.0 (США). Качественные значения отражены в виде абсолютных величин (n) и процентных долей. Для анализа различий между количественными признаками использовалась описательная статистика с использованием t-критерия Стьюдента. Для оценки взаимосвязи между количественными изучаемыми показателями проводился

линейный корреляционный анализ с определением коэффициента корреляции Пирсона (r). Для оценки ассоциаций генотипов с наступлением беременности использовался критерий χ^2 Пирсона и отношение шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (CI). Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов было проверено на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. Значимость выявленных различий и взаимосвязей во всех видах анализа была принята при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При анализе содержания IL-1 α в сыворотке крови женщин с ТПБ было выявлено достоверное повышение его содержания у женщин с наступившей беременностью после проведения процедуры ЭКО 26,6 (3,9; 40,2) пг/мл по сравнению с женщинами с неэффективной процедурой – 17,4 (4,2; 18,0) пг/мл ($p = 0,038$).

Согласно современным представлениям, успешная имплантация эмбриона на начальных стадиях беременности происходит в провоспалительной микросреде и сопровождается переходом Th1-типа ответа в Th2-тип для модуляции эндокринных и иммунных механизмов [8, 10, 11]. IL-1 α является ведущим медиатором воспалительных реакций, способным к индукции и активации их как в тканях, так и на системном уровне [9]. Цитокины IL-1 α , IL-1 β , IL-1 γ за счет связывания со своими специфическими мембранными рецепторами стимулируют выработку клетками эндометрия интегриновых молекул для адгезии бластоцисты. Кроме того, сама бластоциста способна к экспрессии рецепторов IL-1 α , при стимуляции которых происходит выработка хорионического гонадотропина (ХГЧ), необходимого для формирования иммунологической толерантности в системе мать–плод [7]. Выявленное нами повышение уровня IL-1 α у женщин с эффективной процедурой ЭКО позволяет говорить, что локальное воспаление, сопровождающееся повышенным содержанием IL-1 α , позитивно влияет на имплантацию бластоцисты в толщу эндометрия. Вероятно, это может быть объяснено активацией под действием IL-1 α синтеза матриксной металлопротеиназы-3 (ММП-3) в эндометриальных стромальных клетках, необходимой для ремоделирования тканей и клеточной перестройки во время имплантации [13].

В процессе наступления беременности важную роль играет как иммунная, так и эндокринная система, бесспорно, взаимосвязанные между собой. Для успешной имплантации необходимо, чтобы эндометрий претерпел определенную последовательность дифференцировки, контролируемую стероидами яичников, и что-

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ IL-1α И ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНЫХ, ЯИЧНИКОВЫХ ГОРМОНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖЕНЩИН С ТПБ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА

TABLE 2. CORRELATION ANALYSIS OF INTERCONNECTIONS BETWEEN IL-1α CONTENT AND HYPOTHALAMIC-PITUITARY, OVARIAN HORMONES IN BLOOD SERA OF WOMEN WITH TUBO-PERITONEAL INFERTILITY WITH DIFFERENT IL-1α RS1800587 GENOTYPES

IL-1α и гормон IL-1α/ hormone variables	Женщины с ТПБ Women with tubo- peritoneal infertility n = 120		Генотип С/С C/C genotype n = 48		Генотип С/Т C/T genotype n = 42		Генотип Т/Т T/T genotype n = 30	
	r	p	r	p	r	p	r	p
ФСГ FSH	0,013968	0,879648	0,338188	0,018722	-0,155947	0,324034	-0,166481	0,379257
ЛГ LH	0,244959	0,007007	0,129528	0,380245	-0,070101	0,659114	-0,087698	0,644928
Пролактин Prolactin	0,080886	0,379818	-0,115842	0,433001	-0,081552	0,607653	-0,050774	0,789889
Кортизол Cortisol	-0,148827	0,104739	-0,072639	0,623681	-0,025387	0,873205	-0,303263	0,103295
Эстрадиол Estradiol	0,045815	0,619270	0,242242	0,097142	0,339323	0,027922	0,408352	0,025073
Прогестерон Progesterone	0,090582	0,325156	-0,071147	0,630844	-0,200408	0,203177	-0,067736	0,722102
17-ОПГ 17-OHP	0,229768	0,011586	0,238764	0,102189	0,248833	0,112046	0,019649	0,917914
ДГЭА-сульфат DHEA-s	0,041728	0,650891	0,030245	0,838303	0,064678	0,684053	0,065913	0,729301
Тестостерон Testosterone	0,124671	0,174873	-0,084664	0,567230	-0,013619	0,931783	0,367129	0,045965
АМГ MIS	-0,060716	0,510052	-0,007541	0,959429	0,097773	0,537895	0,228020	0,225553

Примечание. r – коэффициент корреляции Пирсона, p – уровень достоверности.

Note. r, the Pearson correlation quotient; p, statistical significance of the correlation.

бы blastocista достигла точной стадии активации [14]. В связи с этим нами был проведен корреляционный анализ между содержанием IL-1α в сыворотке у женщин с ТПБ и содержанием гипоталамо-гипофизарных и яичниковых гормонов. Выявлена прямая зависимость между сывороточной концентрацией IL-1α и уровнем ЛГ и 17-ОПГ, в остальных случаях взаимосвязи выявлено не было (табл. 2).

У женщин с наступившей беременностью в ходе проведенного ЭКО обнаружена положительная корреляционная взаимосвязь между содержанием IL-1α и ЛГ, пролактином, прогестероном, 17-ОПГ, ДГЭА-сульфатом, а у женщин с неэффективной процедурой ЭКО – отрицательная взаимосвязь с АМГ и положительная с 17-ОПГ (табл. 3). Вероятно, полученные данные могут быть объяснены тем, что ввиду регулярных циклических процессов в яичнике, овариальный фолликул является местом воспалительных ре-

акций, а клетки яичника могут выступать в качестве как источников, так и мишеней для IL-1α.

Согласно исследованиям зарубежных авторов, в яичнике функционируют участки синтеза IL-1α в ооците, гранулозных и тека-клетках у несколько видов млекопитающих [15]. Экспериментальные данные, полученные Ben-Shlomo и Adashi (1994), позволили предположить что IL-1α является паракринным фактором, который может быть задействован в каскаде событий, приводящим к овуляции за счет синтеза протеаз, регуляции активности активатора плазминогена, простагландина и производства оксида азота.

При обследовании женщин с бесплодием, участвующих в ЭКО, de Los Santos и соавт. (1998) выявили, что скопления фолликулярных клеток экспрессируют мРНК IL-1α и IL-1β. Более того, согласно исследованиям Simon и соавт. (1994), во время преовуляторного созревания, после повышения ЛГ или инъекции ХГЧ, высокие уров-

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ IL-1 α И ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНЫХ, ЯИЧНИКОВЫХ ГОРМОНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖЕНЩИН С ТПБ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДА ПРОЦЕДУРЫ ЭКО

TABLE 3. CORRELATION ANALYSIS OF INTERCONNECTIONS BETWEEN IL-1 α CONTENT AND HYPOTHALAMIC-PITUITARY, OVARIAN HORMONES IN THE SERUM OF WOMEN WITH TUBO-PERITONEAL INFERTILITY WITH DIFFERENT IL-1 α rs1800587 GENOTYPES

IL-1 α и гормон IL-1 α /hormone variables	I группа Group I n = 40		II группа Group II n = 80	
ФСГ FSH	0,242992	0,130832	-0,047147	0,677933
ЛГ LH	0,638705	0,000009	0,006288	0,955856
Пролактин Prolactin	0,449430	0,003622	0,081347	0,473173
Кортизол Cortisol	-0,108540	0,504983	-0,121521	0,282913
Эстрадиол Estradiol	0,230697	0,152089	-0,015798	0,889379
Прогестерон Progesterone	0,445514	0,003965	-0,170226	0,131138
17-ОПГ 17-OHP	0,474830	0,001962	0,529672	0,000000
ДГЕА-сульфат DHEA-s	0,407026	0,009145	-0,074157	0,513277
Тестостерон Testosterone	-0,086998	0,593488	0,192932	0,086414
АМГ MIS	0,290438	0,069055	-0,238460	0,033162

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As in Table 2.

ни IL-1 α и IL-1 β наблюдаются в фолликулярных клетках.

Принимая во внимание важность провоспалительных цитокинов в контексте наступления беременности, мы также оценивали полиморфный маркер гена IL-1 α . Был проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов у обследованных женщин. Выявлено, что наибольший процент женщин с ТПБ являлись носителями аллеля С – 57,5% (69 чел.), чем носителями аллеля Т – 42,5% (51 чел.), без достоверных отличий ($p = 0,0709$). Женщины с эффективной процедурой ЭКО в 57,5% (23 чел.) случаев являлись носителями аллеля Т, а в 42,5% (17 чел.) случаев – носителями аллеля С. Женщины с нерезультативным ЭКО в 35% (28 чел.) случаев являлись носителями аллеля Т и в 65% (52 чел.) случаев – носителями аллеля С. При расчете отношения шансов, выявлено, что женщины-носители аллеля Т имеют шанс забеременеть в 2,51 раза выше, чем женщины носители аллеля С (95% CI = [1,45-4,35], $p = 0,0009$).

При анализе частот носительства генотипов гена IL-1 α выявлено следующее распределение носительства генотипов: С/С – 40% (48 чел.), генотипа С/Т – 35% (42 чел.), генотипа Т/Т – 25% (30 чел.), без достоверных отличий ($p = 0,0891$). В группе женщин с благоприятным исходом процедуры ЭКО 45% женщин являлись носителями генотипа Т/Т, носителями генотипа С/Т – 25% женщин, а носителями генотипа С/С – 30% женщин, без достоверных отличий ($p > 0,05$). У женщин с неблагоприятным исходом ЭКО встречалось иное соотношение встречаемости генотипов: 15% женщин являлись носителями генотипа Т/Т, 40% женщин – носителями генотипа С/Т и 45% женщин – носителями генотипа С/С. В этой группе генотип Т/Т встречался достоверно реже, чем генотипы С/Т и С/С ($p = 0,0004$, $p = 0,0001$ соответственно). На основе расчета отношения шансов, выявлено, что женщины-носители генотипа Т/Т имеют шанс забеременеть в результате ЭКО в 4,6 раза выше, чем женщины с другими генотипами (95% CI = [1,93-11,1],

$p = 0,002$). По данным авторов [2], генотип Т/Т ассоциирован с повышенной продукцией IL-1α. Гонадотропины, используемые во время программы ЭКО индуцируют локальную и системную продукцию IL-1α (Karaouni et al., 1988). Вероятно, поэтому, женщины-носители генотипа Т/Т имеют более высокий шанс забеременеть в результате процедуры ЭКО.

У женщин с генотипом Т/Т была выявлена положительная корреляционная взаимосвязь между содержанием IL-1α и эстрадиолом и тестостероном, взаимосвязи между другими показателями выявлено не было (табл. 2). У женщин-носителей генотипа С/Т выявлена положительная корреляционная взаимосвязь с эстрадиолом, а у носителей генотипа С/С с ФСГ.

Заключение

Полученные результаты позволяют заключить, что женщин с ТПБ, у которых сыровоточный уровень IL-1α выше, отличаются более благоприятным исходом процедуры ЭКО. Выявлена положительная корреляционная взаимосвязь между IL-1α и ЛГ, пролактином, прогестероном 17-ОПГ, ДГЭА-сульфатом у женщин с наступившей беременностью в результате проведенного ЭКО. Женщины-носители аллеля Т и генотипа Т/Т гена IL-1α имеют более высокий шанс забеременеть в результате процедуры ЭКО,

в отличие от носителей аллеля С и генотипов С/Т и С/С.

Таким образом, молекулярные взаимодействия между эмбрионом и эндометрием во время имплантации являются актуальным вопросом современной иммунологии репродукции. Эти механизмы молекулярных взаимодействий, по видимому, инициируются эндометрием в присутствии имплантирующей бластоцисты. Механизмы, с помощью которых стероиды и цитокины действуют сообща, чтобы способствовать селективному выражению конкретных ММР, одновременно ограничивая действия других при установлении беременности, не совсем понятны. Если IL-1α принимается как маркер восприимчивости в матке, наши наблюдения могут означать, что нормальный гормонально регулируемый эндометрий человека является триггером молекулярных событий, которые готовят бластоцисту, чтобы эффективно связывать и регулировать молекулы адгезии эндометрия для имплантации.

Результаты проведенного исследования обосновывают актуальность дальнейшего исследования продукции IL-1α, открывают перспективы для разработки новых подходов к определению прогноза и повышению результативности ЭКО.

