

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

Том 20, № 2. С. 144-288

2018

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

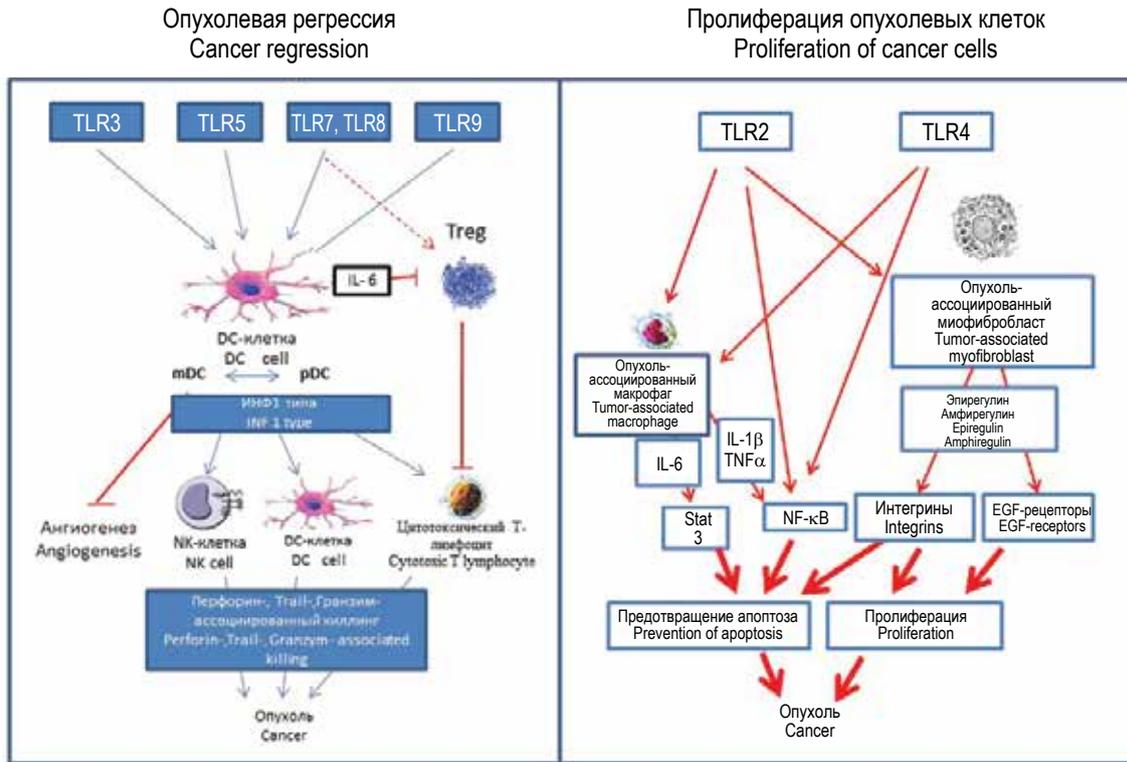


Рисунок 1. Двойная роль TLRs в опухолеобразовании

Figure 1. A dual role of TLRs in tumorigenesis

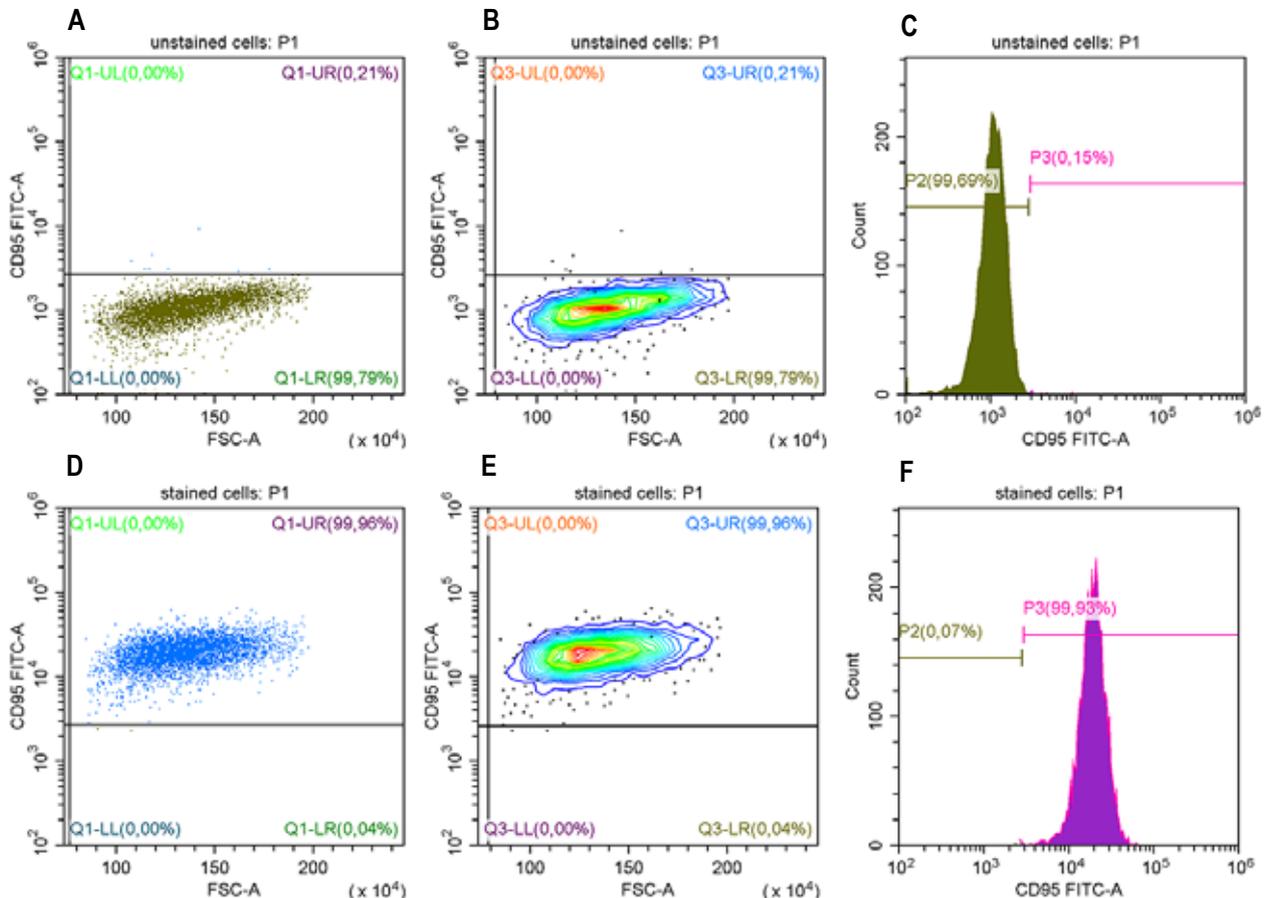


Figure 1. Distribution graphs for NK cells of the NK-92 cell line

Note. A, D, in FSC-CD95 (FITC) coordinates (dot plot); B, E, in FSC-CD95 (FITC) coordinates (contour plot); C, F, in CD95 (FITC) coordinates – count (histogram).

A-C, NK cells of the NK-92 cell line untreated with antibodies to CD95;

D-F, NK cells treated with antibodies to CD95.

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

март-апрель

2018, том 20

№ 2

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.
E-mail: medimmun@spbiraaci.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

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

(SPb RAACI)

**MEDICAL
IMMUNOLOGY/
MEDITSINSKAYA
IMMUNOLOGIYA**

March-April

2018, volume 20

No. 2

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. Chukhlovin, PhD, MD

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

Address for correspondence:

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

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

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western Regional Administration for the Press Affairs of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

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

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

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

Chelovek Publishing House

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 12.02.2018. 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

Свитич О.А., Филина А.Б., Давыдова Н.В., Ганковская Л.В., Зверев В.В.

РОЛЬ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПРОЦЕССЕ ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЯ 151

Пашкин А.Ю., Воробьева Е.И., Хайрутдинов В.Р., Белоусова И.Э., Самцов А.В., Гарабджю А.В.

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ СЕМЕЙСТВА ИНТЕРЛЕЙКИНА-36 В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ПСОРИАЗА 163

Оригинальные статьи

Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Филапенкова Т.А., Серебряная Н.Б.

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ НЕЙРОИММУННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ ПРЕПАРАТОМ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 171

Цыбульский А.В., Попов А.М., Климович А.А., Артюков А.А., Костецкий Э.Я., Веселова М.Д.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭХИНОХРОМА А, ОКСИГЕНИРОВАННЫХ КАРОТИНОИДОВ, ГИНЗЕНОЗИДА Rh2, ДИСУЛЬФАТА ЛЮТЕОЛИНА И МЕТФОРМИНА КАК СРЕДСТВ ПОТЕНЦИРОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКСОРУБИЦИНА 179

Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Костянко М.В., Титов В.А., Вафин И.А., Рагожина С.Е.

АНТИТЕЛА К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЦИТОКИНОВ: АССОЦИИАЦИИ С РАКОМ ЛЕГКОГО У МУЖЧИН 193

Зорина В.Н., Лихачева В.В., Зорина Р.М., Баженова Л.Г., Третьякова Т.В., Архипова С.В., Ренге Л.В., Зорин Н.А. ДИСБАЛАНС В СИСТЕМЕ «ЦИТОКИНОВАЯ СЕТЬ – РЕГУЛЯТОРНО-ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ» ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ БЕСПЛОДИЯ В ПРОГРАММАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ 203

Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В.

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ 215

Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Васильева Е.В., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тоголян Арег А.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ: РЕГУЛЯТОРНЫЕ И ЭФФЕКТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ 227

Клюева С.Н., Бугоркова С.А., Шуковская Т.Н., Санджиев Д.Н., Конушева С.В., Савченко С.П., Хасыкова Б.А., Щербакова С.А.

ОЦЕНКА УРОВНЯ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ЧУМЫ ЛИЦ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИКАСПИЙСКОГО ПЕСЧАНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА 241

Краткие сообщения

Михайлова В.А., Белякова К.Л., Вязьмина Л.П., Шевелева А.Р., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ, ОБРАЗУЕМЫХ НК-КЛЕТКАМИ, МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ 251

Абрамова Т.Я., Цура В.А., Блинова Е.А., Моренкова А.Ю., Козлов В.А.

АКТИВАЦИЯ РАННЕЙ СТАДИИ АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ *IN VITRO* ПОСРЕДСТВОМ ПЕРЕНОСА КОМПОНЕНТОВ АУТОЛОГИЧНОЙ АПОПТОТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ 255

Куликова И.Г., Балацкая Н.В., Ковалева Л.А., Макаров П.В.

ЧАСТОТА СДВИГОВ ОТ НОРМЫ В СУБПОПУЛЯЦИОННОМ СОСТАВЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯЗВОЙ РОГОВИЦЫ 263

Еремеев В.В., Духовлинов И.В., Орлов А.И., Шепелькова Г.С., Федорова Е.А., Балазовский М.Б., Гергерт В.Я.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА, ИНДУЦИРОВАННОГО ВАКЦИНОЙ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ Ag85, TB10 И FltC 271

Герцев А.В., Закревский Ю.Н.