Список литературы / References

1. Вартанян Э.В., Мартышкина Е.Ю., Цатурова К.А. Роль сочетанной патологии в неудачных протоколах ЭКО // *Акушерство, гинекология и репродукция*, 2011. Т. 5, № 4. С. 40-43. [Vartanyan E.V., Martyshkina E.Yu., Tsaturova K.A. Role of combined pathology in unsuccessful IVF cycles. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduksiya = Obstetrics, Gynecology, and Reproduction*, 2011, Vol. 5, no. 4, pp. 40-43. (In Russ.)]
2. Громова А.Ю., Симбирцев А.С. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека // *Цитокины и воспаление*, 2005. Т. 4, № 2. С. 5-7. [Gromova A.Yu., Simbirtsev A.S. Gene polymorphisms of interleukin%1 family cytokines. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2005, Vol. 4, no. 2, pp. 5-7. (In Russ.)]
3. Комиссарова Ю.В., Кузьмичев Л.Н. Трубно-перитонеальное бесплодие: клиническое значение определения сосудисто-эндотелиального фактора роста в прогнозировании синдрома гиперстимуляции яичников // *Акушерство и гинекология*, 2010. № 4. С. 50-54. [Komissarova Yu.V., Kuzmichev L.N. Tuboperitoneal infertility: clinical value of determination of vascular endothelial growth factor in the prediction of ovarian hyperstimulation syndrome. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2010, no. 4, pp. 50-54. (In Russ.)].
4. Корсак В.С., Смирнова А.А., Шурыгина О.В. Регистр центров ВРТ в России. Отчет за 2014 год // *Проблемы репродукции*, 2016. Т. 22, № 5. С. 10-21. [Korsak V.S., Smirnova A.A., Shurygina O.V. Russian VRT register, 2014. *Problemy reproduksii = Russian Journal of Human Reproduction*, 2016, Vol. 22, no. 5, pp. 10-21. (In Russ.)]
5. Кулаков В.И., Леонов Б.В., Кузьмичев Л.Н. Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии. М.: МИА, 2005. 592 с. [Kulakov V.I., Leonov B.V., Kuzmichev L.N. Treatment of female and male infertility. Auxiliary reproductive technologies]. Moscow: MIA, 2005. 592 p.
6. Мотовилова Н.О., Коган И.Ю., Сысоев К.А., Буйнова А.Н., Грязнов А.Ю., Тотолян А.А. Роль некоторых цитокинов в эффективности лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения // *Медицинская иммунология*, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 373-382. [Motovilova N.O., Kogan I.Y., Syssoev K.A., Buinova A.N., Griaznov A.Yu., Totolian A.A. Impact of some cytokines to efficiency of infertility treatment by means of in vitro fertilization. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 373-382. (In Russ.)]. doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-373-382.
7. Посисеева Л.В., Тулупова М.С., Калинина Е.А. Иммунология ранних сроков беременности: подготовка эндометрия к имплантации (обзор литературы) // *Доктор.Ру*, 2013. №7-1 (85). С. 74-78. [Posiseeva L.V.,

Tulupova M.S., Kalinina E.A. Immunity in early pregnancy: preparation of endometrium for implantation. *Doktor.Ru = Doctor.Ru*, 2013, no. 7-1 (85), pp. 74-78. (In Russ.)]

8. Сидельникова В.М. Невынашивание беременности: руководство для практикующих врачей. М.: МИА, 2010. 536 с. [Sidelnikova V.M. Miscarriage of pregnancy: a guide for practitioners]. Moscow: MIA, 2010. 536 p.

9. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. 2004. № 3. С. 16-22. [Simbirtsev A.S. Cytokines – classification and biologic functions. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2004, Vol. 3, no. 2, pp. 16-22. (In Russ.)]

10. Fest S., Aldo P.B., Abrahams V.M., Visintin I., Alvero A., Chen R., Chavez S.L., Romero R., Mor G. Trophoblast–Macrophage Interactions: a Regulatory Network for the Protection of Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2007, Vol. 57, no. 1, pp. 55-66.

11. Chaouat G., Ledee-Bataille N., Dubanchet S., Zourbas S., Sandra O. Th1/Th2 paradigm in pregnancy: Paradigm lost? *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2004, Vol. 134, no. 2, pp. 93-119.

12. Gnoth C., Schuring A.N., Friol K., Tigges J., Mallmann P., Godehardt E. Interleukin-1 deficiency prolongs ovarian lifespan in mice. *Human Reproduction*, 2008, Vol. 23, no. 6, pp. 1359-1365.

13. Nishiura R., Noda N., Minoura H., Toyoda N., Imanaka-Yoshida K., Sakakura T., Yoshida T. Expression of matrix metalloproteinase-3 in mouse endometrial stromal cells during early pregnancy: Regulation by interleukin-1 α and tenascin-C. *Gynecological Endocrinology*, 2005, Vol. 21, no. 2, pp. 111-118.

14. Paria B.C., Lim H., Das S.K., Reese J., Dey S.K. Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2000, Vol. 11, no. 2, pp. 67-76.

15. Takakura K., Taii S., Fukuoka M., Yasuda K., Tagaya Y., Yodoi J., Mori T. Interleukin-2 receptor/p55(Tac)-inducing activity in porcine follicular fluids. *Endocrinology*, 1989, Vol. 125, no. 2, pp. 618-623.

Авторы:

Лапштаева А.В. — ассистент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Евсегнеева И.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Новиков В.В. — д.б.н., профессор, заведующий кафедрой молекулярной биологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

Сычев И.В. — студент Медицинского института ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Караулов А.В. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва; профессор кафедры молекулярной биологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

Authors:

Lapshataeva A.V., Assistant Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology, Medical Institute, National Research N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Evseegneeva I.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, First Moscow I.M. Sechenov State Medical University, Moscow, Russian Federation

Novikov V.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Molecular Biology and Immunology, National Research Nizhny Novgorod N.I. Lobachevskii State University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Sychev I.V., Student, Medical Institute, National Research N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Karaulov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, First Moscow I.M. Sechenov State Medical University, Moscow; Professor, Department of Molecular Biology and Immunology, National Research Nizhny Novgorod N.I. Lobachevskii State University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Поступила 05.10.2017
Принята к печати 10.10.2017

Received 05.10.2017
Accepted 10.10.2017

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ИМПУЛЬСНОЙ ЭЛЕКТРОТЕРАПИИ (ЭЛЕКТРОСОНТЕРАПИИ) НА НЕЙРОПЕПТИДНО-ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ НА ФОНЕ АСТЕНО-НЕВРОТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, У МУЖЧИН МОЛОДОГО ВОЗРАСТА ИЗ ГРУППЫ НАПРЯЖЕННЫХ ПРОФЕССИЙ

Герцев А.В., Ищук В.Н.

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия
Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им А.М. Никифорова МЧС России,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Характер нарушений в функционировании основных регуляторных систем у больных с соматической патологией обусловил необходимость разработки новых эффективных комплексных подходов к их лечению и профилактике. Среди таких методов лечения эффективным является импульсная электротерапия (электросонотерапия). Однако, несмотря на наличие результатов исследований, доказывающих высокую эффективность электросонотерапии в терапевтической практике, открытыми остаются вопросы о влиянии данного метода лечения на нейропептидно-цитокиновый пул иммунной системы, являющийся одним из важных эффекторных звеньев патогенеза при сердечно-сосудистых заболеваниях, у лиц молодого возраста с артериальной гипертензией из группы напряженных специальностей.

В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение влияния электросонотерапии на нейропептидно-цитокиновый профиль при артериальной гипертензии, протекающей с астено-невротическими нарушениями, у мужчин молодого возраста из группы напряженных профессий. Были сформированы группы: 1-я (n = 12) — проводили антигипертензивную терапию; 2-я (n = 10) — получали в комплексе терапевтических мероприятий кроме гипотензивной терапии малые транквилизаторы; 3-я (n = 12) — проводили электросонотерапию. Нейропептидно-цитокиновый профиль исследовали по уровню содержания в сыворотке крови β -эндорфина, провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов.

В ходе проведенного клинико-лабораторного обследования авторами установлено, что электросонотерапия в комплексе основного лечения гипотензивными препаратами больных с артериальной гипертензией и астено-невротическими нарушениями оптимизирует функционирование нейропептидно-цитокинового пула иммунной системы и проявляется стимуляцией продукции β -эндорфина, снижением через эффекторные звенья регуляции провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6) и увеличением противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов.

Ключевые слова: электротерапия, электросон, артериальная гипертензия, астенения, β -эндорфин, цитокины

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 «Особенности влияния импульсной электротерапии (электросонотерапии) на нейропептидно-цитокиновый профиль при артериальной гипертензии, протекающей на фоне астено-невротических нарушений, у мужчин молодого возраста из группы напряженных профессий» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 123–128. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-123-128

© Герцев А.В., Ищук В.Н., 2017

For citation:

A.V. Gertsev, V.N. Ischuk "Characteristic influence of pulse electrotherapy (electrical sleep) at a neuropeptide-cytokine links in arterial hypertension accompanied by an asthenoneurotic disturbances in young men employed in stressful professions", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 123–128. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-123-128

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-123-128

CHARACTERISTIC INFLUENCE OF PULSE ELECTROTHERAPY (ELECTRICAL SLEEP) AT A NEUROPEPTIDE-CYTOKINE LINKS IN ARTERIAL HYPERTENSION ACCOMPANIED BY A ASTHENONEUROTIC DISTURBANCES IN YOUNG MEN EMPLOYED IN STRESSFUL PROFESSIONS

Gertsev A.V., Ischuk V.N.

S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Disorders in functioning of major regulatory systems in patients with somatic diseases required development of new and effective integrated approaches to their treatment and prevention. Effective electrotherapy (electrical sleep) is among these methods. Despite existence of studies proving high efficiency of electrical sleep results in therapeutic practice, some open questions remain concerning impact of this treatment upon neuropeptide-cytokine links of immune system, which is one of the most important effector of pathogenesis in cardiovascular diseases in young persons with hypertension from the group occupied with stressful jobs.

In this connection, the aim of our study was to investigate the influence on electrical sleep upon neuropeptide-cytokine profile in arterial hypertension conditions accomplished by asthenic-neurotic disorders in young men from the group of stressful activities. The following treatment groups were formed: 1st (n = 12), antihypertensive therapy; 2nd (n = 10), complex therapeutic measures added to antihypertensive therapy plus minor tranquilizers; in the 3rd group (n = 12), electric sleep was performed. Neuropeptide-cytokine profile was investigated as serum contents of β -endorphin, proinflammatory (TNF α , IL-1 β , IL-6) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines.

In the course of the clinical and laboratory examination, the authors have found that electric sleep applied in a complex primary schedule, with antihypertensive drug treatment in patients with hypertension and asthenic-neurotic disorders proved to exert optimizing effect upon functioning of neuropeptide-cytokine pool of immune system, which manifested by stimulation of beta-endorphin production, a decrease *via* regulation of proinflammatory effectors (TNF α , IL-1 β , IL-6), and increased anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10).

Keywords: *electrosomotherapy, electrical sleep, hypertension, asthenia, β -endorphin, cytokines*

Введение

В последние десятилетия имеется тенденция к увеличению частоты встречаемости депрессивных расстройств в клинике внутренних болезней среди лиц молодого возраста, что обусловлено изменениями их психического статуса [2, 3]. Частота депрессий в общесоматической сети у таких больных сопоставима с частотой такого распространенного заболевания, как артериальная гипертензия (АГ) [4]. Установлено, что среди больных АГ часто возникают эмоциональные нарушения в виде тревоги, подавленности, фиксация на своих болезненных ощущениях и переживаниях [7]. По мере прогрессирования гипертонической болезни (ГБ) тревожно-депрессивные нарушения превращаются в непосредственный фактор усугубления патологических нарушений, при этом складывается жесткий стереотип реагирования на психоэмоциональную нагрузку [5]. Возникновение этих нарушений связано с преморбидными особенностями личности (тревно-мнительные) и особенностями течения ГБ [10].

Характер нарушений в функционировании основных регуляторных систем у больных с со-

матической патологией обусловил необходимость разработки новых эффективных комплексных подходов к их лечению и профилактике [9]. Среди таких методов лечения эффективным является импульсная электротерапия (электросонотерапия). До настоящего времени накопилось множество клинических данных, свидетельствующих об эффективности данного метода терапии импульсными токами больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Так, применение электросонотерапии в лечении ГБ способствует нормализации нейрогуморальной регуляции функции сердечно-сосудистой системы, снижает симпатикотонию и оптимизирует центральную гемодинамику через влияние на подкорковые центры и гипоталамическую систему вегетативной нервной системы (ВНС) [1, 6]. Кроме того, применение импульсных токов, путем активации серотонинергических нейронов дорсального ядра шва головного мозга, приводит к накоплению серотонина в подкорковых структурах центральной нервной системы (ЦНС), тем самым препятствуя развитию депрессивных состояний, что позволяет устранить психоэмоциональное напряжение, болезни стресса и повысить

устойчивость больных с АГ к неблагоприятным факторам риска [8, 11]. Таким образом, воздействуя на основные эффекторные звенья регуляции у больных с кардиологической патологией, электросонотерапия приводит к активации сано-генетических механизмов в сердечно-сосудистой системе и тем самым способствует ее адаптации к новым условиям функционирования.

Несмотря на наличие результатов исследований, доказывающих высокую эффективность электросонотерапии в терапевтической практике, открытыми остаются вопросы о влиянии данного метода лечения на нейропептидно-цитокиновый пул иммунной системы, являющийся одним из важных эффекторных звеньев патогенеза при сердечно-сосудистых заболеваниях, у лиц молодого возраста с АГ из группы напряженных специальностей.

Цель исследования — изучение влияния электросонотерапии на нейропептидно-цитокиновый профиль при АГ, протекающей на фоне астено-невротических нарушений, у мужчин молодого возраста из группы напряженных профессий.

Материалы и методы

Провели клинико-лабораторное обследование 34 больных (мужчин) в возрасте от 30 до 45 лет со средним возрастом $34,0 \pm 8,4$ лет. У 34 обследуемых имелась впервые выявленная ГБ I и II стадии (I10 по МКБ-10), без постоянной гипотензивной терапии в анамнезе и астено-невротическое расстройство с тревожными и депрессивными проявлениями (F48 по МКБ-10). Длительность наблюдения за больными была $14 \pm 2,6$ сут.

Контрольную группу (КГ) составили 15 относительно здоровых лиц (мужчин).

Для решения цели исследования сформировали группы больных с АГ и астено-невротическими нарушениями:

1-я ($n = 12$) — проводили стандартную антигипертензивную терапию;

2-я ($n = 10$) — получали в комплексе терапевтических мероприятий, кроме стандартной гипотензивной терапии, психотропные препараты (малые транквилизаторы);

3-я ($n = 12$) — больные с АГ, которым, кроме стандартного лечения антигипертензивными препаратами, проводили электросонотерапию. Данный метод электролечения заключался в воздействии прямоугольным импульсным током низкой частоты и малой интенсивности на ЦНС непосредственно или через рецепторный аппарат в целях нормализации ее функционального состояния.

Основным в механизме биологического действия электросонотерапии является прямое действие тока на структурные образования головного мозга в виде его распространения через зрительный анализатор в подкорково-стволовые отделы ЦНС (гипоталамус, гипофиз, ретикулярную формацию) и воздействуя непосредственно

на заложенные вегетативно-эндокринные центры регуляции функций организма.

Длительность одного сеанса электросна составляла 20-30 минут в утреннее время в течение всего периода нахождения больного на стационарном лечении (12-16 сут.). Использовали прямоугольные импульсы тока низкой частоты (5-20 Гц) частотой и длительностью 0,2-0,5 мс. Сила импульсного тока не превышала 8-10 мА.

Критерием исключения являлись пациенты с активным воспалительным процессом, онкологическими заболеваниями и заболеваниями иммунной системы.

В группах обследования нейропептидно-цитокиновый профиль исследовали по уровню функционирования надсегментарного аппарата ВНС (определение уровня содержания в сыворотке крови β -эндорфина) и иммунной системы (уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов).

Для количественного определения показателей продукции нейропептидов группы пропиемеланокортина (β -эндорфина), провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в сыворотке крови больных применялся метод иммуноферментного анализа (ИФА). Использовали тест-системы для определения провоспалительных и противовоспалительных цитокинов — IL-1 β , IL-4, фирмы BioSource International (США, Калифорния) и TNF α , IL-6, IL-10, фирмы ProCon (Санкт-Петербург, Россия). Показатели продукции β -эндорфина определяли с использованием тест-систем фирмы BioSource International (США, Калифорния). Чувствительность тест-систем для определения цитокинов — 2 пг/мл, β -эндорфина — 0,04-0,06 пг/мл.

Клиническое обследование и лечение пациентов проводили в клинике военно-морской госпитальной терапии, кафедре курортологии и физиотерапии (с курсом медицинской реабилитации) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург).

Все лабораторные исследования проводили 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 ($M \pm m$). Кро-

ме того, провели оценку качественных и количественных парных корреляционных связей между основными показателями, характеризующими функционирование надсегментарного аппарата ВНС (β -эндорфин), провоспалительных (TNF α , IL-1 β , 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. 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 вегетативной регуляции

При проведении клинико-лабораторных исследований было выявлено достоверно значимое повышение уровня продукции β -эндорфина (табл. 1) в 3-й группе пациентов по отношению к 1-й ($p < 0,05$) и 2-й ($p < 0,05$) группам. Уровень β -эндорфина в сыворотке крови больных 2-й группы также значимо превышал таковые показатели 1-й группы ($p < 0,05$).

Высокие показатели продукции β -эндорфина в 3-й группе и повышение его значений во 2-й свидетельствуют о положительных тенденциях в регуляторных процессах надсегментарной области ВНС.

Состояние иммунной системы

Все показатели цитокинов провоспалительного и противовоспалительного спектра также изменялись в широких пределах в зависимости от проводимого лечения (табл. 2). Установлено статистически значимое снижение уровня TNF α во всех группах у пациентов после проведенного лечения. В 3-й группе пациентов уменьшение показателей TNF α было более выражено и они приближались по значимости к данным КГ (табл. 2).

После проведенного лечения у больных происходит снижение продукции и других провоспалительных (IL-1 β , IL-6) цитокинов. Но в 3-й группе пациентов уменьшение по сравнению с другими больными более выражено. Как правило, данные провоспалительных цитокинов у пациентов 3-й группы после проведенного лечения и лиц КГ статистически не различались (табл. 2).

Обратная тенденция наблюдается в показателях противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов. После проведенного лечения у пациентов отмечается их увеличение, более выраженное у больных 3-й группы (табл. 2).

Из приведенных фактов следует заключить, что применение электросоотерапии в комплексе терапевтических мероприятий приводит к снижению через эффекторные звенья регуляции провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6) и увеличению противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов.

Взаимосвязи показателей функционирования надсегментарного аппарата ВНС и иммунной системы в зависимости от проводимой терапии

Выявлено следующее (табл. 3):

- в 1-й группе больных средние обратные корреляционные связи были установлены между уровнем содержания β -эндорфина и IL-1 β ($p < 0,05$), IL-4 ($p < 0,05$); обратные сильные – между показателем содержания β -эндорфина и IL-6 ($p < 0,01$), а также выявлено полное отсутствие взаимосвязей между уровнем содержания показателя β -эндорфина, TNF α и IL-10;

- во 2-й группе обратные сильные корреляционные связи прослеживаются между уровнем содержания β -эндорфина и TNF α ($p < 0,01$), IL-6 ($p < 0,01$), IL-1 β ($p < 0,01$), IL-4 ($p < 0,01$) и средние – между уровнем содержания β -эндорфина и IL-10 ($p < 0,05$);

- в 3-й группе установлены только обратные сильные корреляционные связи – между уровнем β -эндорфина и TNF α ($p < 0,01$), IL-6 ($p < 0,01$), IL-1 β ($p < 0,01$), IL-4 ($p < 0,01$), IL-10 ($p < 0,01$).

- в группе здоровых были определены обратные сильные корреляционные связи между уровнем β -эндорфина и TNF α (0,86; $p < 0,01$), IL-1 β ($p < 0,01$), IL-6 ($p < 0,01$), IL-4 ($p < 0,01$) и IL-10 ($p < 0,01$).

Обсуждение

При лечении предложенными методами нами определена положительная динамика в восстановлении показателей основных регуляторных систем организма. Так, существенные сдвиги к нормализации деятельности надсегментарной области ВНС возникают во 2-й и особенно в 3-й группе пациентов, что по своим показателям соответствует среднестатистическим значениям здоровых людей. В 3-й группе более значимое повышение уровня β -эндорфина свидетельствует об эффективности применения электросоотерапии.

Анализируя состояние иммунной системы после проводимого лечения, было установлено, что во 2-ой и особенно в 3-ей группе больных наблюдается положительная динамика в показателях провоспалительного и противовоспалительного звеньев цитокинового пула иммунитета. В 3-й группе выявлено более значимое снижение уровня продукции провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6) и повышение противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов по сравнению со 2-й группой, что свидетельствует об эффективности лечения, включающего применение импульсной электротерапии.

При сравнении парных корреляционных связей между показателями, характеризующими функционирование вегетативной нервной и иммунной систем, у пациентов молодого возраста с АГ и астено-невротическими нарушениями, на фоне стандартной гипотензивной терапии ГБ

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ПРОДУКЦИИ β-ЭНДОРФИНА, М±SD (пг/мл)

TABLE 1. β-ENDORPHIN AMOUNTS IN BLOOD SERUM, M±SD (pg/ml)

Показатель Index	Группы больных в зависимости от проводимой терапии Groups of patients depending on the therapy			Контроль Control
	1-я 1 st	2-я 2 nd	3-я 3 rd	
β-эндорфин β-endorphin	2652±620,7	3546±762,8*	4131±712,1**	4649,6±318,6**

Примечание. Различия значимы при $p < 0,05$ по сравнению: * – с 1-й группой; # – со 2-й группой; ** – с 3-й группой.

Note. The differences are significant at $p < 0.05$ when compared to: *, group 1; #, group 2; **, group 3.

ТАБЛИЦА 2. ВЕЛИЧИНА ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ, М±SD (пг/мл)

TABLE 2. CYTOKINE AMOUNTS IN BLOOD SERUM, M±SD (pg/ml)

Показатель Index	Группа больных после лечения Group of patients after treatment			Контроль Control
	1-я 1 st	2-я 2 nd	3-я 3 rd	
TNFα	16,1±1,8	9,7±3,2*	8,1±2,3**	8,4±2,1**
IL-1β	3,5±0,7	3,2±0,5	2,4±1,8**	2,6±1,1**
IL-6	6,9±1,7	5,1±0,9*	2,8±1,7**	2,6±0,8**
IL-4	3,2±0,9	4,7±1,3*	6,5±2,2**	6,3±1,2*
IL-10	15,1±6,7	29,4±5,7*	31,7±6,3**	31,3±1,9*

Примечание. Различия значимы при $p < 0,05$ по сравнению: * – с 1-й группой; # – со 2-й группой; ** – с 3-й группой.

Note. The differences are significant at $p < 0.05$ when compared to: *, group 1; #, group 2; **, group 3.

ТАБЛИЦА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРНЫХ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ

ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НАДСЕГМЕНТАРНОГО АППАРАТА ВНС И ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ГРУППАХ ОБСЛЕДУЕМЫХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОВОДИМОЙ ТЕРАПИИ

TABLE 3. PAIRED CORRELATIONS BETWEEN THE INDICES OF FUNCTIONING OF THE SUPRASEGMENTARY APPARATUS OF THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM AND IMMUNE SYSTEM IN THE GROUPS OF SUBJECTS, DEPENDING ON THE THERAPY APPLIED

Цитокины Cytokines	Уровень продукции β-эндорфина β-endorphin amounts			
	Группы больных в зависимости от проводимой терапии Groups of patients depending on the therapy			Контроль Control
	1-я 1 st	2-я 2 nd	3-я 3 rd	
TNFα	-	-0,80; $p < 0,01$	-0,86; $p < 0,01$	-0,86; $p < 0,01$
IL-1β	-0,66; $p < 0,05$	-0,79; $p < 0,01$	-0,88; $p < 0,01$	-0,84; $p < 0,01$
IL-6	-0,70; $p < 0,01$	-0,80; $p < 0,01$	-0,86; $p < 0,01$	-0,86; $p < 0,01$
IL-4	-0,66; $p < 0,05$	-0,78; $p < 0,01$	-0,88; $p < 0,01$	-0,86; $p < 0,01$
IL-10	-	-0,58; $p < 0,05$	-0,82; $p < 0,01$	-0,78; $p < 0,01$

(1-й группа), были установлены средние и сильные корреляционные связи между показателем содержания β-эндорфина и IL-1β, IL-6 и IL-4, а также полное отсутствие взаимосвязей между уровнем β-эндорфина, TNFα и IL-10, что свидетельствует о полном отсутствии контроля ВНС над их функциями в иммунной системе и слабым влиянием на другие провоспалительные и противовоспалительные цитокины.

В группе пациентов, в комплексное лечение которых были включены психотропные препара-

ты (2-я группа), установлены умеренные и сильные корреляционные связи между уровнем содержания β-эндорфина, провоспалительными (TNFα, IL-1β и IL-6) и противовоспалительными (IL-4 и IL-10) цитокинами, что свидетельствует о недостаточно сильном и умеренном взаимовлиянии между этими регуляторными механизмами, что объективно указывает на эффективность применения психотропных препаратов в комплексной терапии АГ и астено-невротических нарушений.

У больных, в комплексное лечение которых была включена импульсная электротерапия (3-й группа), установлены сильные корреляционные связи между β -эндорфином, провоспалительными (TNF α , IL-1 β и IL-6) и противовоспалительными (IL-4 и IL-10) цитокинами, что свидетельствует о сильном взаимовлиянии между этими регуляторными механизмами и эффективности электросонотерапии.