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОПЕПТИДНО-ЦИТОКИНОВОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ С ПОЛИМОРБИДНОЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИЕЙ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ НА ФОНЕ ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВ 277

Правила для авторов 285

Авторский указатель 288

Предметный указатель 288

CONTENTS

Reviews

<i>Svitich O.A., Filina A.B., Davydova N.V., Gankovskaya L.V., Zverev V.V.</i> THE ROLE OF INNATE IMMUNITY FACTORS IN TUMORIGENESIS PROCESS	151
<i>Pashkin A.Yu., Vorobyeva E.I., Khairutdinov V.R., Belousova I.E., Samtsov A.V., Garabagiou A.V.</i> THE ROLE OF CYTOKINES OF INTERLEUKIN 36 FAMILY IN IMMUNOPATHOGENESIS OF PSORIASIS.....	163

Original articles

<i>Shanin S.N., Fomicheva E.E., Filatenkova T.A., Serebryanaya N.B.</i> CORRECTION OF DISTURBED NEUROIMMUNE INTERACTIONS IN EXPERIMENTAL TRAUMATIC BRAIN INJURY BY MEANS OF RECOMBINANT INTERLEUKIN 2	171
<i>Tsybulsky A.V., Popov A.M., Klimovich A.A., Artyukov A.A., Kostetsky E.Ya., Veselova M.D.</i> COMPARATIVE STUDY OF ECHINOCHROME A, OXYGENATED CAROTENOIDS, GINSENOSE Rh2, LUTEOLIN DISULFATE AND METFORMIN AS A MEAN TO POTENTIATE ANTITUMOR EFFECT OF DOXORUBICIN	179
<i>Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Kostyanko M.V., Titov V.A., Vafin I.A., Ragozhina S.E.</i> ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE AND GENE POLYMORPHISMS OF CYTOKINES: ASSOCIATIONS WITH LUNG CANCER IN MEN	193
<i>Zorina V.N., Likhacheva V.V., Zorina R.M., Bazhenova L.G., Tretyakova T.V., Arkhipova S.V., Renge L.V., Zorin N.A.</i> IMBALANCE IN CYTOKINE NETWORK/REGULATORY TRANSPORT PROTEIN SYSTEM IN VARIOUS TYPES OF INFERTILITY DURING <i>IN VITRO</i> FERTILIZATION PROGRAMS.....	203
<i>Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V.</i> PHENOTYPIC PECULIARITIES OF DENDRITIC CELLS DIFFERENTIATED FROM BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH KIDNEY CANCER	215
<i>Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Vasilyeva E.V., Krobinets I.I., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Totolian Areg A.</i> PHENOTYPIC CHARACTERISATION OF PERIPHERAL BLOOD CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES: REGULATORY AND EFFECTOR MOLECULES.....	227
<i>Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Sandzhiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Khasykova B.A., Shcherbakova S.A.</i> EVALUATION OF HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY LEVEL AMONG PERSONS LIVING IN THE CASPIAN NATURAL SANDY FOCUS TERRITORY AFTER ANTI-PLAGUE REVACCINATION	241

Short communications

<i>Mikhailova V.A., Belyakova K.L., Vyazmina L.P., Sheveleva A.R., Selkov S.A., Sokolov D.I.</i> EVALUATION OF MICROVESICLES FORMED BY NATURAL KILLER (NK) CELLS USING FLOW CYTOMETRY.....	251
<i>Abramova T.Ya., Tsura V.A., Blinova E.A., Morenkova A.Yu., Kozlov V.A.</i> <i>IN VITRO</i> ACTIVATION OF EARLY-STAGE APOPTOSIS OF T LYMPHOCYTES BY TRANSFERRING APOPTOTIC AUTOLOGOUS CELL CULTURE COMPONENTS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS	255
<i>Kulikova I.G., Balatskaya N.V., Kovaleva L.A., Makarov P.V.</i> FREQUENCY OF DEVIATIONS FROM NORMAL VALUES IN THE BLOOD SUBPOPULATIONS' PROFILE IN THE PATIENTS WITH CENTRAL CORNEAL ULCERS.....	263
<i>Yeremeev V.V., Dukhovlinov I.V., Orlov A.I., Shepelkova G.S., Fedorova E.A., Balazovsky M.B., Gergert V.Ya.</i> DURATION OF IMMUNE RESPONSE INDUCED BY THE VACCINE BASED ON RECOMBINANT Ag85, TB10 AND FliC PROTEINS.....	271
<i>Gertsev A.V., Zakrevsky Yu.N.</i> CHARACTERISTICS OF NEUROPEPTIDE-CYTOKINE IMMUNITY LINKS IN PATIENTS WITH COMBINED CARDIOVASCULAR PATHOLOGY, PROCEEDING WITH ANXIETY/DEPRESSION DISORDER	277

Instructions to Authors	285
-------------------------------	-----

Author index	288
--------------------	-----

Subject index.....	288
--------------------	-----

РОЛЬ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПРОЦЕССЕ ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЯ

Свитич О.А.^{1,2,3}, Филина А.Б.^{1,2}, Давыдова Н.В.², Ганковская Л.В.³,
Зверев В.В.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

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

³ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»,
Москва, Россия

Резюме. Одной из важнейших теорий канцерогенеза является теория о полиэтиологичности опухолеобразования. Большое место в этой теории отводится роли воспалительного компонента, который реализуется посредством факторов врожденного иммунитета.

К факторам врожденного иммунитета, участвующим в опухолеобразовании, относятся TLRs, хемокины и их рецепторы. Активация TLRs может приводить как к снижению прогрессии онкологического процесса, так и, наоборот, к усилению. Известно, что TLR3, TLR5, TLR7, TLR9 обладают наибольшим противоопухолевым эффектом через DCs-опосредованную активацию Th1, активацию макрофагов M1-типа и ингибирование Treg. Стимуляция TLR4 и TLR2 обладает опухоль-активирующим эффектом, путем гиперактивации MyD88 и выработки IL-6 и TNF α , однако механизмы до конца не изучены. Помимо TLRs, большое влияние на развитие онкологического процесса оказывают хемокины и их рецепторы. Показано, что CCL2, CCL4, CCL17, CCL22 и CXCL12, выделяемые клетками микроокружения опухоли, активно влияют на хемотаксис опухолевых клеток. Также известно, что CXCR4 и CCR7, экспрессируемые опухолевыми клетками, активируются хемокинами, что ведет к метастазированию. Также показаны ассоциации некоторых полиморфизмов генов TLRs, хемокинов и их рецепторов с развитием опухолевого процесса. Таким образом, на основании литературных данных, можно сделать заключение о том, что TLR и хемокины имеют большое значение при онкогенезе. Дальнейшее изучение влияния факторов врожденного иммунитета на онкогенез имеет больше значение для обоснования новых подходов терапии рака, а также потенциал для создания вакцин против рака.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, TLR, хемокины, опухолеобразование, генетика

THE ROLE OF INNATE IMMUNITY FACTORS IN TUMORIGENESIS PROCESS

Svitich O.A.^{a,b,c}, Filina A.B.^{a,b}, Davydova N.V.^b, Gankovskaya L.V.^c,
Zverev V.V.^{a,b}

^a I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

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

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

Abstract. The theory of polyetiological tumorigenesis is one of the most important theories of carcinogenesis. A great place in this theory is given to the role of inflammatory component, which is implemented *via* the

Адрес для переписки:

Свитич Оксана Анатольевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, 5а.
Тел.: 8 (926) 148-83-22.
E-mail: svitichoa@yandex.ru

Address for correspondence:

Svitich Oxana A.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow, Malii Kasennii lane, 5a.
Phone: 7 (926) 148-83-22.
E-mail: svitichoa@yandex.ru

Образец цитирования:

О.А. Свитич, А.Б. Филина, Н.В. Давыдова,
Л.В. Ганковская, В.В. Зверев «Роль факторов
врожденного иммунитета в процессе
опухолеобразования» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 2. С. 151-162.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-151-162

© Свитич О.А. и соавт., 2018

For citation:

O.A. Svitich, A.B. Filina, N.V. Davydova, L.V. Gankovskaya,
V.V. Zverev "The role of innate immunity factors in
tumorigenesis process", *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 151-162.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-151-162

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-151-162

factors of innate immunity. I.e., toll-like receptors (TLRs), chemokines and their receptors are related to innate immunity. Activation of TLRs may lead to regress or progression of cancer process. It is known that TLR3, TLR5, TLR7, TLR9 have the greatest anti-tumor effect due to the dendritic cells (DCs)-mediated activation of type I T helpers, activation of M1-type macrophages and Treg inhibition. Stimulation of TLR2 and TLR4 exerts an activating effect upon the tumor, by the MyD88 hyperactivation and secretion of IL-6 and TNF α , but exact mechanisms are not fully understood. In addition to TLRs, chemokines and their receptors have a great influence on the cancer development. It is shown that CCL2, CCL4, CCL17, CCL22 and CXCL12, which are secreted by cancer microenvironment, activate chemotaxis of tumor cells. It is also known that the chemokines activate CXCR4 and CCR7 (expressed by tumor cells) thus leading to metastasis.

It is shown that there is an association between some gene polymorphisms of TLRs, chemokines and their receptors, and development of cancer.

Thus, we may conclude that the role of TLRs and chemokines is important in oncogenesis. Further study of innate immunity factors influencing tumorigenesis are important for finding new approaches to cancer therapy and new potential vaccines against cancer.

Keywords: innate immunity, toll-like receptors (TLR), chemokines, tumorigenesis, genetics

Введение

На сегодняшний день одной из ведущих теорий онкогенеза является теория о полиэтиологичности опухолеобразования, в которой большое внимание уделяется воспалительным процессам [1, 5]. Важнейшей проблемой в понимании взаимосвязи воспаления и онкологии является выявление иницирующих механизмов, которые ведут от воспаления к опухолеобразованию.

Согласно Mantovani A. и соавт., связь между онкогенезом и воспалением опосредуется через «внутренний» и «внешний» пути [35]. «Внутренний» путь активируется с помощью генетических изменений, опосредованно вызывающих воспаление и неоплазию. Эти изменения включают в себя мутации в протоонкогенах, хромосомные транслокации, а также инактивацию генов-супрессоров опухолевого роста и другие нарушения. «Внешний» путь обусловлен воспалительным заболеванием и/или инфекциями, а также «сигналами опасности» (продуктами распада клеток собственного организма), которые увеличивают риск развития онкологии. Известно, что как генетические, так и воспалительные факторы могут TLR-опосредованно индуцировать активацию факторов транскрипции, приводящих к экспрессии провоспалительных цитокинов, хемокинов и противомикробных пептидов [32]. На следующем этапе происходит активация клеточного звена врожденного иммунитета (макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток и др.). В случае развития хронического воспаления увеличивается риск образования опухолевых клеток. В данном обзоре речь пойдет о позитивной и негативной роли распознающих структур врожденного иммунитета (TLR), а также хемокинов в образовании и метастазировании опухолевых клеток.