Таким образом, показана достаточно высокая эффективность и однонаправленность лечения регуляторных нарушений у пациентов молодого

возраста с АГ и астено-невротическими нарушениями при включении в комплексное лечение импульсной электротерапии (электросонотерапии). Применение электросонотерапии в комплексном лечении АГ, протекающей с астено-невротическими нарушениями, у лиц молодого возраста напряженных профессий, способствует снижению уровня продукции провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β и IL-6), повышает содержание β -эндорфина и цитокинов противовоспалительного (IL-4 и IL-10) спектра.

Список литературы / References

1. Абрамович С.Г. Физиотерапия гипертонической болезни. Иркутск: ИГМАПО, 1999. 71 с. [Abramovich S.G. Physiotherapy hypertensive disease]. Irkutsk: IGMAPO, 1999. 71 p.
2. 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.)]
3. 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 = Bulletin of Roszdravnadzor*, 2012, no. 5, pp. 53-57. (In Russ.)]
4. 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 psixhiatriya = Social and Clinical Psychiatry*, 2005, Vol. 15, no. 3, pp. 69-90. (In Russ.)]
5. Довженко Т.В., Семиглазова М.В., Краснов В.Н., Васюк Ю.А. Тревожно-депрессивные расстройства при сердечно-сосудистых заболеваниях // Доктор.ру, 2010. № 4 (55). С. 39-47. [Dovzhenko T.V., Semiglazova M.V., Krasnov V.N., Vasyuk Yu.A. Anxiety and depressive disorders in cardiovascular diseases. *Doktor.ru = Doctor.ru*, 2010, no. 4 (55), pp. 39-47. (In Russ.)]
6. Кошукова Г.Н., Буглак Н.П. Влияние электросонотерапии на эндорфиновый профиль больных ревматоидным артритом // Вестник физиотерапии и курортологии, 2016. № 1. С. 20-23. [Koshukova G.N., Buglak N.P. The electrotherapy impact on endorphin profile in patients with rheumatoid arthritis. *Vestnik fizioterapii i kurortologii = Journal of Physiotherapy and Health Resort*, 2016, no. 1, pp. 20-23. (In Russ.)]
7. Оганов Р.Г., Ольбинская Л.И., Смулевич А.Б. Депрессии и расстройства депрессивного спектра в общей медицинской практике. Результаты программы КОМПАС // Кардиология, 2004. № 1. С. 48-55. [Oganov R.G., Olbinskaya L.I., Smulevich A.B. Depression and depressive disorders in general practice range. COMPASS program results. *Kardiologiya = Cardiology*, 2004, no. 1, pp. 48-55. (In Russ.)]
8. Олесова В.М., Маркатюк О.Ю., Юрова Ю.Ю., Обрезан А.Г. Электросонотерапия в лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы // Физиотерапевт, 2012. № 8. С. 45-48. [Olesova V.M., Markatyuk O.Yu., Yurova Yu.Yu., Obrezan A.G. Electrosonic therapy in the treatment of diseases of the cardiovascular system. *Fizioterapevt = Physiotherapist*, 2012, no. 8, pp. 45-48. (In Russ.)]
9. Парцерняк С.А. Интегративная медицина: путь от идеологии к методологии здравоохранения. СПб.: Нордмедиздат, 2007. 424 с. [Partsernyak S.A. Integrative Medicine: the path from ideology to the methodology of Health]. St. Petersburg: Nordmedizdat, 2007. 424 p.
10. Полякова Е.О. Пограничные психические расстройства в кардиологической практике: проблемы диагностики и лечения // Кардиологический вестник, 2006. Т. 1, № 2. С. 51-57. [Poliakova E.O. Borderline mental disorders in drug treatment practice: diagnosis and treatment of problems. *Kardiologicheskiy vestnik = Heart Gazette*, 2006, no. 2, pp. 51-58. (In Russ.)]
11. Пономаренко Г.Н. Физические методы лечения. СПб.: Санкт-Петербург, 2011. 344 с. [Ponomarenko G.N. Physical treatment]. St. Petersburg: Saint-Petersburg Publisher, 2011. 344 p.

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

Ишук 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

Поступила 06.02.2017

Отправлена на доработку 09.02.2017

Принята к печати 22.02.2017

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, Department 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

Received 06.02.2017

Revision received 09.02.2017

Accepted 22.02.2017

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ АНТИТЕЛА К ЭРИТРОПОЭТИНУ СВЯЗАНЫ СО СНИЖЕНИЕМ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ АНЕМИИ РЕКОМБИНАТНЫМИ ЭРИТРОПОЭТИНАМИ У ПАЦИЕНТОВ НА ГЕМОДИАЛИЗЕ

Назаров В.Д.¹, Лапин С.В.¹, Добронравов В.А.¹, Смирнов К.А.¹,
Майер Д.А.¹, Мужежская Т.О.¹, Тотолян Арег А.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Генно-инженерные биологические препараты (ГИБП) обладают свойством иммуногенности, т.е. способностью вызывать иммунный ответ организма по отношению к молекулам препарата. Последствием данного ответа может быть синтез антител к ГИБП, которые способны изменять фармакокинетику и фармакодинамику препарата. Целью данного исследования была оценка содержания циркулирующих антител к препаратам рекомбинантного эритропоэтина (рЭПО) и их взаимосвязи с неэффективностью проводимой терапии у пациентов на хроническом гемодиализе. На базе научно-исследовательского института нефрологии ПСПбГМУ имени акад. И.П.Павлова нами были отобраны 37 пациентов с ХБП 5 стадии, длительное время находящихся на гемодиализе и получающих различные типы препаратов рЭПО. Для сравнительного анализа все пациенты были разделены на две группы: первая группа со сниженным ответом на терапию (СОТ) – 21 пациент; вторая группа – группа с нормальным ответом на терапию (НОТ), 16 пациентов. Иммунологическим контролем послужили образцы крови здоровых доноров, никогда не получавших препараты ЭПО (n = 35). Концентрация антител была измерена с помощью методики дот-блоттинга. Верхний порог значений у 35 здоровых доноров крови был определен путем измерения концентрации антител в серии пошаговых разведений (от 1:10 до 1:200) донорских сывороток. Определенный нами верхний порог нормальных значений связывающих антител составил 20,27 мкг/мл (95 СІ% ± 0,43). Из 37 пациентов с ХБП, получавших препараты рЭПО, у 20 (54,05%) концентрация антител к рЭПО была выше установленного порога значений. Обнаружена статистически значимая обратная корреляция между концентрацией анти-рЭПО и средними уровнями гемоглобина и эритроцитов за 12 месяцев ($r = -0,368$, $p = 0,025$ и $r = -0,336$, $p = 0,042$ соответственно). У пациентов группы СОТ концентрация антител к рЭПО и средние дозы рЭПО, применявшиеся в течение 1 года, были достоверно выше по сравнению с группой НОТ ($p = 0,0019$). Полученные данные указывают на значительную частоту выявления анти-рЭПО и их ассоциацию со снижением терапевтической эффективности препаратов рЭПО.

Ключевые слова: эритропоэтин, анемия, иммуногенность, антитела

Адрес для переписки:

Назаров Владимир Дмитриевич
ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого,
6-8, корпус 28.
Тел.: 8 (812) 499-71-94.
E-mail: nazarov19932@mail.ru

Address for correspondence:

Nazarov Vladimir D.
First St. Petersburg Pavlov State Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg,
L. Tolstoy str., 6-8, bldg 28.
Phone: 7 (812) 499-71-94.
E-mail: nazarov19932@mail.ru

Образец цитирования:

В.Д. Назаров, С.В. Лапин, В.А. Добронравов, К.А. Смирнов, Д.А. Майер, Т.О. Мужежская, Арег А. Тотолян «Циркулирующие антитела к эритропоэтину связаны со снижением эффективности лечения анемии рекомбинатными эритропоэтинами у пациентов на гемодиализе» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 129–134. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-129-134
© Назаров В.Д. и соавт., 2018

For citation:

V.D. Nazarov, S.V. Lapin, V.A. Dobronravov, K.A. Smirnov, D.A. Mayer, T.O. Muzhetskaya, Areg A. Totolian "Circulating antibodies to erythropoietin are associated with lower efficacy of recombinant epoetin treatment in patients undergoing haemodialysis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 129–134. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-129-134
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-129-134

CIRCULATING ANTIBODIES TO ERYTHROPOIETIN ARE ASSOCIATED WITH LOWER EFFICACY OF RECOMBINANT EPOETIN TREATMENT IN PATIENTS UNDERGOING HAEMODIALYSIS

Nazarov V.D.^a, Lapin S.V.^a, Dobronravov V.A.^a, Smirnov K.A.^a, Mayer D.A.^a, Muzhetskaya T.O.^a, Totolian Areg A.^b

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

^b Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russia Federation

Abstract. Biological preparations (BP) obtained by gene engineering possess a special characteristic called immunogenicity, i.e. propensity of biological drugs to induce an undesired immune response associated with arising anti-drug antibodies. These antibodies can change BP pharmacokinetics and pharmacodynamics, and therapeutical efficacy. A significant proportion of hemodialysis patients with end-stage renal disease treated by recombinant erythropoietin (rEPO) have clinical features of resistance to such therapy. The aim of the study was to investigate whether anti-rEPO antibodies are associated with hemoglobin concentrations (Hb) and red blood cells counts (RBC) in hemodialysis patients, receiving long-term rEPO therapy. This research was performed at the Research Institute of Nephrology at the First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University.

Thirty-seven hemodialysis patients (pts) with end-stage renal disease and anemia treated with different rEPO formulations were included into the study. The patients were further divided into two groups: those with diminished and normal clinical response to rEPO therapy (DCR, n = 21 vs NCR group, n = 16, respectively).

To determine threshold levels of antibodies to rEPO-beta (Roche, Switzerland) we tested blood serum samples of 35 healthy blood donors who never received rEPO in the past. Concentration of antibodies was measured by means of dot-blot method. The threshold antibody concentrations were defined by measurement of anti-rEPO concentrations in 2-fold stepwise dilutions (1:10 to 1:200) of blood sera from 35 healthy donors. The threshold value for rEPO-binding antibodies was 20.27 µg/ml (95 CI%±0.43). Antibodies to rEPO were found in 54 % of serum samples in the patients. Anti-rEPO antibodies concentrations correlated with mean values of hemoglobin and erythrocyte counts over a period of 12-months for the entire group of hemodialysis patients ($r = -0.368$, $p = 0.025$ and $r = -0.336$, $p = 0.042$ respectively). Concentration of anti-rEPO antibodies, and the mean weekly rEPO dose were significantly higher in DCR group, compared to NCR group ($p = 0.0019$). In conclusion, higher levels of anti-rEPO binding antibodies seem to be associated with decreased therapeutic response to the clinically applied rEPO formulations.

Keywords: erythropoietin, anemia, immunogenicity, antibodies

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (соглашение № 16-15-00118).

Генно-инженерные биологические препараты (ГИБП) представляют собой белковую фармакологическую субстанцию, для синтеза которой используется технология рекомбинантной ДНК [11]. Препараты данной группы обладают свойством иммуногенности — способности ГИБП вызывать иммунный ответ организма к рекомбинантному протеину. Последствием данного ответа может быть синтез антител к ГИБП, которые способны изменять фармакокинетику и фармакодинамику препарата, снижать или полностью блокировать его фармакологическую активность, вызывать аллергическую реакцию, а также перекрестно ингибировать активность эндогенного белка — прообраза генно-инженерной субстанции [14].

Анемия является закономерным симптомом при развитии и прогрессировании дисфункции почек, а один из основных патогенетических факторов связан с развитием относительного дефицита эндогенного эритропоэтина (эЭПО) ренального происхождения [1]. Рекомбинант-

ный человеческий (рЭПО) широко используется с 1989 года для лечения анемии, ассоциированной с хронической болезнью почек (ХБП). Применение рЭПО позволяет существенно повышать качество жизни больных с ренальной анемией за счет улучшения показателей красной крови и резко снижать потребность в гемотрансфузиях. Вместе с тем у 10-34% пациентов с ХБП 5 стадии, длительное время находящихся на гемодиализе и получающих препараты рЭПО, имеется та или иная степень резистентности к проводимой терапии [3, 11]. Клинически резистентность проявляется в виде необходимости применения более высоких доз рЭПО для достижения целевого уровня гемоглобина (110-120 г/л) или невозможностью достижения целевых значений уровня гемоглобина в течение нескольких месяцев, несмотря на проводимую терапию [15].

Рядом исследователей было обнаружено, что у большей части пациентов, долгое время получавших препараты рЭПО, синтезировались антитела (анти-рЭПО) против данного ГИБП [5, 6, 4]. Можно предположить, что анти-рЭПО

антитела способны снижать фармакологическую эффективность рекомбинантного белка. Целью представляемого пилотного исследования была оценка содержания циркулирующих антител к препаратам ЭПО и их вероятных ассоциаций с клиническими проявлениями анемии у пациентов на гемодиализе, получающих лечение препаратами рЭПО.

На базе научно-исследовательского института нефрологии ПСПбГМУ имени акад. И.П. Павлова нами были отобраны 37 пациентов с ХБП 5 стадии, длительное время находящихся на гемодиализе и получающих различные типы препаратов рЭПО. Все пациенты в исследовании в тот или иной промежуток времени получали рЭПО-бета. Все пациенты подписали информированное согласие. Данное исследование было одобрено локальным этическим комитетом (ЛЭК). Анализировали следующие клинические данные: длительность терапии ЭПО, среднее количество эритроцитов за 12 месяцев, среднее значение гемоглобина за 12 месяцев, среднее количество тромбоцитов за 12 месяцев, среднее количество ретикулоцитов за 12 месяцев, средняя концентрация С-реактивного белка (СРБ) за год, среднее количество ферритина за 12 месяцев, концентрация антител к рЭПО-бета.

Для сравнительного анализа все пациенты были разделены на две группы по типу ответа на лечение рЭПО: группа со сниженным ответом на терапию (СОТ), который определяли как при среднем уровне гемоглобина за год < 110 г/л ($Hb < 110$ г/л) – 21 пациент; вторая группу – 16 пациентов, у которых средний уровень гемоглобина за год был более 110 г/л ($Hb \geq 110$ г/л). – группа с нормальным ответом на терапию (НОТ). Иммунологическим контролем послужила группа здоровых доноров, никогда не получавших препараты ЭПО ($n = 35$).

Концентрация антител была измерена с помощью методики дот-блоттинга, в которой препарат рЭПО-бета (Roche, Швейцария) в концентрации 1 мг/мл инкубировали на нитроцеллюлозной подкладке, после чего отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) от излишка белка и блокировали буфером, содержащим 1% альбумин и 1% Tween 20. Затем сыворотку крови пациентов в разведении 1/100 инкубировали с мембраной, содержащей рЭПО, а после отмывания в ФСБ – с анти-Fc античеловеческими иммуноглобулинами типа G, меченных щелочной фосфатазой. Цветная реакция с использованием хромогена BCIP-NCT позволяла определить концентрацию связавшихся с рЭПО антител. Учет реакции проводили в условных единицах оптической плотности (ОП) путем денситометрии окрашенных участков мембраны. Для расчета точной концентрации антител была построена кривая разведений чистого IgG. Подготовка и окраска мембраны с чистым IgG проводили по протоколу, описанному выше. Используя формулу экс-

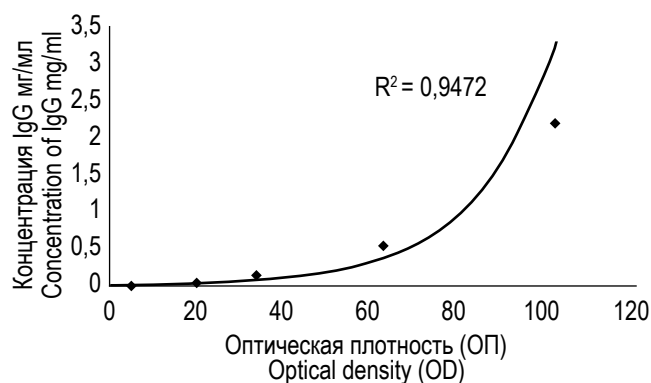


Рисунок 1. Кривая пошагового разведения IgG

Figure 1. Stepwise dilution curve for IgG

поненциальной кривой графика разведения иммуноглобулинов ($y = 0,0115e^{0,0554x}$), у каждого пациента рассчитывали концентрацию антител к эритропоэтину (мкг/мл) (рис. 1).

Порог нормы и уровень разведения сывороток был определен путем измерения концентрации антител в серии пошаговых разведений (от 1:10 до 1:200) в сыворотках крови 35 доноров. Референтное значение ОП составило 20,27 мкг/мл ($95\text{ CI}\% \pm 0,43$). Из 37 пациентов с ХБП, получавших препараты рЭПО, у 20 (54,05%) концентрация антител к рЭПО была выше установленных нормальных значений. Обнаружена статистически значимая обратная корреляция между концентрацией анти-рЭПО и средними уровнями гемоглобина и эритроцитов за 12 месяцев ($r = -0,368$, $p = 0,025$ и $r = -0,336$, $p = 0,042$ соответственно) (рис. 2А, Б). У пациентов группы СОТ концентрация антител к рЭПО и средние дозы рЭПО, применявшиеся в течение 1 года, были достоверно выше по сравнению с группой НОТ. Причем обе группы были сопоставимы по полу, возрасту, концентрации ферритина и С-реактивного белка (рис. 3, табл. 1).

В основе механизмов синтеза антител к рЭПО лежит комплексный процесс, затрагивающий сегменты как врожденного, так и адаптивного иммунитета [2]. Основными причинами появления данных антител называют возможные различия в первичной, вторичной, третичной или четвертичной структуре лекарственного препарата и белка природного аналога, посттрансляционные изменения рекомбинантного препарата, формулировку лекарственного препарата – состав буфера, форма выпуска, наличие различных примесей (частицы силикона, кремния, мицеллы, белки экспрессионной линии), поверхности, с которыми соприкасается раствор с препаратом (силиконовое масло, выщелачиватели), использование альбумина в качестве эксипиента, образование высокомолекулярных агрегатов, подкожный путь введения рЭПО [3, 13].

Распространенность антител к препаратам рЭПО в рассмотренной нами группе сопоставима с данными, полученными рядом других авторов:

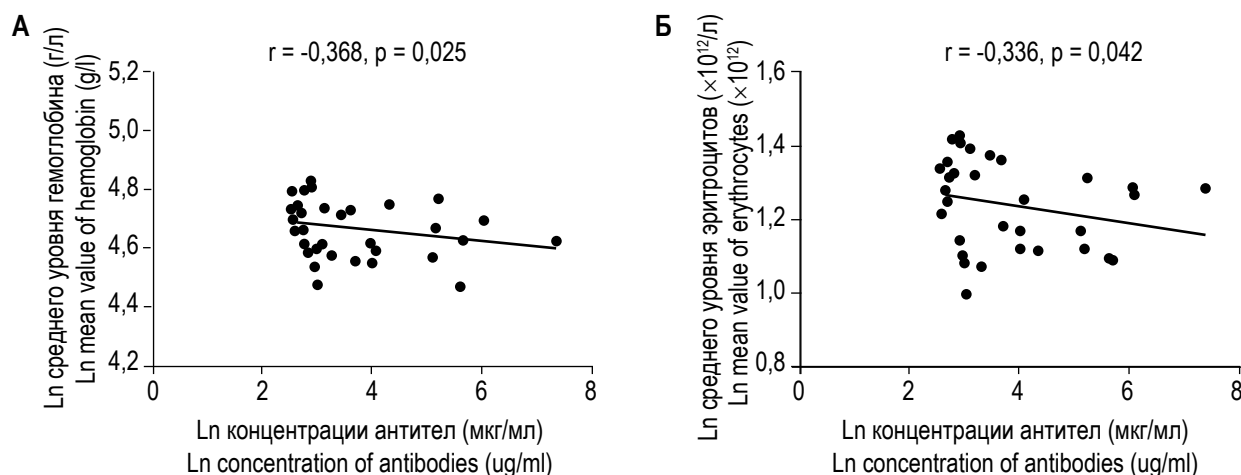


Рисунок 2. Взаимосвязи концентрации антител к рЭПО, средних значений гемоглобина (А) и эритроцитов (Б)

Figure 2. Correlations between anti-rEPO antibody concentrations, mean hemoglobin (A) and erythrocyte (B) levels

доля пациентов, положительных на анти-рЭПО, варьировала от 38,9 до 67% [6, 8]. Напротив, некоторые данные указывают на низкую распространенность анти-рЭПО антител у пациентов с ХБП, получавших гемодиализ (1,11%), что, возможно, объясняется гетерогенностью групп пациентов, этиологией ХБП, различиями в методике определения титра анти-рЭПО антител [5].

Полученные данные о более высокой концентрации анти-рЭПО в группе пациентов СОТ и обратной связи между их концентрацией и средними значениями гемоглобина и эритроцитов могут косвенно указывать на влияние этих иммуноглобулинов на терапевтическую активность стимулирующих гемопоэз препаратов. Теоретически связывающие антитела могут изменять фармакокинетику препаратов эритропоэтина, ускоряя клиренс лекарственного средства и его разрушение клетками моноцитарного роста, что было ранее показано для других ГИБП, таких как моноклональные терапевтические ан-

тител [7]. Редким, но угрожающим осложнением терапии рЭПО является парциальная красноклеточная аплазия костного мозга (ПККА), которая вызывается нейтрализующими анти-рЭПО, нарушающими связывание рЭПО и эндогенного эритропоэтина со своим рецептором [9, 10]. Не исключено, что общий пул выявляемых связывающих антител может содержать небольшое количество иммуноглобулинов с нейтрализующей активностью, недостаточное для развития ПККА, но приводящее к снижению эффективности терапии рЭПО и необходимости повышения доз последнего.

У пациентов группы СОТ средняя доза препаратов была значительно выше, чем у пациентов с нормальным уровнем гемоглобина ($p = 0,0059$). Это позволяет предположить снижение костномозгового ответа на рЭПО в присутствии анти-рЭПО. С другой стороны, увеличение количеств вводимого рЭПО, а, следовательно, и антигенной нагрузки может быть дополнительным фактором стимуляции образования анти-рЭПО антител.

Полученные нами данные о взаимосвязи концентрации антител к рЭПО и лабораторных маркеров анемии подтверждают наблюдения Howman и Kulkarni (2007), которые обнаружили, что концентрация антител к препаратам рЭПО обратно коррелирует с уровнем гемоглобина и эритроцитов ($r = -0,341$, $r = -0,280$ соответственно) [10]. Несмотря на это, существует ряд работ, которые не смогли найти статистически значимых различий между уровнем анти-рЭПО антител у пациентов с нормальным и сниженным ответом на терапию [12]. Вероятными объяснениями могут быть особенности использованных методов детекции анти-рЭПО и гетерогенностью пациентов в относительно небольших по объему выборках.

Таким образом, полученные данные указывают на значительную частоту выявления анти-рЭПО и их ассоциацию со снижением терапевтической эффективности препаратов рЭПО.

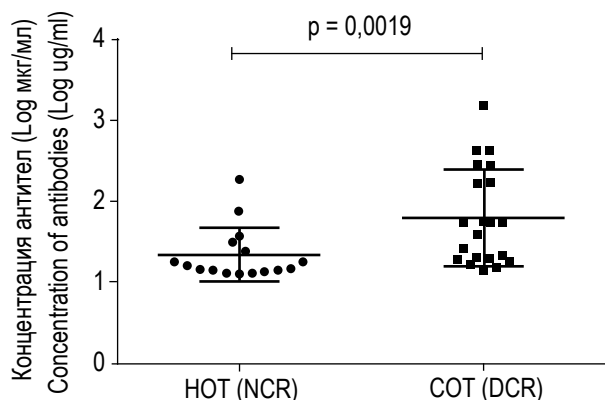


Рисунок 3. Концентрация антител к препаратам рЭПО у пациентов группы СОТ и НОТ. СОТ – сниженный ответ на терапию ($Hb < 110$ г/л); НОТ – нормальный ответ на терапию ($Hb \geq 110$ г/л)

Figure 3. Concentrations of anti-rEPO antibodies in the patients from low-responding (COT) and normally-responding groups (HOT)

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ГРУППАХ ПАЦИЕНТОВ С НОРМАЛЬНЫМ И СНИЖЕННЫМ ОТВЕТОМ НА рЭПО

TABLE 1. COMPARATIVE ANALYSIS OF CLINICAL AND LABORATORY DATA FOR THE GROUPS WITH NORMAL RESPONSE TO ERYTHROPOIETIN THERAPY AND DECREASED RESPONSE TO ERYTHROPOIETIN THERAPY

Параметры Parameters	Исследуемые группы Groups under study		P
	СОТ (n = 21) Normal response to erythropoietin therapy	НОТ (n = 16) Decreased response to erythropoietin therapy	
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	99,0±6,0	115,0±4,4	< 0,001
Длительность терапии гемодиализом (месяцы) Hemodialysis terms (months)	46,0 (24,0;88,0)	56,5 (48,5; 140,5)	НД n/a
Средняя доза ЭПО за год (МЕ) Mean doses of erythropoietin per year (ME)	9330,0±4322,0	6000,0±1570,0	0,017
Среднее количество эритроцитов в анализе крови в течение года ($\times 10^{12}/л$) Mean erythrocyte counts per year ($\times 10^{12}/L$)	3,3±0,3	3,7±0,3	< 0,001
Среднее количество тромбоцитов в анализе крови в течение года ($\times 10^9/л$) Mean platelet counts per year ($\times 10^9/L$)	238,0±94,0	219,0±45,0	НД n/a
Среднее количество ретикулоцитов в анализе крови в течение года (%) Mean reticulocyte counts per year (%)	1,5 (1,2; 1,6)	1,4 (1,2; 1,6)	НД n/a
Средний уровень ферритина в анализе крови в течение года (мкг/л) Mean concentration of serum ferritin per year ($\mu g/L$)	322,1 (66,5; 499,4)	200,6 (74,5; 332,5)	НД n/a
Средняя концентрация антител к препаратам ЭПО (мкг/мл) Mean concentration of antibodies to erythropoietin ($\mu g/ml$)	54,3 (19,4; 222,0)	15,4 (13,6; 29,7)	0,002
Средний уровень СРБ в анализе крови в течение года (мг/л) Mean concentration of C-reactive protein per year (mg/L)	5,6 (2,9; 11,9)	5,45 (3,3; 15,5)	НД n/a