TLRs (Toll-like receptors) являются одной из групп так называемых образспознающих рецепторов – PRRs (pattern recognition receptors),

которые распознают PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Известно, что PAMPs относятся к молекулам чужеродного происхождения (в основном инфекционным). Молекулы эндогенного происхождения – DAMPs (damage-associated molecular patterns), которые образуются при распаде структур и клеток организма [1]. TLRs экспрессируются практически на всех клетках организма, но в большей степени на клетках иммунной системы: моноцитах, нейтрофилах, макрофагах, дендритных клетках, Т-клетках, В-клетках и на эпителиальных клетках кожи и слизистых, представляющих первую линию защиты от патогенов [37]. Известно, что TLR4, TLR5 и TLR9 экспрессируются на эпителиальных клетках желудка [1]. На клетках слизистой дыхательных путей, которая также постоянно подвергается опасности инфицирования, определяли экспрессию TLR4 и TLR9 в эпителиальных клетках альвеол и бронхов [2, 5]. Экспрессия генов TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 была определена в фаллопиевых трубах, матке, шейке матки и в цервикальном канале. Следует отметить, что наибольшие уровни экспрессии TLR2 отмечены на эпителиальных клетках фаллопиевых труб и цервикального канала. Известно, что кератиноциты человека экспрессируют на высоком уровне гены TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 и TLR9 [6, 33] (табл. 1). Однако известно, что TLRs могут экспрессироваться не только «здоровыми», но также опухолевыми клетками. Экспрессия TLRs на опухолевых клетках может играть в развитии опухолевого процесса как положительную, так и отрицательную роль.

Отрицательная роль TLRs в опухолеобразовании

По данным литературы известно, что TLRs обладают опухоль-активирующим эффектом (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). Данный феномен лучше всего известен в клетках толстого кишечника, желудка, печени, поджелудочной железы, кожи в основном при участии TLR4 и TLR2. Так,

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ TLRs В «ЗДОРОВЫХ» И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

TABLE 1. EXPRESSION OF TLRs GENES IN "HEALTHY" AND IN TUMOR CELLS

Система органов System of organs	Норма Normal tissue		Опухоль Cancer tissue	
	Ткань/клетки Tissue/cells	TLRs	Ткань/клетки Tissue/cells	TLRs
Желудочно-кишечный тракт Gastrointestinal tract	Эндотелий желудочно-кишечного тракта Gastrointestinal tract endothelium	TLR4, TLR5, TLR9	Желудочная карцинома Gastric carcinoma	TLR4, TLR5, TLR9
	Клетки слизистой кишечника Cells of intestinal mucosa	TLR3, TLR5	Рак кишечника Bowel cancer	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4
	Эпителий толстой кишки Epithelium of colon	TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9	Печеночно-клеточная карцинома Hepatic carcinoma	TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR9
Респираторный тракт Respiratory tract	Эпителий респираторного тракта Epithelium of the respiratory tract	TLR4, TLR9	Рак легких Lung cancer	TLR2, TLR3, TLR4, TLR9
Женская мочеполовая система Female urogenital system	Эндометрий, клетки слизистой фаллопиевых труб Endometrium, cells of the Fallopian tubal mucosa	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6	Рак яичников Ovarian cancer	TLR4
	Эктоцервикс и влагалище Ectocervix and vagina	TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6	Карцинома цервикального канала Carcinoma of the cervical canal	TLR5, TLR9
	Эндоцервикс Endocervix	TLR4		
	Эпителий цервикального канала Epithelium of the cervical canal	TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7, TLR9, TLR10		
Мужская мочеполовая система Male urogenital system			Рак предстательной железы Prostate cancer	TLR9
Кожа Skin	Кератиноциты Keratinocytes	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9	Меланома Melanoma	TLR3, TLR4

к примеру, в толстом кишечнике, где есть постоянное взаимодействие между микрофлорой кишечника и эпителиальными клетками, инактивация TLR4 значительно уменьшает воспаление, а также снижает риск прогрессирования опухоли (колит-ассоциированная неоплазия) с использованием АОМ-DSS (azoxymethane/dextran sulfate

sodium) модели [36]. Эти исследования согласуются с результатами других исследований, в которых либо удаление молекулы адаптера TLR4 MyD88 [41], либо истощение микрофлоры кишечника (которая является источником PAMPs) значительно снижает прогрессию рака толстой кишки [43].

В коже у TLR4- и MyD88-дефицитных мышей проявлялось сильное подавление роста опухолей, которые были вызваны путем двухступенчатого химического канцерогенеза [8]. Канцерогенез в коже зависит от повышенной экспрессии TLR4 миелоидными и эпителиальными клетками, а также от наличия TLR4 эндогенного лиганда — HMGB1 (high-mobility group protein B1). Факт, что TLR4 оказывает защитную роль в невоспалительной модели канцерогенеза кожи, предполагает, что влияние TLR4 на рак кожи может зависеть от условий микроокружения опухоли [7, 51]. В поджелудочной железе ингибирование TLR4 уменьшает рост опухоли, в то время как постоянное воздействие ЛПС ускоряет прогрессирование рака. Если TLR4 в толстом кишечнике, печени, коже и поджелудочной железе проявляет себя как активатор опухолеобразования, то в легких активация данного рецептора имеет противоопухолевый эффект: у мышей, которые экспрессируют нефункциональный TLR4, частота 3-метилхолантрен-индуцированного рака легких выше, чем у мышей с функционирующим TLR4 [2]. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять вклад TLR4 в опухолеобразование. Вполне возможно, что TLR4-активирующие PAMPs действуют главным образом в качестве потенциальных промоуторов опухоли, в то время как DAMPs — в качестве потенциальных супрессоров опухолей.

По другим работам известно, что активация TLR2 также может способствовать развитию онкологического процесса. Большое значение TLR2 играет в развитии рака желудка: была показана зависимость между высоким уровнем экспрессии TLR2 и худшим прогнозом исхода рака желудка у мышей. При раке легкого активация TLR2 оказывает опухоль-стимулирующий эффект, а также усиливает метастазирование опухолевых клеток. Раковые клетки легких секретируют внеклеточный матричный компонент — версикан, что приводит к версикан-опосредованной стимуляции TLR2, что в свою очередь ведет к активной продукции IL-6 и TNF α макрофагами, которые стимулируют метастазирование [29]. В печени при хроническом повреждении TLR2 не влияет на гепатоканцерогенез [13, 24], однако в чисто генотоксической модели рака печени у TLR2-нокаутных мышей обнаруживается более высокое число опухолей и снижение выживаемости. Опухолевые клетки от мышей с повышенной экспрессией TLR2 показали высокую степень выживаемости и подавление апоптоза. Роль TLR2 остается спорной в развитии колоректального рака. В одном исследовании колоректально-

го рака не было никаких различий между мышами дикого типа и TLR2-дефицитными мышами с использованием модели AOM-DSS [45]. В противоположность к этим фактам в другом исследовании сообщалось об увеличении развития опухоли и о более высоких уровнях продукции IL-6 и IL-17A в колоректальном раке у TLR2-дефицитных мышей с использованием аналогичной модели AOM-DSS [14].

Несмотря на полученные данные о значимости TLR2 и TLR4 в канцерогенезе, до конца не понятны механизмы развития онкологического процесса, что открывает границы для дальнейшего изучения влияния TLRs на онкогенез (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки).

Роль TLRs в противоопухолевом иммунитете

Один из основных механизмов, лежащих в противоопухолевой активности TLRs, основан на их способности активировать противоопухолевый иммунитет [21]. Известно, что опосредованная активация дендритных клеток DCs (dendritic cells) может привести к выработке IFN α , который снижает противоопухолевую толерантность и активирует противоопухолевый иммунитет через активацию NK (nature killers), главная функция которых — уничтожение измененных и опухолевых клеток [18]. TLR-опосредованная активация DCs приводит к стимуляции миграции NK-клеток и усилению активности Th1 и цитотоксических Т-лимфоцитов, которые вызывают гибель опухолевых клеток [11, 19]. По данным литературы также известно, что стимуляция TLRs снижает супрессорную активность Treg-клеток, что в свою очередь ведет к изменению противоопухолевой толерантности. Кроме вышеописанных механизмов борьбы с опухолью, по данным литературы, известен TLR-зависимый переход опухоль-стимулирующего типа M2 макрофагов в опухоль-подавляющий тип (тип M1). Если активация M2 ведет к выработке таких цитокинов, как TGF- β и IL-10 (TGF- β стимулирует пролиферацию опухолевых клеток, а IL-10 активирует Th2, которые блокируют развитие противоопухолевого иммунного ответа), то активация M1 ведет к выработке IL-1, IL-6, IL-12, TNF α и IFN γ , которые обладают наибольшим потенциалом против туморогенеза [11].

Считается, что наибольшим противоопухолевым эффектом обладает активация TLR3, TLR5, TLR7 и TLR9 (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). В сингенных и ксенотрансплантантных моделях рака простаты у TLR3 дефицитных мышей обнаруживается усиление роста опухоли [10]. С другой стороны, лечение TLR3-агонистом поли I:C ингибирует рост опухоли генетической модели

рака предстательной железы с гиперэкспрессией TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate). Систематическое введение поли I:C снижает рост метастазирования меланомы в печени, существует положительная корреляция между экспрессией TLR3 и выживаемостью [26]. Однако, несмотря на вышеописанные эффекты активации TLR3, нельзя отрицать на данный момент возможность развития опухоли или ее прогрессии при гиперактивации TLR3.

Большинство исследований, направленных на изучение вклада TLR5 в развитие опухоли, выявили мощный противоопухолевый эффект, который во многом зависит от влияния данного рецептора на активацию DC-клеток. Этот эффект лучше всего был представлен в исследовании, где опухолевая линия клеток, экспрессирующая TLR5-агонист флагеллин, сцепленный с опухолевым антигеном, активировала DC-опосредованный противоопухолевый иммунный ответ [44]. В толстом кишечнике в ксенотрансплантантной модели нокдаун по TLR5 или MyD88 наблюдалось резкое усиление роста опухоли и торможение некроза [4]. TLR5 высоко экспрессирован в клетках рака молочной железы человека по сравнению с неопухолевой тканью. Известно, что воздействие агониста TLR5 флагеллина на опухолевые клетки молочной железы замедляет рост опухоли путем усиления клеточной смерти и снижения клеточной пролиферации. Тем не менее использование иммунодефицитных моделей мышей с дефицитом по DC-клеткам является существенным ограничением вышеупомянутых исследований. Таким образом, опухоль-подавляющая функция TLR5 требует дополнительных исследований.