Список литературы / References

1. Добронравов В.А., Смирнов А.В., Безруких А.М., Быстрова Н.Н., Дроздова Ю.В., Орлова С.А. Анемия и преддиализные стадии хронической болезни почек: клиническое значение, распространенность и факторы риска // Нефрология, 2006. Т. 10, № 3. С. 7-13. [Dobronravov V.A., Smirnov A.V., Bezrukikh A.M., Byistrova N.N., Drozdova Yu.V., Orlova S.A. Anemia and pre-dialysis stages of chronic kidney disease: clinical significance, incidence and risk factors. *Nefrologiya = Nephrology*, 2006, Vol. 10, no. 3, pp. 7-13. (In Russ.)]
2. Лапин С.В., Тотолян А.А. Иммунологическая диагностика поражений почек при васкулитах // Нефрология, 2003. Т. 7, № 1. С. 109-119. [Lapin S.V., Totolian A.A. Immunological diagnosis of lesions to the kidneys with vasculites. *Nefrologiya = Nephrology*, 2003, Vol. 7, no. 1, pp. 109-119. (In Russ.)]
3. Назаров В.Д., Лапин С.В., Мазинг А.В., Евдошенко Е.П., Тотолян А.А. Проблема иммуногенности генно-инженерных лекарственных препаратов интерферона-бета // Биохимия, 2016. Т. 81, вып. 11. С. 1658-1664. [Nazarov V.D., Lapin S.V., Mazing A.V., Evdoshenko E.P., Totolian A.A. Immunogenicity of human recombinant interferon-beta. *Biohimiya = Biochemistry*, 2016, Vol. 81, Iss. 11, pp. 1658-1664. (In Russ.)]
4. Alqahwaji D.B., Shubair M.E., Sirdah M. Detection of anti-erythropoietin antibodies among hemodialyzed patients treated with recombinant human-erythropoietin. *Sky Journal of Medicines and Medical Sciences*, 2014, Vol. 2, no. 4, pp. 016-020.
5. Alves M.D., Simone S. Resistance of dialyzed patients to erythropoietin. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 2015, Vol. 37, no. 3, pp. 190-197.
6. Castelli G., Famularo A., Semino C., Machi A.M., Ceci A., Cannella G., Melioli G. Detection of anti-erythropoietin antibodies in haemodialysis patients treated with recombinant human-erythropoietin. *Pharmacological Research*, 2000, Vol. 41, no. 3, pp. 313-318.
7. Colombel J.F., Feagan B.G., Sandborn W.J., van Assche G., Robinson A.M. Therapeutic Drug monitoring of biologics for inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2012, Vol. 18, no. 2, pp. 349-358.
8. El-Din M., Attia F., Labib S., Omar W. Detection of circulating antierythropoietin antibodies in patients with end stage renal disease on regular hemodialysis. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2010, Vol. 32, no. 3, pp. 336-343.
9. Howman R., Kulkarni H. Antibody-mediated acquired pure red cell aplasia (PRCA) after treatment with darbepoetin. *Nephrol. Dial. Transplant.*, Vol. 22, no. 5, pp. 1462-1464.

10. Praditpornsilpa K., Tiranathanagul K., Kupatawintu P., Jootar S., Intragumtornchai T., Tungsanga K., Teerapornlertratt T., Lumlertkul D., Townamchai N., Susantitaphong P., Katavetin P., Kanjanabuch T., Avihingsanon Y., Eiam-Ong S. Biosimilar recombinant human erythropoietin induces the production of neutralizing antibodies. *Kidney Int.*, 2011, Vol. 80, no. 1, pp. 88-92.
11. Rader R. Redefining biopharmaceutical. *Nat. Biotechnol.*, 2008, Vol. 26, no. 7, pp. 743-751.
12. Öztürk S., Gümüş A., Memili V., Düz M.E., Cebeci E., Koldaş M., Kazancıoğlu R. Antierythropoietin antibodies in hemodialysis patients treated with recombinant erythropoietin. *The Turkish Nephrology, Dialysis and Transplantation Journal*, 2014, Vol. 23, no. 2, pp. 125-130.
13. van Beers M.M.C., Bardor M. Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. *Biotechnol. J.*, 2012, Vol. 7, pp. 1473-1484.
14. Wadhwa M., Knezevic I., Kang H.N., Thorpe R. Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: An overview of assays and their utility. *Biologicals*, 2015, Vol. 43, no. 5, pp. 298-306.
15. Zoccali C., Abramowicz D., Cannata-Andia J.B., Cochat P., Covic A., Eckardt K.U., Fouque D., Heimbürger O., McLeod A., Lindley E., Locatelli F., Spasovski G., Tattersall J., van Biesen W., Wanner C., Vanholder R. European Best Practice Guidelines; European Renal Best Practice. European best practice quo vadis? From European best practice guidelines (EBPG) to European renal best practice (ERBP). *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2008, Vol. 23, no. 7, pp. 2162-2166.

Авторы:

Назаров В.Д. — сотрудник лаборатории диагностик и аутоиммунных заболеваний, Научно-методический центр по молекулярной медицине Министерства здравоохранения РФ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лапин С.В. — к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний, Научно-методический центр по молекулярной медицине Министерства здравоохранения РФ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Добронравов В.Д. — д.м.н., профессор, заместитель директора по науке, Научно-исследовательский институт нефрологии Министерства здравоохранения РФ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Смирнов К.А. — сотрудник, Научно-исследовательский институт нефрологии Министерства здравоохранения РФ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Майер Д.А. — сотрудник, Научно-исследовательский институт нефрологии Министерства здравоохранения РФ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Мужежская Т.О. — сотрудник, Научно-исследовательский институт нефрологии Министерства здравоохранения РФ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор, Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; заведующий кафедрой иммунологии, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Nazarov V.D., Research Associate, Laboratory of Autoimmune Diagnostics, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lapin S.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Autoimmune Diagnostics, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Dobronravov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director, Research Institute of Nephrology, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Smirnov K.A., Research Associate, Research Institute of Nephrology, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Mayer D.A., Research Associate, Research Institute of Nephrology, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Muzhetskaya T.O., Research Associate, Research Institute of Nephrology, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 30.06.2017
Отправлена на доработку 13.07.2017
Принята к печати 29.09.2017

Received 30.06.2017
Revision received 13.07.2017
Accepted 29.09.2017

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ГЕНЕЗА

Смирнова О.В.^{1,2}, Цуканов В.В.¹, Титова Н.М.², Губанов Б.Г.¹

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

² ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Резюме. Механическая желтуха (МЖ) злокачественного генеза — это клинический синдром, обусловленный обтурацией желчевыводящих путей в результате злокачественного опухолевого роста и характеризующийся специфическим окрашиванием кожных покровов, слизистых оболочек и склер, из-за повышенного накопления билирубина в сыворотке крови и в других жидкостях и тканях организма. У больных механической желтухой выявляются различные иммунные нарушения. На иммунную реактивность организма при механической желтухе воздействуют токсический, инфекционный, опухолевый факторы. В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение содержания некоторых провоспалительных (IL-2, IL-18, TNF α , IFN γ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов у больных МЖ злокачественного генеза в зависимости от уровня билирубина. В исследование были включены 50 больных МЖ злокачественного генеза. Контрольная группа, состоящая из 125 практически здоровых добровольцев, сопоставима по полу и возрасту с группой изучения. Содержание цитокинов в сыворотке крови больных и здоровых лиц определяли иммуноферментным анализом с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест». Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica for Windows 8.0 и Microsoft Excel.

В группе больных механической желтухой злокачественного генеза до операции были увеличены параметры IL-2, TNF α , IFN γ и IL-18, снижены значения IL-4 и IL-10 по сравнению с практически здоровыми людьми. У больных МЖ злокачественного генеза выявляются особенности цитокиновой регуляции в виде увеличения провоспалительных и иммуностимулирующих цитокинов и снижения противовоспалительных цитокинов. Установлен приоритетный характер иммунного реагирования с учетом уровня цитокинов в сыворотке крови у больных МЖ злокачественного генеза в виде преобладания Th1-иммунного ответа. Особенности цитокиновой регуляции больных МЖ злокачественного генеза зависят от содержания билирубина в крови. Наибольшее количество изменений выявлялось у больных с уровнем билирубина более 60 мкмоль/л. В целом показатели цитокинов односторонне изменялись в группах больных МЖ с различным уровнем билирубина, кроме IL-10. Данный параметр практически в 6 раз увеличивался в группе больных МЖ с уровнем билирубина менее 60 мкмоль/л относительно контрольной группы и приблизительно в 40 раз относительно оставшихся 2 групп, данное биологическое действие, вероятно, обусловлено злокачественной этиологией МЖ.

Ключевые слова: цитокины, иммуноферментный анализ, механическая желтуха

Адрес для переписки:

Смирнова Ольга Валентиновна
Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера
660062, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Address for correspondence:

Smirnova Olga V.
Research Institute of Medical Problems in the North
660062, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partisan Zheleznyak str., 3g.
Phone: 7 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Смирнова, В.В. Цуканов, Н.М. Титова, Б.Г. Губанов «Особенности цитокиновой регуляции у больных механической желтухой злокачественного генеза» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 135–140. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-135-144
© Смирнова О.В. и соавт., 2018

For citation:

O.V. Smirnova, V.V. Tsukanov, N.M. Titova, B.G. Gubanov "Features of cytokine regulation in patients with mechanical jaundice of malignant genesis", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 135–140. doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-135-144
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-135-144

FEATURES OF CYTOKINE REGULATION IN PATIENTS WITH MECHANICAL JAUNDICE OF MALIGNANT GENESIS

Smirnova O.V.^{a,b}, Tsukanov V.V.^a, Titova N.M.^b, Gubanov B.G.^a

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

^b Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Mechanical jaundice (MJ) of malignant genesis is a clinical syndrome caused by obturation of bile ducts due to malignant tumor growth. It is characterized by specific pigmentation of skin, mucous membranes and sclerae due to increased accumulation of bilirubin in blood serum and other fluids and tissues of the organism. Various immune disorders are detected in patients with mechanical jaundice. Immune reactivity in mechanical jaundice is affected by toxic, infectious, or tumor factors. In connection with these findings, the aim of our study was to measure levels of some pro-inflammatory (IL-2, IL-18, TNF α , IFN γ) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines in patients with malignant disease, depending on serum bilirubin levels. The study included 50 patients with MJ by malignant origin. A control group consisted of 125 practically healthy volunteers comparable with the study group by sex and age. Blood serum cytokine contents in patients and controls was determined by enzyme immunoassay using reagent kits produced by ZAO Vector-Best. Statistical evaluation of data was carried out by means of Statistica for Windows 8.0 and Microsoft Excel software.

The levels of IL-2, TNF α , IFN γ and IL-18 were increased before surgery in the patients with mechanical jaundice of malignant genesis, while IL-4 and IL-10 values were reduced in comparison with healthy controls. Altered cytokine regulation in the MJ group manifests as increase in proinflammatory and immunostimulatory cytokine levels, along with decrease in anti-inflammatory cytokine amounts. Predominant feature of immune response may be regarded as prevalence of Th1-immune response when taking into account cytokine levels in blood serum of patients with MJ of malignant genesis. The features of cytokine regulation of patients with malignant MJ depend on the bilirubin content in blood serum. These changes were most frequent in patients with bilirubin level exceeding 60 $\mu\text{mol/L}$. In general, the quantitative indices of cytokines exhibited unidirectional changes in the groups of MJ patients with different bilirubin levels, except of IL-10. This parameter showed almost 6-fold increase in MJ patients with bilirubin level < 60 $\mu\text{mol/L}$ against control group, and approximately 40 times with respect to the remaining 2 groups. This biological effect may occur due to malignant etiology of the MJ.

Keywords: cytokines, enzyme immunoassay, mechanical jaundice

Введение

Механическая желтуха (МЖ) — это клинический синдром, обусловленный обтурацией желчевыводящих путей и характеризующийся специфическим окрашиванием кожных покровов, слизистых оболочек и склер, из-за повышенного накопления билирубина в сыворотке крови и в других жидкостях и тканях организма [1, 4, 9]. Частота развития данного состояния при злокачественных поражениях колеблется от 36,6 до 47,0%. Наиболее частой причиной механической желтухи злокачественного генеза являются рак печеночных и общего желчного протоков, рак БДС, рак головки поджелудочной железы, метастазы лимфомы в воротах печени [6, 7]. В зависимости от уровня общего билирубина, общего белка сыворотки крови, наличия осложнений и «опухолевого» фактора Э.И. Гальперин и соавт. разработали классификацию тяжести механической желтухи [3]. При механической желтухе на иммунную реактивность организма воздействуют токсический, инфекционный, опухолевый факторы [2]. По данным литературы, у больных МЖ выявляются разнообразные иммунные нарушения [5, 10, 11, 12, 13]. В связи с этим

целью нашего исследования явилось изучение содержания некоторых провоспалительных (IL-2, IL-18, TNF α , IFN γ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов у больных МЖ злокачественного генеза в зависимости от уровня билирубина.