TLR7 и TLR8 являются структурно родственными рецепторами для одноцепочечной РНК, TLR7 и TLR8 не так давно оказались в центре внимания исследований по взаимосвязи TLRs и онкологии из-за глубоких иммуномодулирующих и противоопухолевых эффектов низкомолекулярных агонистов [18, 22, 30]. В то время как существуют значительные данные о клиническом применении сильнодействующих TLR7/8-агонистов для противоопухолевой терапии, относительно мало известно о вкладе эндогенной активации TLR7 и TLR8 в канцерогенез. В своем исследовании Fabbri M. и соавт. показали, что микроРНК, выделенные из опухолей через экзосомы, связываются с TLR7 и TLR8 и способствуют метастазированию [18], что позволяет предполагать, что активация TLR7 и TLR8 эндогенными агонистами оказывает опухоль-стимулирующие эффекты. TLR7- и TLR8-агонисты преимуще-

ственно используются для противоопухолевой терапии базально-клеточной карциномы и меланомы [46, 48]. TLR7- и TLR8-активированные DC-клетки активируют NK-клетки и подавляют Treg. Несмотря на огромное число литературных данных о противоопухолевом эффекте TLR7- и TLR8- агонистов, последние исследования указывают на потенциальную опухоль-стимулирующую роль TLR7 и TLR8 в некоторых ситуациях: при раке поджелудочной железы определялась не только высокая экспрессия TLR7 в эпителиальных и иммунных клетках, но и ускорение роста опухоли после активации TLR7. С другой стороны, фармакологическое ингибирование TLR7 уменьшает прогрессирование рака поджелудочной железы. В легких также TLR7 и TLR8 экспрессируются на опухолевых клетках и способствуют выживаемости этих клеток через активацию NF-κB и повышение экспрессии Vcl-2. Как уже говорилось выше, TLR7- и TLR8-агонисты микроРНК способствуют росту опухоли легких. Таким образом, эффекты TLR7 и TLR8 по отношению к опухолевым клеткам могут зависеть от органа, стадии опухоли, типа клеток и роли, которую противоопухолевые иммунные реакции играют в той или иной опухоли. В свете потенциальных клинических применений TLR7- и TLR8-агонистов для противоопухолевой терапии, дальнейшие фармакологические и генетические исследования необходимы для понимания, в каких из органов и при каких условиях TLR7 и TLR8 связаны с прогрессированием онкологического процесса.

TLR9 является рецептором для неметилированной CpG-богатой ДНК, которая обычно характерна для вирусов и бактерий [30]. По аналогии с TLR7 и TLR8, хорошо изучена роль TLR9 в иммунологическом надзоре при онкологическом процессе и в качестве потенциальной мишени для противоопухолевой таргетной терапии с использованием синтетических агонистов TLR9. О важной роли TLR9 в иммунологическом надзоре свидетельствует тот факт, что дефицит TLR9 приводит к острому лимфобластному лейкозу Т-клеток после заражения ретровирусом [50]. Эти данные свидетельствуют о том, что изучение и использование TLR9 может быть особенно актуально для вирус-индуцированных опухолей. Также активация TLR9 синтетическими агонистами, например олигодезоксинуклеотидами (CpG-ODN), показала противоопухолевую активность в ксенотрансплантантной мышинной модели карциномы шейки матки, нейробластомы и рака толстой кишки [30]. CpG-ODN изучаются для лечения различных типов опухолей как в виде монотерапии, так и в сочетании с лу-

чевой терапией и цитотоксической химиотерапией. Показано, что агонисты TLR9 индуцируют выработку интерферонов I типа в DCs, которые приводят к активации NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, что способствует развитию противоопухолевого иммунного ответа [30]. Также, помимо иммунных клеток, TLR9 экспрессируется на опухолевых клетках многих тканей [9], но функция TLR9 на опухолевых клетках в естественных условиях в настоящее время только изучается.

Хемокины и их значение в развитии онкологического процесса

Выше обсуждалась взаимосвязь развития онкологического процесса с выработкой хемокинов при активации TLRs. Хемокины являются неотъемлемым компонентом хемотаксиса, который участвует в иммунном «уклонении» опухоли, ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолевых клеток [25, 27]. Сеть хемокинов и других цитокинов, которые секретируются опухолевыми и стромальными клетками, может привести к иммунной толерантности. Например, клетки рака яичников могут экспрессировать CCL2 и, таким образом, вызывать миграцию Treg в опухоль. Под действием хемокинов в микроокружении опухоли макрофаги и нейтрофилы могут переходить от фенотипа, который участвует в противоопухолевом иммунитете (M1 и N1 соответственно) к противоположному фенотипу (M2 или N2 соответственно) [42]. TAMs (tumor-associated macrophages) и TANs (tumor-associated neutrophils) могут продуцировать цитокины, подавляющие противоопухолевый иммунитет, например интерлейкин-10 (IL-10), трансформирующий фактор роста- β (TGF- β) и хемокины (CCL2, CCL4, CCL17, CCL22 и CXCL12). По данным литературы известно, что у пациентов с онкологией определяется повышенное количество TAMs и TANs, что ассоциировано с неблагоприятным прогнозом заболевания [20, 49]. Таким образом, один из механизмов влияния хемокинов на прогрессирование опухоли – активация опухоль-ассоциированных иммунных клеток микроокружения (рис. 2).

Хемокины и цитокины принимают участие также в ангиогенезе опухоли, который необходим для оптимальной прогрессии онкологического процесса. Количество кровеносных сосудов в опухоли коррелирует с более высокой частотой метастазирования и более частыми рецидивами. Опухолевые клетки продуцируют хемокины (CCL11, CXCL1, CXCL2 и CXCL8 и др.), которые действуют непосредственно на эндотелиальные клетки, экспрессирующие хемокиновые рецепторы (CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR7 и др.) [3, 12, 27, 28]. Известно, что также CXCL12 играет

важную роль в миграции и пролиферации эндотелиальных клеток путем связывания с CXCR4 на поверхности, действуя синергически с сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF – Vascular endothelial growth factor) [30, 38]. CXCL12 может выступать в качестве проангиогенного фактора через активацию миграции клеток-предшественников эндотелия (endothelial precursor cells – EPCs), экспрессирующих CXCR4, к месту локализации опухоли, где они могут дифференцироваться в эндотелиальные клетки сосудов, ассоциированные с опухолью, что способствует активному ангиогенезу в опухоли. Кроме того, EPCs экспрессируют CCR2 и CCR5 и, следовательно, также могут мигрировать к месту локализации злокачественных клеток, где опухоль-ассоциированные клетки эндотелия выделяют CCL2, CCL3 и CCL5 [31] (рис. 2).

Опухолевые клетки могут секретировать хемокины, которые косвенно влияют на ангиогенез путем активации иммунной инфильтрации ткани опухоли. Миелоидные моноциты, такие как TAMs, MDSCs (myeloid-derived suppressor cells – MDSC) и DCs, мигрируют в зону опухоли и участвуют в ангиогенезе путем продукции VEGF (platelet-derived growth factor – PDGF), TGF- β и CXCL8 [27]. Таким образом, хемотаксис является важным процессом для ангиогенеза в опухоли: либо непосредственно путем активации миграции эндотелиальных клеток в область опухоли с дальнейшим прорастанием сосудов, либо косвенным путем через иммунные клетки микроокружения.

Показано, что хемокины также участвуют в метастазировании опухолей. В этом процессе задействованы CXCR4 (23 вида опухолей экспрессируют данный рецептор) и CCR7 (рис. 2). В исследованиях хемотаксиса *in vitro* показано, что CXCR4-экспрессирующие опухолевые клетки направленно мигрируют к CXCL12, в то время как CCR7-экспрессирующие опухолевые клетки мигрируют к CCL21. В микроокружении опухоль-ассоциированные фибробласты (Cancer-associated fibroblasts – CAFs) или мезенхимальные стволовые клетки (mesenchymal stem cells – MSCs) могут быть источником CXCL12, что способствует направленной миграции опухолевых к сосудам или инвазивной части опухоли [16, 23, 40]. CAFs также продуцируют высокие уровни CXCL1, CXCL2, CXCL3 и CXCL8, которые вызывают хемотаксис опухолевых клеток.

В зарубежных исследованиях была высказана теория о том, что опухолевый тропизм к тканям при метастазировании можно объяснить хемокиновым градиентом данной ткани для многих разновидностей опухолей [26]. Эта теория говорит о том, что органы или ткани с высоким уровнем

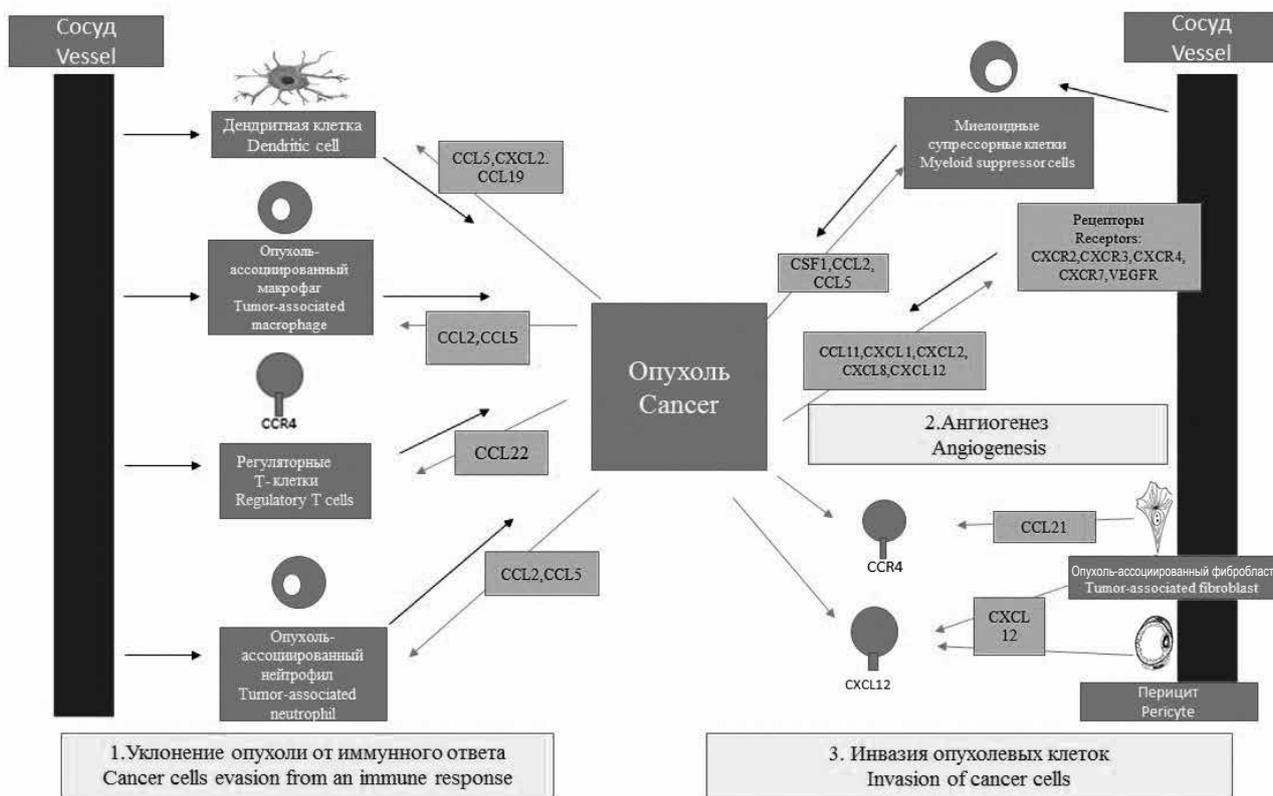


Рисунок 2. Хемокиновое микроокружение опухоли

Figure 2. Chemokine microenvironment of the tumor

экспрессии определенных хемокинов могут направлять миграцию опухолевых клеток, которые экспрессируют рецепторы данных хемокинов. Этот феномен был показан для CXCR4-CXCL12 при метастазировании в кости клеток рака молочной железы и предстательной железы, CCL21-CCR7 и CCL19-CCR7 при метастазировании опухолевых клеток в лимфатические узлы из различных солидных опухолей и гемопоэтических опухолей и CCL27-CCR10 при метастазировании в кожу клеток меланомы [5]. Также есть вероятность того, что опухолевые клетки оказываются в том или ином органе с током крови или лимфы, особенно актуально это для клеток крови, однако взаимодействие рецептор–хемокин способствует дальнейшему выживанию опухолевых клеток. В дополнение к CAFs, взаимодействие с другими клетками внутри стромы опухоли может оказывать значительное влияние на поведение миграции опухолевых клеток *in vivo*. TAMs играют роль в инвазии клеток опухоли и метастазов в экспериментальных моделях рака молочной железы [10]. TAMs мигрируют совместно с опухолевыми клетками, в этом процессе принимает участие EGF, который продуцируется TAMs, увеличивает миграцию клеток рака молочной железы,