Материалы и методы

В исследование были включены 50 больных МЖ злокачественного генеза. Контрольная группа, состоящая из 125 практически здоровых добровольцев, сопоставима по полу и возрасту с группой изучения. Обследование больных и практически здоровых людей проводилось с разрешения этического комитета НИИ МПС, при этом каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование. В работе с обследованными пациентами соблюдались этические принципы, предъявляемые ст. 24 Конституции РФ и Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации.

Содержание цитокинов (IL-2, IL-4, IL-10, IL-18, TNF α , IFN γ) в сыворотке крови больных и здоровых лиц определяли иммуноферментным анализом с использованием наборов реагентов

производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). По результатам исследования на персональном компьютере в пакете электронных таблиц MS Excel 2010 была сформирована база данных. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008) и Microsoft Excel, 2007 (Microsoft, США). Обработка полученных данных включала подсчет непараметрических данных: медиану (Me) и персентили ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Статистическую значимость различий определяли с использованием рангового критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным $p < 0,05$.

Результаты

Цитокины — разнообразная группа небольших по размерам медиаторов белковой природы — молекул-посредников, участвующих в межклеточной передаче сигналов преимущественно в иммунной системе. В зависимости от функции выделяют различные группы цитокинов [8].

IL-2 — иммуностимулирующий цитокин, вырабатывается Т-лимфоцитами, стимулирует их пролиферацию и дифференцировку, увеличивает цитолитическую активность NK-клеток, способствует пролиферации В-лимфоцитов и секреции иммуноглобулинов.

К провоспалительным цитокинам относят IL-18, фактор некроза опухоли альфа, интерферон-гамма. IL-18 вырабатывается большим количеством клеток (моноцитами, макрофагами, дендритными клетками, Т- и В-лимфоцитами, остеобластами, эпидермальными кератиноцитами, эпителиальными клетками, астроцитами, клетками микроглии), способствует активации NK-клеток, является фактором роста и дифференцировки Th1-клеток, повышает активность В-лимфоцитов, увеличивает противоопухолевую реактивность организма. IL-18 является медиатором ангиогенеза, стимулирует продукцию GM-CSF и ингибирует образование остеокластов. TNF α производится макрофагами, моноцитами, эндотелиоцитами, тучными клетками, клетками нейроглии, миелоидными клетками, активированными Т-лимфоцитами, лимфокин-активируемыми NK-клетками. Синтез и секреция TNF α индуцируется продуктами бактериального происхождения. Цитокин активирует фагоцитирующие клетки, участвует в реализации цитотоксических эффектов NK-клеток, индуцирует апоптоз опухолевых и вирус-инфицированных клеток, усиливает экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках, макрофагах, нейтрофилах, повышает синтез простагландин-ов, обуславливает синтез белков острой фазы, являясь хемоаттрактантом для клеток иммунной

системы. Усиливает ангиогенез. Будучи кофактором ростовых цитокинов, участвует в развитии иммунного ответа, усиливает антителообразование в ответ на тимусзависимые антигены, снижает величину эритро-, миело- и лимфопоэза. Интерферон- γ производится Т-лимфоцитами, NK-клетками и лимфоцитами для активации Th1-клеток, В-лимфоцитов, индуцирует синтез МНС I и II класса, обладает противоопухолевой активностью. Цитокин стимулирует иммунную цитотоксичность, усиливая макрофагальный киллинг, имеет антивирусную активность [8].

IL-4, IL-10 — противовоспалительные цитокины. IL-4 вырабатывается Th2-лимфоцитами, тучными клетками, базофилами, В-лимфоцитами, стромальными клетками. Цитокин индуцирует дифференцировку Т-лимфоцитов в Th2-клетки, подавляя развитие Th1-лимфоцитов. Стимулирует пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов, способствуя продукции IgE В-лимфоцитами. Активирует макрофаги, тучные клетки, индуцирует продукцию иммуноглобулинов отдельных классов, вызывает пролиферацию тимоцитов и активированных зрелых Т-клеток, подавляет функцию макрофагов и выработку ими IL-1, TNF и IL-6, вызывая противовоспалительное действие, стимулирует гемопоэз. IL-10 производится Th2-лимфоцитами, цитотоксическими Т-лимфоцитами и моноцитами. Подавляет синтез цитокинов Th1-лимфоцитами, снижает активность макрофагов и пролиферацию Т-клеток. Выступает в качестве кофактора IL-2 и IL-7 в отношении пролиферации тимоцитов, служит синергистом IL-4. Усиливает пролиферацию В-лимфоцитов, защищает их от апоптоза, повышает синтез IgM и IgA, стимулируя противопаразитарную защиту и аллергическую реактивность организма [8].

В группе больных механической желтухой злокачественного генеза содержание IL-2, IFN γ , IL-18 и TNF α было повышено по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

У всех больных МЖ показатели IL-4 и IL-10 были снижены по сравнению с контрольной группой.

Все больные механической желтухой злокачественного генеза были разделены на 3 подгруппы в зависимости от уровня билирубина в сыворотке крови: 13 больных с билирубином менее 60 мкмоль/л, 20 пациентов с уровнем билирубина 60–200 мкмоль/л и 17 больных с содержанием билирубина более 200 мкмоль/л (табл. 2).

У больных механической желтухой злокачественного генеза вне зависимости от уровня билирубина было увеличено содержание IL-2, IL-18 по сравнению с практически здоровыми людьми.

У больных МЖ с уровнем билирубина менее 60 мкмоль/л выявлялось статистически значимое увеличение, а при уровне билирубина 60–

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ У БОЛЬНЫХ МЖ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ГЕНЕЗА (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONTENTS OF SOME CYTOKINES IN THE BLOOD IN PATIENTS WITH MJ OF MALIGNANT GENESIS (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Контрольная группа Control group n = 125		Больные МЖ злокачественного генеза Patients with MJ of malignant genesis n = 50	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
IL-2, пг/мл IL-2, pg/mL	1,1	0,5-3,05	8	5,18-11,25
	p = 0,01×10 ⁻¹³			
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	0,54	0,38-0,88	14,1	6,15-80,05
	p = 0,00001			
IFNγ, пг/мл IFNγ, pg/mL	0,6	0,22-4,0	6,5	3,15-21,88
	p = 0,01			
IL-18, пг/мл IL-18, pg/mL	1,6	0,1-2,1	82,2	71-173,9
	p = 0,04×10 ⁻¹⁰			
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	2,15	0,6-4,8	0,4	0-3,55
	p = 0,03			
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	14,8	8,65-26,85	3,5	1-6,65
	p = 0,0003			

200 мкмоль/л и более 200 мкмоль/л – снижение IL-10. У больных МЖ с уровнем билирубина 60-200 мкмоль/л и более 200 мкмоль/л отмечается статистически значимое снижение IL-4 по сравнению с контрольной группой.

В группе больных механической желтухой злокачественного генеза перед операцией с уровнем билирубина в крови менее 60 мкмоль/л были увеличены значения IL-2, IL-10 и IL-18 по сравнению с контрольной группой.

В группе больных механической желтухой злокачественного генеза с уровнем билирубина в крови 60-200 мкмоль/л были повышены концентрации IL-2 и IL-18, снижены IL-4 и IL-10 относительно здоровых людей.

В группе больных механической желтухой злокачественного генеза с уровнем билирубина в крови свыше 200 мкмоль/л были увеличены параметры IL-2 и IL-18, снижены уровни IL-4 и IL-10 по сравнению с контрольной группой, а последний показатель у относительно больных с уровнем билирубина в крови – 60-200 мкмоль/л.

Обсуждение

В группе больных механической желтухой злокачественного генеза до операции были увеличены параметры IL-2, TNFα, IFNγ и IL-18, снижены значения IL-4 и IL-10 по сравнению с практически здоровыми людьми. Таким образом, у больных МЖ злокачественного генеза выявляются особенности цитокиновой регуляции в виде увеличения провоспалительных и иммуностимулирующих цитокинов и снижения

противовоспалительных цитокинов. Установлен приоритетный характер иммунного реагирования с учетом уровня цитокинов в сыворотке крови у больных МЖ злокачественного генеза в виде преобладания Th1-иммунного ответа.

Особенности цитокиновой регуляции больных МЖ злокачественного генеза зависят от содержания билирубина в крови. Наибольшее количество изменений выявлялось у больных с уровнем билирубина 60-200 мкмоль/л и более 200 мкмоль/л, следовательно, токсическое действие билирубина начинается с содержания 60 мкмоль/л. В целом показатели цитокинов однонаправленно изменялись в группах больных МЖ с различным уровнем билирубина, кроме IL-10. Данный параметр практически в 6 раз увеличивался в группе больных МЖ с уровнем билирубина менее 60 мкмоль/л относительно контрольной группы и приблизительно в 40 раз относительно оставшихся 2 групп. В такой большой концентрации IL-10 подавлял синтез цитокинов Th1-лимфоцитами, снижал активность макрофагов и пролиферацию Т-клеток, вероятно, данное биологическое действие связано со злокачественным «опухолевым» фактором при данной МЖ. Учитывая однонаправленные изменения в цитокинах у больных МЖ злокачественного генеза с уровнем билирубина 60-200 мкмоль/л и более 200 мкмоль/л, а именно – повышение провоспалительных и снижение противовоспалительных цитокинов, можно заключить, что в данном случае действие «опухолевого» фактора значительно усиливается токсическим и инфекционным агентами [14].

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ ПЕРЕД ОПЕРАЦИЕЙ У БОЛЬНЫХ МЖ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ГЕНЕЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ БИЛИРУБИНА (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CONTENTS OF SOME CYTOKINES IN BLOOD SERUM BEFORE SURGERY IN PATIENTS WITH MJ OF MALIGNANT GENESIS, DEPENDING ON BILIRUBIN LEVELS (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Контрольная группа Control group n = 125		Больные МЖ с уровнем билирубина менее 60 мкмоль/л Patients with MJ with a bilirubin level less than 60 μmol/l n = 13		Больные МЖ с уровнем билирубина 60-200 мкмоль/л Patients with MJ with a bilirubin level of 60-200 μmol/l n = 20		Больные МЖ с уровнем билирубина более 200 мкмоль/л Patients with MJ with a bilirubin level more than 200 μmol/l n = 17	
	1		2		3		4	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
IL-2, пг/мл IL-2, pg/mL	1,1	0,5-3,05	8,6	8,3-13,2	8,95	5,18-15,75	7,2	4,4-8,9
			p ₁₋₂ = 0,000006		p ₁₋₃ = 0,02×10 ⁻¹¹		p ₁₋₄ = 0,09×10 ⁻¹¹	
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	0,54	0,38-0,88	43,1	23,5-62,7	8,3	3,1-101,7	14,3	10,7-53,7
IFNγ, пг/мл IFNγ, pg/mL	0,6	0,22-4,0	28,55	19,4-37,6	4,3	2,4-6,5	6	4,55-10,8
IL-18, пг/мл IL-18, pg/mL	1,6	0,1-2,1	122,9	96,95-148,85	77,3	56,3-177,6	89,1	80,35-157,85
			p ₁₋₂ = 0,003		p ₁₋₃ = 0,07×10 ⁻⁷		p ₁₋₄ = 0,000002	
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	2,15	0,6-4,8	0	0-1,15	1,9	0-4,4	0,1	0-3,5
					p ₁₋₃ = 0,001		p ₁₋₄ = 0,00003	
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	14,8	8,65-26,85	98,2	51,2-145,2	4,7	1,7-7,45	2,2	1-4,93
			p ₁₋₂ = 0,01		p ₁₋₃ = 0,005		p ₁₋₄ = 0,0001, p ₃₋₄ = 0,03	

Список литературы / References

- Александров Л.В., Ачкасов Е.Е., Негребова М.Г. Нарушение трофического статуса и его коррекция у больных с механической желтухой, обусловленной желчнокаменной болезнью // Московский хирургический журнал, 2010. №1. С. 27-31. [Alexandrov L.V., Achkasov E.E., Negreba M.G. Violation of trophic status and its correction in patients with obstructive jaundice caused by gallstone disease. *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal = Moscow Surgical Journal*, 2010, no. 1, pp. 27-31. (In Russ.)]
- Баширов А.Б., Алибеков А.Е. Иммунокоррекция при хирургическом лечении механической желтухи // Сборник тезисов докладов III конгресса ассоциации хирургов им. Н.И. Пирогова. М., 2006. С. 181-182. [Bashirov A.B., Alibekov A.E. Immunotherapy in the surgical treatment of obstructive jaundice. *Sbornik tezisev dokladov III kongressa assotsiatsii khirurgov im. N.I. Pirogova = Abstracts of the III Congress of the N.I. Pirogov Association of Surgeons*. Moscow, 2006, pp. 181-182.]
- Гальперин Э.И., Момунова О.Н. Классификация тяжести механической желтухи // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова, 2013. № 1. С. 5-9. Galperin E.I., Momunova O.N. Classification of severity of jaundice. *Hirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova = Surgery, N.I. Pirogov Journal*, 2013, no. 1, pp. 5-9. (In Russ.)]
- Герасимов А.В., Розен В.В., Давыдова О.В. Результаты применения чрескожных чреспеченочных вмешательств у больных механической желтухой и холангитом // Бюллетень медицинских интернет-конференций, 2013. Т. 3, № 3. С. 505-506. [Gerasimov A.V., Rozen V.V., Davydov O.V. Results of percutaneous intrahepatic interventions in patients with obstructive jaundice and cholangitis. *Byulleten meditsinskikh internet-konferentsiy = Bulletin of Medical Internet Conferences*, 2013, Vol. 3, no. 3, pp. 505-506. (In Russ.)]
- Гивировская Н.Е., Ступин В.А., Лаптев В.В., Цкаев А.Ю. Изменения и коррекция показателей иммунной системы при механической желтухе доброкачественного генеза // Анналы хирургической гепатологии, 2008. № 2. С. 69-75. [Givirovskaya N.E., Stupin V.A., Laptev V.V., Tskaev A.Yu. The changes and correction of immune system in the genesis of benign obstructive jaundice. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of Surgical Hepatology*, 2008, no. 2, pp. 69-75. (In Russ.)]
- Кубачев К.Г., Борисов А.Е., Кочнев В.В. Осложненный рак панкреатодуоденальной зоны // Анналы хирургической гепатологии, 2007. Т. 12, № 3. С. 80-81. [Kubachev K.G., Borisov A.E., Kochnev V.V. Complicated cancer of pancreatoduodenal zone. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of Surgical Hepatology*, 2007, Vol. 12, no. 3, pp. 80-81. (In Russ.)]

7. Кубышкин В.А., Щеголев А.И., Балукова О.В., Кочатков А.В. Отдаленные результаты лечения протоковой аденокарциномы головки поджелудочной железы: факторы, влияющие на прогноз течения заболевания // *Анналы хирургической гепатологии*, 2004. Т. 9, № 1. С. 129-134. [Kubyshkin V.A., Shchegolev A.I., Balukova O.V., Kochatkov A.V. Long-term results of treatment of ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: factors affecting the prognosis of the disease. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of Surgical Hepatology*, 2004, Vol. 9, no. 1, pp. 129-134. (In Russ.)]

8. Козлов В.А., Борисов А.Г., Смирнова С.В., Савченко А.А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: руководство для врачей. Новосибирск: Наука, 2009. 274 с. [Kozlov V.A., Borisov A.G., Smirnova S.V., Savchenko A.A. Practical aspects of diagnosis and treatment of immune disorders: a guide for doctors]. Novosibirsk: Science, 2009. 274 p.

9. Натальский А.А., Тарасенко С.В., Зайцев О.В., Песков О.Д. Оценка качества жизни у больных с синдромом механической желтухи // *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*, 2014. Т. 126, № 3. С. 51-54. [Natsalskiy A.A., Tarasenko S.V., Zaitsev O.V., Peskov O.D. Quality of life in patients with obstructive jaundice syndrome. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2014, Vol. 126, no. 3, pp. 51-54. (In Russ.)]

10. Смирнова О.В., Титова Н.М., Елманова Н.Г. Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов больных механической желтухой доброкачественного генеза // *Российский иммунологический журнал*, 2015. Т. 9, № 2 (1) (18). С. 313-315. [Smirnova O.V., Titova N.M., Yelmanova N.G. Features chemiluminescent activity of neutrophils of patients with obstructive jaundice of benign origin. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9, no. 2 (1) (18), pp. 313-315. (In Russ.)]

11. Смирнова О.В., Титова Н.М., Каспаров Э.В., Елманова Н.Г. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов в прогрессировании механической желтухи в зависимости от уровня билирубина и генеза желтухи // *Медицинская иммунология*, 2016. Т. 18, № 3. С. 269-278. [Smirnova O.V., Titova N.M., Kasparov E.V., Yelmanova N.G. Chemiluminescent activity of neutrophils in the progression of jaundice depending on the level of bilirubin and jaundice genesis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 269-278. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-269-278.

12. Смирнова О.В., Титова Н.М., Манчук В.Т., Елманова Н.Г. Особенности цитокиновой регуляции у больных механической желтухой различного генеза // *Современные проблемы науки и образования*, 2015. № 4. С. 425. [Smirnova O.V., Titova N.M., Manchuk V.T., Yelmanova N.G. Features cytokine regulation in patients with obstructive jaundice of various origins. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2015, no. 4, p. 425. (In Russ.)]

13. Смирнова О.В., Титова Н.М., Манчук В.Т., Елманова Н.Г., Кочетова Л.В., Пахомова Р.А. Особенности клеточного звена иммунитета у больных механической желтухой доброкачественного генеза в зависимости от уровня билирубина // *Фундаментальные исследования*, 2015. № 2-10. С. 2174-2179. [Smirnova O.V., Titova N.M., Manchuk V.T., Yelmanova N.G., Kochetova L.V., Pakhomova R.A. Peculiarities of cellular immunity in patients with obstructive jaundice of benign origin depending on the level of bilirubin. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2015, no. 2-10, pp. 2174-2179. (In Russ.)]

14. Migita K., Watanabe A., Yoshioka T., Kinoshita S., Ohya T. Clinical outcome of malignant biliary obstruction caused by metastatic gastric cancer. *World J. Surgery*, 2009, Vol. 33, no. 11, pp. 2396-2402.

Авторы:

Смирнова О.В. — д.м.н., заведующая лабораторией клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера; профессор кафедры медицинской биологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Цуканов В.В. — д.м.н., профессор, заведующий клиническим отделением патологии пищеварительной системы у взрослых и детей, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия

Титова Н.М. — к.б.н., профессор кафедры медицинской биологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Губанов Б.Г. — соискатель кандидатской диссертации, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия

Authors:

Smirnova O.V., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems in the North; Professor, Department of Medical Biology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Tsukanov V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Clinical Department of Digestive Pathology in Adults and Children, Research Institute of Medical Problems in the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Titova N.M., PhD (Biology), Professor, Department of Medical Biology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Gubanov B.G., Postgraduate Student, Research Institute of Medical Problems in the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 17.05.2017

Отправлена на доработку 21.06.2017

Принята к печати 21.06.2017

Received 17.05.2017

Revision received 21.06.2017

Accepted 21.06.2017

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

Артамонов А.Ю.	107	Каспаров Э.В.	61	Ригер Н.А.	53
Арутюнян С.С.	61	Клименкова А.В.	73	Савченко А.А.	61
Афиногенов Г.Е.	107	Копейкин П.М.	107	Сафиуллина К.Э.	107
Афиногенова А.Г.	107	Кудрявцев И.В.	61	Сидорова Л.П.	35
Барбараш О.Л.	73	Лапин С.В.	129	Смирнов К.А.	129
Бернс С.А.	73	Лапштаева А.В.	115	Смирнова О.В.	135
Борисов А.Г.	61	Литвинова Л.С.	45	Соколова К.В.	35
Булавинцева Т.С.	35	Литвинова М.Н.	73	Сухарева М.С.	107
Галстян А.Г.	53	Лугачева Л.И.	23	Сычев И.В.	115
Гвоздев И.И.	61	Майер Д.А.	129	Титова Н.М.	135
Герцев А.В.	123	Макеева О.А.	73	Тодосенко Н.М.	45
Гетте И.Ф.	35	Медведева С.Ю.	35	Тотоян Арег А.	129
Гончарова И.А.	73	Милян Б.Л.	107	Тузанкина И.А.	85
Губанов Б.Г.	135	Морозов С.А.	7	Хазиахматова О.Г.	45
Данилова И.Г.	35	Мошев А.В.	61	Ханферьян Р.А.	53
Дерябина С.С.	85	Мужецкая Т.О.	129	Цветкова Е.В.	107
Добронравов В.А.	129	Мусатов М.И.	23	Цуканов В.В.	135
Евсегнеева И.В.	115	Нагирняк О.А.	73	Черешнев В.А.	35
Евсюкова А.О.	53	Назаров В.Д.	129	Черешнева М.В.	35
Емельянов В.В.	35	Никитюк Д.Б.	53	Черных Е.Р.	7
Жаркова М.С.	107	Новиков В.В.	115	Шамова О.В.	107
Жидкова И.И.	73	Орлов Д.С.	107	Шевела Е.Я.	7
Ишук В.Н.	123	Останин А.А.	7	Шершнев В.Н.	85
Караулов А.В.	115	Петров А.Н.	53	Шмидт Е.А.	73
Карпук И.Ю.	99	Раджаббадиев Р.М.	53	Юрова К.А.	45

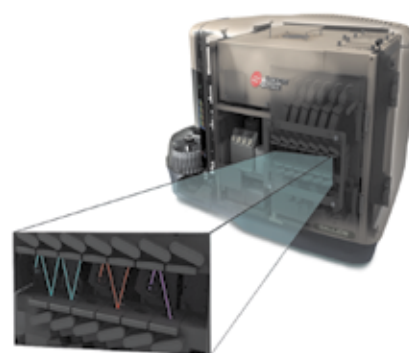
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптивный иммунитет.....	7	ОКСбпСТ.....	74
аллергия.....	99	первичные иммунодефициты.....	85
анемия.....	129	практические рекомендации.....	23
антибиотикорезистентные бактерии.....	108	пролин-богатые пептиды.....	108
антитела.....	129	проточная цитофлюориметрия.....	45
артериальная гипертензия.....	123	пятилетний прогноз.....	74
астения.....	123	респираторный взрыв.....	62
аутоиммунитет.....	7	ретроспективная диагностика.....	85
бактерицины.....	108	ротовая жидкость.....	99
беременность.....	116	сахарный диабет.....	35
библиометрика.....	23	системный иммунный ответ.....	7
вариабельность генов.....	74	стоматологические материалы.....	99
воспаление.....	35	Т-регуляторные клетки.....	62
врожденный иммунитет.....	7, 108	Т-хелперы.....	62
высококвалифицированные спортсмены.....	53	терминально-дифференцированные лимфоциты.....	45
гипергликемия.....	35	триптаза.....	99
иммунитет.....	53	трубно-перитонеальное бесплодие.....	116
иммунная память.....	45	тучные клетки.....	99
иммуногенность.....	129	тяжелая комбинированная иммунная	
иммуноферментный анализ.....	135	недостаточность.....	85
индекс массы тела.....	53	хронический аднексит.....	62
инсулин.....	35	хронический эндометрит.....	62
инсульт-индуцированный иммунодефицит.....	7	цитокины.....	35, 53, 123, 135
ишемический инсульт.....	7	экстракорпоральное оплодотворение.....	116
клетки центральной памяти.....	45	электросон.....	123
клетки эффекторной памяти.....	45	электротерапия.....	123
клинические испытания.....	23	эритропоэтин.....	129
липоевая кислота.....	35	IgE-антитела.....	99
локальный иммунный ответ.....	7	IL-1α.....	116
массовое обследование новорожденных.....	85	KREC.....	85
метаанализы.....	23	LTA.....	74
механическая желтуха.....	135	rs1041981 гена лимфотоксина-α.....	74
неблагоприятный исход.....	74	TREC.....	85
нейровоспаление.....	7	β-эндорфин.....	123
нейропротекция.....	7	γс-цитокины.....	45
нейтрофилы.....	62		

Gallios – совершенный проточный цито- флуориметр для научных исследований

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

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



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

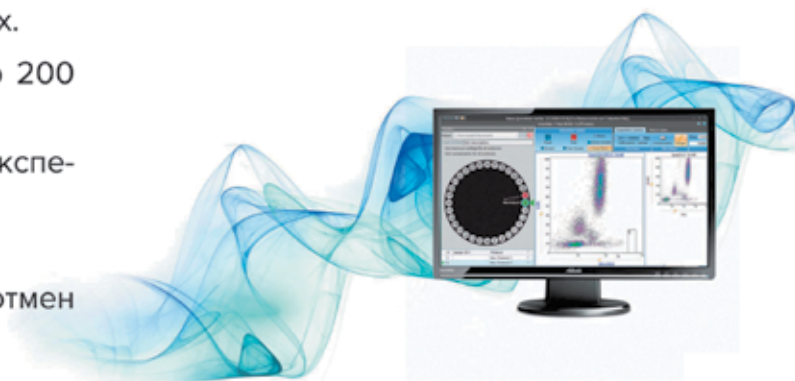
* позвоните и мы расскажем, как измерять частицы размером в 200 нм цитометром Gallios



KALUZA

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

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



ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