экспрессирующих EGFRs. В ответ опухолевые клетки секретируют CSF1, который привлекает CSF1-рецептор, экспрессирующий TAMs. У пациентов с раком молочной железы более 50% опухолей молочной железы имеют сопутствующую экспрессию CSF1 и CSF1R, повышая потенциал для аутокринной активации. Оба пути имеют важное значение для хемотаксиса, миграции и инвазии клеток опухолей *in vivo* [41]. В дополнение к EGF и CSF1, другие хемоаттрактанты, такие как CXCL12 и нейрегулин-1 (Neuregulin 1 – NRG1), являются сильными триггерами хемотаксиса опухолевых клеток в трансгенных и ксенотрансплантантных моделях рака молочной железы. Интересно, что миграция к CXCL12 требуются макрофаги и паракринное взаимодействие EGF-CSF1 с опухолевыми клетками, т.к. предполагается, что это взаимодействие опухолевых клеток и макрофагов является «центральным двигателем», который управляет инвазией и миграцией клеток опухоли молочной железы. CXCL12 также может быть продуцирован перидитами и опухолевыми клетками, что свидетельствует о сложном взаимодействии сети хемокинов, опухоль-ассоциированных клеток, направленной миграции и инвазии.

ТАБЛИЦА 2. АССОЦИАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ В ГЕНАХ *TLRs* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

TABLE 2. ASSOCIATION OF SOME POLYMORPHIC MARKERS IN *TLRs* WITH A RISK OF DEVELOPING TUMOR DISEASES

Хромосома Chromosome	Ген <i>TLRs</i> <i>TLRs</i> gene	Полиморфный маркер Polymorphous marker	Ассоциация с опухолью Association with cancer
4p14	<i>TLR1</i>	-7202 A/G	Рак простаты Prostate cancer
		-6399 C/T	
		-833 C/T	
4q32	<i>TLR2</i>	(GT) микросателлитный повтор во втором интроне Microsatellite repeat in the second intron	Колоректальный рак Colorectal cancer
		-196 to 174del	Рак желудка Gastric carcinoma
		-16933T>A	Лимфома Lymphoma
9q32-q33	<i>TLR4</i>	<i>Asp299Gly</i>	Рак желудка Gastric carcinoma
		<i>Thr399Ile</i>	
		<i>G11481C</i>	Рак простаты Prostate cancer
4p14	<i>TLR6</i>	-1401 A/G	Рак простаты Prostate cancer
		-673 C/T	
3p21.3	<i>TLR9</i>	3p21-p22	Рак груди, рак почки Breast cancer, kidney cancer
		-1237T/C	Рак желудка Gastric carcinoma
4p14	<i>TLR10</i>	-3260 C/T, -1692 C/T, -260 A/G, +720 A/C	Рак простаты Prostate cancer

Ассоциация полиморфизмов в генах *TLRs* с развитием опухолевого процесса

Многие исследователи также связывают развитие онкологического процесса с полиморфизмом генов [17, 47]. Сотни SNPs (single nucleotide polymorphisms) были идентифицированы в генах *TLRs*, но связь с функцией не была раскрыта в подавляющем большинстве. Существует множество работ, описывающих ассоциацию полиморфных маркеров в генах *TLRs* и с инфекционными заболеваниями, и с образованием опухолей [7, 39]. К *TLR2*-подсемейству относятся *TLR2*, *TLR1* и *TLR6*, которые имеют высокую степень гомологии, следует отметить, что гены *TLR1* и *TLR6* образуют кластер с геном *TLR10* в районе 4p14. Подсемейства *TLR3*, *TLR4*, *TLR5* содержат по одному представителю, которые локализируются на 4 (4q35), 9 (9q32 – q33) и 1 (1q41 – q42) хромосомах человека соответственно. *TLR9*-подсемейство включает гены *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*. Гены, кодирующие *TLR7* и *TLR8*, идентичны на 42,3% и лока-

лизованы на X-хромосоме (Xp22). Ген *TLR9* картирован на коротком плече 3 хромосомы (3p21.3) и сцеплен с такими генами, как *MYD88* и *CAMP*, которые находятся в регионе, содержащем гены опухолевого роста (табл. 2).

Показаны ассоциации полиморфизмов генов *TLRs* с риском развития таких опухолей, как рак желудка и рак простаты, в патогенезе которых хроническое воспаление играет большую роль. SNPs в гене *TLR2* могут приводить к изменению восприимчивости к различным инфекционным агентам. Полиморфный маркер *Arg753Gln* в гене *TLR2* расположен в области, кодирующей TIR-домен, и связан с увеличением риска развития сепсиса, вызванного грамотрицательными бактериями в кавказской популяции. Jelavic и соавт. показали, что другой полиморфный маркер, который располагается в гене *TLR2* – (GT) микросателлитный повтор во втором интроне, ассоциирован с развитием колоректального рака [57]. Показана ассоциация полиморфизма в промо-

торной области гена *TLR2* (-16933T/A) с образованием лимфом (табл. 2).

TLR4 является рецептором, распознающим ЛПС. SNP в гене *TLR4* также связаны с риском развития воспалительных и онкологических процессов. Показано, что SNP *Asp299Gly* и *Thr399Ile*, которые локализованы в третьем экзоне гена *TLR4*, ассоциированы с восприимчивостью к некоторым инфекционным болезням: сепсис, малярия и также *Helicobacter pylori* инфекция, которая является причиной рака желудка. SNPs способствуют нарушению структуры паттерн-распознающего домена *TLR4*, что может приводить к снижению распознавания ЛПС [34]. Многими авторами было показано, что вышеперечисленные полиморфные маркеры ассоциированы с развитием рака желудка (табл. 2). Возможные механизмы вклада *TLR4* в развитие рака желудка будут рассмотрены позже. Полный генетический анализ SNPs гена *TLR4* показал ассоциацию между редкой мутацией *G11481C* в области 3'UTR гена с риском развития рака простаты. Генотипы *GC* и *CC* вышеуказанного полиморфного маркера были найдены у 39% пациентов с риском развития рака простаты до 65 лет.

В других исследованиях была показана положительная корреляция между SNPs в гене *TLR9* с заболеваниями. Следует отметить, что ген *TLR9* локализуется в районе генов-супрессоров опухолевого роста на коротком плече 3 хромосомы человека. Этот район ассоциирован с раком груди, раком почки и другими. В промоторной области гена *TLR9* был определен полиморфный маркер -1237 T/C, который связан с раком желудка. Другой кластер генов – *TLR1-TLR6-TLR10* – ассоциирован с риском развития рака простаты [49].

Вклад микробной компоненты в опухолеобразование часто связывают с воспалительными процессами. На примере *H. pylori* инфекции можно представить роль полиморфных маркеров в генах *TLRs* в риске развития опухоли. Многими авторами было показано, что инфекция, вызванная *H. pylori*, является основной причиной хронического гастрита и рака желудка. Известно, что патогены *H. pylori* могут взаимодействовать с *TLRs*, а также что полиморфизмы в генах, белковые продукты которых участвуют в реакциях врожденного иммунитета, связаны с реализацией ответа на инфекцию. *TLR4* был идентифицирован как потенциальный сигнальный рецептор для распознавания *H. pylori* клетками эпителия желудка. Полиморфный маркер *Asp299Gly* был ассоциирован с различными инфекционными заболеваниями: с воспалительными заболеваниями кишечника, с септическим шоком и др. Нарушение передачи сигналов с *TLR4* в конечном счете приводит к увеличению воспалительного ответа с серьезным разрушением ткани. Суще-

ствует гипотеза о том, что полиморфный маркер в гене *TLR4* (+896A>G) ассоциирован с активацией воспалительных реакций при инфекции, вызванной *H. pylori*. Этот фенотип связан с атрофией желудка и с гипохлорией, которые являются факторами риска развития рака желудка. Была показана ассоциация этого полиморфного маркера с предраковыми изменениями желудка, а также с гипохлорией (относительный риск – 7,7) и с атрофией желудка.

Таким образом, на опухолеобразование может влиять не только активация или инактивация *TLRs* *in vivo*, но также и непосредственные мутации в генах рецепторов.

Взаимосвязь полиморфизмов генов хемокинов с онкологическим процессом

По данным литературы известно, что хемокины играют немаловажную роль в развитии онкологического процесса, в метастазировании и т.д. Следовательно, огромный интерес представляет изучение SNP и мутаций в генах хемокинов и поиск их ассоциации с онкологией. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) характеризуется неконтролируемой пролиферацией миелоидных клеток-предшественников в костном мозге. Хемокиновый рецептор *CXCR4* и молекула *CXCL12* активно участвуют в направленной миграции данных опухолевых клеток. Dommange и соавт. показали, что полиморфизм *801-G/A* гена *CXCL12* ассоциирован с увеличением количества blastов в крови и количеством экстрамедуллярных метастатических очагов. Этот же полиморфизм связан с высоким уровнем экспрессии белка. Так, было показано, что у носителей *801-A/A* генотипа определяли повышение периферических blastов в крови относительно показателя в группе здоровых доноров, среди которых доминировали носители *801-G/G*. Экспрессия *CXCR4* также коррелировала с увеличением количества blastов в крови [15].

Известно, что полиморфизмы в генах хемокинов и их рецепторов влияют на развитие рака легких. Первые ассоциации между полиморфизмом генов и раком легких были показаны в 2004 году. Было показано, что полиморфизм, локализованный в промоторной области гена *CXCL8*, является «протективным» относительно рака легких у женщин. Показано, что риск развития рака легких немелкоклеточного резко сократился среди женщин с генотипом *CXCL8-251-A/A* (OR = 0,2). Li N. и соавт. показали, что у пациентов с генотипом AA в гене *CXCL12* ассоциирован с более тяжелым течением заболевания и более неблагоприятным прогнозом [33].

Выявлено, что маркер *CX3CR1-1249* является «протективным», но только среди пациентов, прошедших операцию. Пациенты с этим маркером выживали в течение значительно более

длительного периода (в 2 раза чаще). Вследствие этого авторы предположили, что данный маркер может быть предиктором выживаемости при оперированной глиобластоме [33].

Исследований, направленных на изучение влияния полиморфизмов генов хемокинов и их рецепторов на развитие онкологического процесса, крайне мало. Имеется острая необходимость в продолжении изучения полиморфизма генов системы хемокинов и других факторов врожденного иммунитета при онкологической патологии.

Заключение

Активация TLR-опосредованных механизмов врожденного иммунитета может способствовать озлокачествлению клеток, росту опухоли и защите опухоли от механизмов иммунитета и от

апоптоза. В то же время имеются данные о том, что агонисты TLRs ингибируют пролиферацию клеток и приводят к гибели опухолевых клеток. Известно, что активация TLRs приводит к выработке провоспалительных цитокинов, хемокинов и др. А хемокины могут действовать на опухолевые клетки двояко: как увеличивать активность и приводить к метастазированию, так и блокировать данные процессы. Таким образом, можно сделать заключение о том, что TLR и хемокины, которые относятся к TLR-опосредованному пути, имеют большое значение при онкогенезе. Затронутые в обзоре вопросы требуют дальнейшего многоуровневого изучения (на уровне полиморфных маркеров, на уровне межмолекулярных и межклеточных взаимодействий), в результате которого появится возможность обоснования новых подходов к терапии рака, а также создания вакцины против рака.

Список литературы / References

1. Филина А.Б., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Лабжинов П.А., Парфенова Т.М., Зверев В.В. Изучение лиганд-опосредованного хемотаксиса клеток макрофагальной линии U93 // Медицинская иммунология, 2014. № 5. С. 443-448. [Filina A.B., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Labzhinov P.A., Parfenova T.M., Zverev V.V. The study of ligand-mediated chemotaxis of macrophage line cells U93. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, no. 5, pp. 443-448. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-5-443-448.
2. Bauer A.K., Dixon D., DeGraff L.M., Cho H.Y., Walker C.R., Malkinson A.M., Kleeberger S.R. Toll-like receptor 4 in butylated hydroxytoluene-induced mouse pulmonary inflammation and tumorigenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005, Vol. 97, no. 23, pp. 1778-1781.
3. Barbieri F., Bajetto A., Thellung S., Würth R., Florio T. Drug design strategies focusing on the CXCR4/CXCR7/CXCL12 pathway in leukemia and lymphoma. *Expert Opin. Drug. Discov.*, 2016, Vol. 11, no. 11, pp. 1093-1109.
4. Bednarczyk M., Muc-Wierzgoń M., Walkiewicz K., Kokot T., Fatyga E., Mazurek U. Profile of gene expression of TLR-signaling pathways in colorectal cancer tissues. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2017, Vol. 30, no. 3, pp. 322-326.
5. Ben-Baruch A. Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors. *Clin. Exp. Metastasis.*, 2008, Vol. 25, no. 4, pp. 345-356.
6. Cai Z., Sanchez A., Shi Z., Zhang T., Liu M., Zhang D. Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. *Cancer Research*, 2011, Vol. 71, no. 7, pp. 2466-2475.
7. Cannova J., Breslin S.J.P., Zhang J. Toll-like receptor signaling in hematopoietic homeostasis and the pathogenesis of hematologic diseases. *Front Med.*, 2015, Vol. 9, no. 3, pp. 288-303.
8. Cataisson C., Salcedo R., Hakim S., Moffitt B.A., Wright L., Yi M., Stephens R., Dai R.M., Lyakh L., Schenten D., Yuspa H.S., Trinchieri G. IL-1R-MyD88 signaling in keratinocyte transformation and carcinogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 2012, Vol. 209, no. 9, pp. 1689-1702.
9. Cherfils-Vicini J., Platonova S., Gillard M., Laurans L., Validire P., Caliendo R., Magdeleinat P., Mami-Chouaib F., Dieu-Nosjean M.C., Fridman W.H., Damotte D., Sautès-Fridman C., Cremer I. Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010, Vol. 120, no. 4, pp. 1285-1297.
10. Chin A.I., Miyahira A.K., Covarrubias A., Teague J., Guo B., Dempsey P.W., Cheng G. Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance. *Cancer Research*, 2010, Vol. 70, no. 7, pp. 2595-2603.
11. Chew V., Tow C., Huang C., Bard-Chapeau E., Copeland N.G., Jenkins N.A., Weber A., Lim K.H., Toh H.C., Heikenwalder M., Ng I.O., Nardin A., Abastado J.P. Toll-like receptor 3 expressing tumor parenchyma and infiltrating natural killer cells in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 2012, Vol. 104, no. 23, pp. 1796-1807.
12. D'Alterio C., Nasti G., Polimeno M., Ottaiano A., Conson M., Circelli L., Botti G., Scognamiglio G., Santagata S., De Divitiis C., Nappi A., Napolitano M., Tatangelo F., Pacelli R., Izzo F., Vuttariello E., Botti G., Scala S. CXCR4-CXCL12-CXCR7, TLR2-TLR4, and PD-1/PD-L1 in colorectal cancer liver metastases from neoadjuvant-treated patients. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 12, e1254313. doi: 10.1080/2162402X.2016.1254313.
13. Dapito D.H., Mencin A., Gwak G.Y., Pradere J.P., Jang M.K., Mederacke I., Caviglia J.M., Khiabani H., Adeyemi A., Bataller R., Lefkowitz J.H., Bower M., Friedman R., Sartor R.B., Rabadan R., Schwabe R.F. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell*, 2012, Vol. 21, no. 4, pp. 504-516.
14. Diamond M.S., Kinder M., Matsushita H., Mashayekhi M., Dunn G.P., Archambault J.M., Lee H., Arthur C.D., White J.M., Kalinke U., Murphy K.M., Schreiber R.D. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 208, no. 10, pp. 1989-2003.

15. Dommange F, Cartron G., Espanel C., Gallay N., Domenech J., Benboubker L., Ohresser M., Colombat P., Binet C., Watier H., Herault O. CXCL12 polymorphism and malignant cell dissemination/tissue infiltration in acute myeloid leukemia. *FASEB Journal*, 2006, Vol. 20, no. 11, pp. 1913-1915.
16. Elmusrati A.A., Pilborough A.E., Khurram S.A., Lambert D.W. Cancer-associated fibroblasts promote bone invasion in oral squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 2017, Vol. 117, no. 6, pp. 867-875.
17. El-Omar E.M., Ng M.T., Hold G.L. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene*, 2008, Vol. 27, no. 2, pp. 244-252.
18. Fabbri M., Paone A., Calore F., Galli R., Gaudio E., Santhanam R., Lovat F., Fadda P., Mao C., Nuovo G.J., Zanesi N., Crawford M., Ozer G.H., Wernicke D., Alder H., Caligiuri M.A., Nana-Sinkam P., Perrotti D., Croce C.M. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 31, pp. 2110-2116.
19. Fuertes M.B., Kacha A.K., Kline J. Seng-Ryong Woo, David M. Kranz, Kenneth M. Murphy, Thomas F. Gajewski-corresponding. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α + dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 208, no. 10, pp. 2005-2016.
20. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Veena K., Guan Jun C., Leona L., G. Scott W., Steven M. Albelda 1 Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 2009, Vol. 16, no. 3, pp. 183-194
21. Garaude J., Kent A., van Rooijen N., Blander J.M. Simultaneous targeting of toll- and nod-like receptors induces effective tumor-specific immune responses. *Science Translational Medicine*, 2012, Vol. 4, no. 120, 120ra16. doi: 10.1126/scitranslmed.3002868.
22. Ignatz-Hoover J.J., Wang H, Moreton S.A., Chakrabarti A., Agarwal M.K., Sun K., Gupta K., Wald D.N. The role of TLR8 signaling in acute myeloid leukemia differentiation. *Leukemia*, 2015, Vol. 29, no. 4, pp. 918-926.
23. Itoh G., Chida S., Yanagihara K., Yashiro M., Aiba N., Tanaka M. Cancer-associated fibroblasts induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumours. *Oncogene*, 2017, Vol. 36, no. 31, pp. 4434-4444.
24. Jing Yang, Min Li, Qi Chang Zheng. Emerging role of Toll-like receptor 4 in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatocell Carcinoma*, 2015, Vol. 2, pp. 11-17.
25. Johdi N.A., Mazlan L., Sagap I., Jamal R. Profiling of cytokines, chemokines and other soluble proteins as a potential biomarker in colorectal cancer and polyps. *Cytokine*, 2017, Vol. 99, pp. 35-42.
26. Gomes Lopes J.A., Borges-Canha M., Pimentel-Nunes P. Innate immunity and hepatocarcinoma: Can toll-like receptors open the door to oncogenesis? *World J. Hepatol.*, 2016, Vol. 8, no. 3, pp. 162-182.
27. Joyce J.A., Pollard J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Rev. Cancer*, 2009, Vol. 9, no. 4, pp. 239-252.
28. Kim H.Y., Lee S.Y., Kim D.Y., Moon J.Y., Choi Y.S., Song I.C., Lee H., Yun H.J., Kim S., Jo D.Y. Expression and functional roles of the chemokine receptor CXCR7 in acute myeloid leukemia cells. *Blood Res.*, 2015, Vol. 50, no. 4, pp. 218-226.
29. Kim S., Takahashi H., Lin W.W. Descargues P., Grivennikov S., Kim Y., Luo J.L., Karin M. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*, 2009, Vol. 457, no. 7225, pp. 102-106.
30. Krieg A.M. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, Vol. 117, no. 5, pp. 1184-1194.
31. Lazennec G., Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. A comprehensive review of the role of chemokines and their receptors in cancer and cancer-associated inflammation. *Trends Mol. Med.*, 2010, Vol. 16, no. 3, pp. 133-144.
32. Lee M.S., Kim Y.J. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu. Rev. Biochem.*, 2007, Vol. 76, pp. 447-480.
33. Li N., Zhou P., Zheng J. Jieqiong D., Hongchun W., Wei L., Fang L., Hongbin L., Jiachun L., Yifeng Z. and Chun Z. A polymorphism rs12325489C>T in the lincRNA-ENST00000515084 exon was found to modulate breast cancer risk via GWAS-based association analyses. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 5, e98251. doi: 10.1371/journal.pone.0098251.
34. Li Y., Kundu P., Seow S.W. de Matos C.T., Aronsson L., Chin K.C., Kärre K., Pettersson S., Greicius G. Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APCMin/+ mice. *Carcinogenesis*, 2012, Vol. 33, no. 6, pp. 1231-1238.
35. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*, 2008, Vol. 454, no. 7203, pp. 436-444.
36. Masayuki F, Yasmin H., Daisy C., Jason C., Anli C., Keith B., Tyralee G., David H., Ruliang X., Maria T.A. Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2009, Vol. 15, no. 7, pp. 997-1006.
37. McGettrick A.F., O'Neill L.A. Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. *Br. J. Haematol.*, 2007, Vol. 139, pp. 185-193.
38. Mills S.C., Goh P.H., Kudatsih J., Ncube S., Gurung R., Maxwell W., Mueller A. Cell migration towards CXCL12 in leukemic cells compared to breast cancer cells. *Cell Signal.*, 2016, Vol. 28, no. 4, pp. 316-324.
39. Monlish D.A., Bhatt S.T., Schuettelpelz L.G. The role of Toll-like receptors in hematopoietic malignancies. *Front Immunol.*, 2016, no. 7, p. 390.
40. Paradis A., Bernier S., Dumais N. TLR4 induces CCR7-dependent monocytes transmigration through the blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.*, 2016, no. 295-296, pp. 12-17.
41. Patsialou A., Wyckoff J., Wang Y. Sumanta G., E. Richard Stanle, J., Condeelis S. Invasion of human breast cancer cells *in vivo* requires both paracrine and autocrine loops involving the colony-stimulating factor-1 receptor. *Cancer Res.*, 2009, Vol. 69, no. 24, pp. 9498-9506.
42. Peng G., Guo Z., Kiniwa Y. Voo K.S., Peng W., Fu T., Wang D.Y., Li Y., Wang H.Y., Wang R.F. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function. *Science*, 2005, Vol. 309, no. 5739, pp. 1380-1384.

43. Rakoff-Nahoum S., Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science*, 2007, Vol. 317, no. 5834, pp. 124-127.
44. Rhee S.H., Im E., Pothoulakis C. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology*, 2008, Vol. 135, no. 2, pp. 518-528.
45. Salcedo R., Worschech A., Cardone M. Jones Y., Gyulai Z., Dai R.M., Wang E., Ma W., Haines D., O'hUigin C., Marincola F.M., Trinchieri G. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *The Journal of Experimental Medicine*, 2010, Vol. 207, no. 8, pp. 1625-1636.
46. Schön M.P., Schön M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene*, 2008, Vol. 27, no. 2, pp. 190-199.
47. Rousseau S., Martel G. Gain-of-function mutations in the toll-like receptor pathway: TPL2-Mediated ERK1/ERK2 MAPK activation, a path to tumorigenesis in lymphoid neoplasms? *Front. Cell Dev. Biol.*, 2016, no. 4, p. 50.
48. So E.Y., Ouchi T. The application of Toll like receptors for cancer therapy. *International Journal of Biological Sciences*, 2010, Vol. 6, no. 7, pp. 675-681.
49. Tazzyman S., Lewis C.E., Murdoch C. Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int. J. Exp Pathol.*, 2009, Vol. 90, no. 3, pp. 222-231.
50. Yu P., Lübben W., Slomka H., Gebler J., Konert M., Cai C., Neubrandt L., Prazeres da Costa O., Paul S., Dehnert S., Döhne K., Thanisch M., Storsberg S., Wiegand L., Kaufmann A., Nain M., Quintanilla-Martinez L., Bettio S., Schnierle B., Kolesnikova L., Becker S., Schnare M., Bauer S. Author information Nucleic acid-sensing Toll-like receptors are essential for the control of endogenous retrovirus viremia and ERV-induced tumors. *Immunity*, 2012, Vol. 37, no. 5, pp. 867-879.
51. Yusuf N., Nasti T.H., Long J.A. Mohammed N., Alan P.L., Hui Xu, Craig A. Elmet's Protective role of Toll-like receptor 4 during the initiation stage of cutaneous chemical carcinogenesis. *Cancer Research*, 2008, Vol. 68, pp. 615-622.

Авторы:

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ; ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Филина А.Б. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Давыдова Н.В. — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ганковская Л.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии, ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Зверев В.В. — д.б.н., профессор, академик РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; First Moscow I.M. Sechenov State Medical University; Russian National N.I. Pirogov Research Medical University; Moscow, Russian Federation

Filina A.B., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; First Moscow I.M. Sechenov State Medical University; Moscow, Russian Federation

Davydova N.V. — PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, First Moscow I.M. Sechenov State Medical University, Moscow, Russian Federation

Gankovskaya L.V. — PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, Russian National N.I. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Zverev V.V., PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; First Moscow I.M. Sechenov State Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 09.08.2017

Отправлена на доработку 25.09.2017

Принята к печати 12.10.2017

Received 09.08.2017

Revision received 25.09.2017

Accepted 12.10.2017

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ СЕМЕЙСТВА ИНТЕРЛЕЙКИНА-36 В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ПСОРИАЗА

Пашкин А.Ю.¹, Воробьева Е.И.², Хайрутдинов В.Р.¹, Белоусова И.Э.¹,
Самцов А.В.¹, Гарабаджиу А.В.²

¹ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства образования РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В последнее десятилетие значительно расширились представления об иммунных механизмах развития псориаза. В данном обзоре описаны биологические свойства цитокинов семейства интерлейкина-36 (IL-36) и их роль в патогенезе бляшечного псориаза, генерализованного пустулезного псориаза и псориатического артрита. Кератиноциты и дендритные клетки являются основными источниками IL-36 в коже. Продукция данного цитокина многократно усиливается при воспалении. Проведенные исследования показали, что в пораженной коже больных псориазом наблюдается повышенная экспрессия IL-36α и IL-36γ. IL-36γ можно рассматривать в качестве специфического маркера псориаза, который не встречается при других воспалительных заболеваниях кожи (нейродермит, красный плоский лишай, экзема). Уровень этого цитокина коррелирует с тяжестью псориаза и снижается после анти-TNFα-терапии. Высокий уровень цитокинов IL-36 в области псориатических высыпаний коррелирует с повышенной концентрацией в коже провоспалительных TNFα, IL-17, IL-22 и IFNγ. Приведены литературные данные о роли мутации гена IL-36RN, кодирующего антагонист рецептора IL-36ra, в развитии генерализованного пустулезного псориаза (ГПП). Избыточная активность агонистов IL-36, приводящая к накоплению нейтрофильных гранулоцитов в эпидермисе, может быть ключевым событием в патогенезе ГПП. В статье отражены современные представления о роли нейтрофильных гранулоцитов в развитии хронических воспалительных процессов, лежащих в основе патогенеза псориаза. Протеазы нейтрофилов катепсин G, эластаза и протеиназа-3 являются мощными IL-36-активирующими ферментами, повышающими активность цитокинов IL-36 до 500 раз. В данном обзоре описан новый механизм участия нейтрофилов в иммунном ответе – нетоз. Во время нетоза во внеклеточное пространство выделяется большое количество цитокинов, антимикробных пептидов, внутриклеточных компонентов, сериновых протеаз, которые могут быть вовлечены в иницирование и поддержание хронического воспалительного процесса при псориазе.

Появление сведений о роли новых цитокинов семейства IL-36 в качестве одних из основных медиаторов псориаза открыло новые терапевтические цели для лечения этого заболевания и разработки новых методов таргетной терапии. Специфическое блокирование передачи сигналов IL-36R или ингибирование нейтрофильных протеаз катепсина G, нейтрофильной эластазы, осуществляющих активацию членов семейства IL-36, вероятно, будет успешной стратегией в терапии псориаза.

Ключевые слова: псориаз, иммунный ответ, интерлейкины семейства IL-36, нейтрофильные гранулоциты, нейтрофильные внеклеточные ловушки, сериновые протеазы

Адрес для переписки:

Пашкин Алексей Юрьевич
ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия
имени С.М. Кирова» Министерства образования РФ
194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Лебедева, 6.
Тел.: 8 (911) 091-83-73.
E-mail: alek-pashkin@yandex.ru

Address for correspondence:

Pashkin Alexey Yu.
S.M. Kirov Military Medical Academy
194044, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Lebedev str., 6.
Phone: 7 (911) 091-83-73.
E-mail: alek-pashkin@yandex.ru

Образец цитирования:

А.Ю. Пашкин, Е.И. Воробьева, В.Р. Хайрутдинов,
И.Э. Белоусова, А.В. Самцов, А.В. Гарабаджиу
«Роль цитокинов семейства интерлейкина-36
в иммунопатогенезе псориаза» // Медицинская
иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 163–170.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-163-170

© Пашкин А.Ю. и соавт., 2018

For citation:

A.Yu. Pashkin, E.I. Vorobyeva, V.R. Khairutdinov,
I.E. Belousova, A.V. Samtsov, A.V. Garabagiou “The role
of cytokines of interleukin 36 family in immunopathogenesis
of psoriasis”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 163–170.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-163-170

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-163-170

THE ROLE OF CYTOKINES OF INTERLEUKIN 36 FAMILY IN IMMUNOPATHOGENESIS OF PSORIASIS

Pashkin A.Yu.^a, Vorobyeva E.I.^b, Khairutdinov V.R.^a, Belousova I.E.^a, Samtsov A.V.^a, Garabagiou A.V.^b

^a S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State Technological Institute (Technical University), St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Over last decade, the importance of immune mechanisms for development of psoriasis has expanded considerably. This review describes biological properties of the cytokines from the interleukin-36 (IL-36) family, and their role in pathogenesis of plaque psoriasis, generalized pustular psoriasis and psoriatic arthritis. Keratinocytes and dendritic cells (DC) are the main sources of IL-36 in the skin. Production of this cytokine is greatly enhanced by inflammation. The studies have shown that, in affected skin of psoriatic patients, an increased expression of IL-36 α and IL-36 γ is observed. IL-36 γ can be considered a specific marker of psoriasis, which is not found in other inflammatory skin diseases (neurodermatitis, lichen planus, eczema). The levels of this cytokine correlate with severity of psoriasis and decreases after anti-TNF α therapy. High level of IL-36 cytokines in the areas of psoriatic eruptions correlates with increased concentrations of pro-inflammatory TNF α , IL-17, IL-22 and IFN γ in the skin. We present literature data on the role of IL-36RN mutation which encodes the IL-36ra receptor antagonist, playing a role in the development of generalized pustular psoriasis (GPP). Excessive activity of IL-36 agonists leading to accumulation of neutrophilic granulocytes in epidermis may be a key event in the GPP pathogenesis. The article deals with modern ideas about the role of neutrophilic granulocytes in development of chronic inflammatory processes underlying pathogenesis of psoriasis. Proteases of neutrophils (cathepsin G, elastase and proteinase-3) are potent IL-36 activating enzymes that increase activity of IL-36 cytokines up to 500 times. In this review, a new mechanism (*netosis*) is suggested for the role of neutrophils in immune response. During the *netosis*, a large number of cytokines, antimicrobial peptides, intracellular components, serine proteases are released into the extracellular space. Thus, they may be involved into initiation and maintenance of a chronic inflammatory process in psoriasis.

The present information concerning a role of new IL-36 family cytokines as one of the main psoriasis mediators has opened new therapeutic goals for the treatment of this disease and development of new methods of targeted therapy. Specific blocking of IL-36R signaling, or inhibition of neutrophil proteases of cathepsin G, neutrophil elastase that activate members of the IL-36 family, is likely to be a successful strategy in the therapy of psoriasis.

Keywords: psoriasis, immune response, IL-36 family interleukins, neutrophilic granulocytes, neutrophilic extracellular traps, serine proteases

Работа выполнена при поддержке гранта Минобрнауки № 14.B25.31.0013.

Введение

Псориаз – распространенное хроническое мультифакториальное иммуноопосредованное воспалительное заболевание кожи и суставов. Значимую роль в развитии иммунного воспаления при псориазе играют провоспалительные цитокины – фактор некроза опухоли- α (TNF α), IL-1, IL-12, IL-17, IL-22 и IL-23, которые секретируются Т-лимфоцитами, дендритными клетками, кератиноцитами и другими клетками [2].

В течение последних лет появились сведения, указывающие на важную роль цитокинов семейства IL-36 в патогенезе псориаза [48]. Интерес к этому семейству возник в связи с обнаружением повышенной экспрессии IL-36 в коже при псориазе [47]. При индуцировании гипер-

экспрессии IL-36 α в коже экспериментальных животных (трансгенных мышей) у них развились высыпания, клинически сходные с поражением при псориазе и имеющие специфические патоморфологические изменения: гиперкератоз, акантоз и воспалительный клеточный инфильтрат в дерме. Инактивация рецепторов IL-36 (IL-36R) приводила к уменьшению псориазических высыпаний [5].

Биологические свойства цитокинов семейства IL-36

Семейство цитокинов IL-36 включает три агониста: IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ и антагонист рецептора IL-36ra [18]. Их синтез в норме наблюдается в различных тканях, преимущественно в коже, миндалинах, легких, кишечнике и головном мозге [18]. Цитокины семейства IL-36 секретируются кератиноцитами, дермальными дендритными клетками (ДК), клетками Лангерганса, Т-лимфоцитами, эпителием слизистых оболочек, а также моноцита-

ми и макрофагами [11, 16, 18, 48]. IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ оказывают провоспалительный эффект посредством связывания со специфическим рецептором IL-36R через активацию митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) и ядерного фактора κ B (NF- κ B) [20, 45]. Активируя факторы транскрипции, они способствуют повышению секреции иммунными клетками провоспалительных цитокинов [47]. Рецептор IL-36R обнаружен на поверхности кератиноцитов, ДК и наивных Т-лимфоцитов (Th0) [48, 49]. Антагонист рецептора IL-36ra блокирует активацию сигнальных путей, в результате чего сигнал с поверхности клетки не проводится на ядро [46].

Кератиноциты и ДК являются основными источниками IL-36 в коже. Продукция данного цитокина многократно усиливается при воспалении [50]. Действие IL-36 на миелоидные ДК приводит к усилению экспрессии на их поверхности костимулирующих молекул (CD40, CD83, CD86), главного комплекса гистосовместимости (МНС), а также секреции ими IL-1 β , IL-6 и IL-12. Цитокины семейства IL-36 стимулируют пролиферацию Th0 и продукцию ими IL-2, который обладает мощным пролиферативным потенциалом в отношении Т-хелперов [49]. Появление рецептора IL-36R на поверхности Th0 на ранних стадиях указывает на то, что цитокины IL-36 принимают активное участие в созревании Т-клеток [34, 50]. Vigne S. и соавт. (2012) продемонстрировали, что в этот процесс вовлечен преимущественно IL-36 β , который в присутствии IL-12, секретлируемого антигенпрезентирующими клетками, индуцирует дифференцировку Th0 в Th1. Кроме того, IL-36 совместно с IL-12 стимулирует продукцию CD4⁺Т-клетками интерферона- γ (IFN γ), IL-4 и, в меньшей степени, IL-17 [49]. Аналогично представителям семейства IL-1, IL-36 β по механизму аутокринно-паракринной регуляции может поддерживать собственную экспрессию, приводя к хронизации воспаления [6, 23].

Цитокины семейства IL-36 индуцируют появление на поверхности кератиноцитов хемокинов CXCL1, CXCL8, CCL3, CCL5, и CCL20, а также секрецию ими антимикробных пептидов (β -дефенсин, белок S100) и матриксных металлопротеиназ, что приводит к миграции Т-лимфоцитов и ДК в зону воспаления [12]. IL-36 γ стимулирует продукцию кератиноцитами, ДК и Т-клетками ряда провоспалительных цитокинов – IL-6, IL-12, TNF α и IL-23 [7, 12, 22, 48].

Роль цитокинов семейства IL-36 в патогенезе бляшечного псориаза

Проведенные исследования показали, что в пораженной коже больных псориазом наблюдается повышенная экспрессия IL-36 α и IL-36 γ [5, 23]. IL-36 γ можно рассматривать в качестве специ-

фического маркера псориаза, который не встречается при других воспалительных заболеваниях кожи (нейродермит, красный плоский лишай, экзема). Уровень этого цитокина коррелирует с тяжестью псориаза, снижается после анти-TNF α -терапии [9].

Изучая на экспериментальных животных индуцированный имиквимодом псориаз, Tortola L. и соавт. (2012) установили, что цитокины IL-36 регулируют рекрутирование иммунокомпетентных клеток в кожу и усиливают экспрессию $\gamma\delta$ -Т-клетками IL-17A. Было показано, что блокирование передачи сигнала на уровне IL-36R приводило к уменьшению в коже количества нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов, значительному снижению экспрессии IL-17A $\gamma\beta$ -Т-клетками и разрешению псориазических высыпаний [44]. Цитокины IL-17A, IFN γ , TNF α , IL-22 стимулируют продукцию кератиноцитами агонистов IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ [6, 14, 23, 33]. Представители семейства IL-36, в свою очередь, могут индуцировать секрецию кератиноцитами TNF α , IL-6 и антимикробных пептидов. Высокий уровень цитокинов IL-36 в области псориазических высыпаний коррелирует с повышенной концентрацией в коже TNF α , IL-17, IL-22 и IFN γ [6]. При псориазе экспрессируемые IL-36 α и IL-1 α неразрывно связаны между собой, каждый из цитокинов усиливает секрецию другого. Являясь агонистами, они потенцируют развитие воспаления других провоспалительных цитокинов [32]. Мишенью цитокинов семейства IL-36 являются кератиноциты, ДК и Т-лимфоциты кожи. Усиление продукции этими клетками провоспалительных медиаторов приводит к формированию дермальных инфильтратов и гиперпролиферации кератиноцитов [12].

Опыты на экспериментальных животных показали, что внутрикожные инъекции IL-36 α вызывали значительное повышение уровня мРНК IL-17A, IL-23, TNF α , IFN γ , ряда хемокинов, факторов роста и антимикробных белков в коже.

Введение иммунодефицитным мышам, которым был пересажен участок пораженной кожи больного псориазом, IL-36R-нейтрализующих моноклональных антител приводило к клиническому улучшению и существенному уменьшению эпидермальной гиперплазии и других патоморфологических изменений, характерных для псориаза [4].

Генерализованный пустулезный псориаз и IL-36

Выявлена ассоциация между мутацией гена IL-36RN, кодирующего антагонист рецептора IL-36ra, и развитием генерализованного пустулезного псориаза (ГПП) – редкой и тяжелой формы заболевания, характеризующейся формированием на коже стерильных пустул вследствие

массивной инфильтрации эпидермиса нейтрофильными гранулоцитами [31, 42].

В 2011 году Marrakchi и соавт. первыми описали взаимосвязь между рецессивной мутацией гена IL-36RN и ГПП [31]. Последующие исследования показали, что большинство идентифицированных мутаций гена IL-36RN у больных ГПП приводит к полному отсутствию или значительной инактивации IL-36 α [42]. Нарушение баланса агонист/антагонист влечет за собой чрезмерное усиление продукции провоспалительных цитокинов: IL-1 α , IL-6, IL-8 и TNF α вследствие бесконтрольной активности агонистов IL-36R [3, 35]. При ГПП в эпидермисе обнаружена повышенная секреция IL-36 α и IL-36 γ кератиноцитами, окружающими нейтрофильные пустулы. В отличие от бляшечного псориаза, наблюдается выраженная экспрессия IL-1 и IL-36, низкая – IL-17A и IFN γ . Эти данные свидетельствуют о том, что избыточная активность агонистов IL-36, приводящая к накоплению нейтрофильных гранулоцитов в эпидермисе, может быть ключевым событием в патогенезе ГПП [24, 35].

Участие цитокинов семейства IL-36 в патогенезе псориатического артрита

В эксперименте на животных, моделирующих воспаление суставов, Dereg и соавт. (2014) показали, что при артрите уровень мРНК IL-36 α и IL-36R повышен в околосуставных тканях [8]. Позже было установлено, что у пациентов с ревматоидным и псориатическим артритом в синовиальной ткани отмечается гиперэкспрессия цитокинов IL-36 α и IL-36 β . В отличие от псориатического поражения кожи при артрите основным источником IL-36 α являются CD138⁺ плазматические клетки, а мишенью этого цитокина – синовиальные фибробласты, усиленно продуцирующие под его влиянием IL-6 и IL-8 [13].

В то же время на экспериментальных животных было установлено, что для развития воспаления суставов не требуется активация IL-36R. Введение моноклональных анти-IL-36R-антител, блокирующих IL-36R, не оказывало влияния на тяжесть псориатического артрита, в то время как инъекции анти-IL-1R1-антител значительно улучшили течение заболевания [8, 10, 26]. Эти результаты показывают, что в патогенезе псориатического артрита цитокины семейства IL-36, вероятно, не являются ключевыми участниками.

Роль нейтрофильных гранулоцитов при псориазе

Характерным патоморфологическим признаком псориаза является формирование в эпидермисе субкорнеальных микроабсцессов Мунро, содержащих нейтрофильные гранулоциты и фрагменты их ядер [37]. Нейтрофилы являются первым рубежом защиты иммунной системы, который играет значимую роль в первичной

реакции на внедрение возбудителей инфекции или повреждение тканей [25]. Нейтрофильные гранулоциты не только играют важную роль в реализации ответа врожденного иммунитета, но и участвуют в активации механизмов адаптивной иммунной системы, лежащих в основе псориатического воспаления. В очаге поражения эти клетки выделяют активные формы кислорода, гидролитические ферменты и провоспалительные цитокины (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 и др.), которые способствуют гиперпролиферации и нарушению дифференцировки кератиноцитов, дилатации сосудов дермы, активации клеток иммунной системы. Нейтрофильные гранулоциты выделяют ряд медиаторов – IL-8 (CXCL8), Gro- α (CXCL1), фактор комплемента C5a, которые дополнительно рекрутируют и активируют новые нейтрофилы, создавая петлю обратной связи [39, 43]. Кроме того, нейтрофильные гранулоциты секретируют интегрин Mac-1, молекулы адгезии L-селектин (CD62L) и PECAM-1 (CD31), которые являются ключевыми факторами для миграции лейкоцитов к очагу воспаления, Toll-подобные рецепторы – TLR1, TLR2, TLR4 и TLR9, распознающие патоген-ассоциированные молекулярные структуры [15, 39]. Учитывая огромный арсенал секретируемых ферментов, цитокинов, хемокинов и рецепторов лигандов, нейтрофилы играют важную роль в инициации и поддержании хронического воспаления, в том числе при псориазе.

Сериновые протеазы нейтрофилов

Подобно другим членам семейства IL-1, цитокины IL-36 экспрессируются в виде неактивных предшественников, и для их активации требуется протеолитический процессинг [20]. В отличие от представителей семейства IL-1, для образования активных форм цитокинов IL-36 не требуется каспаза-1. В протеолитическом расщеплении IL-36 может участвовать большое количество протеаз, и активность этих ферментов имеет решающее значение в регуляции физиологических и патологических функций цитокинов [30]. Изучение протеаз, секретируемых различными клетками, извлеченными из области псориатических высыпаний, показало, что важную функцию выполняет нейтрофильная эластаза, которая расщепляет N-концевой метиониновый остаток IL-36 α . В результате образуется активная форма цитокина, способная связываться с рецептором [19, 30]. Towne и соавт. (2011) продемонстрировали возможность активации эластазой цитокинов IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ [46].

В исследовании Henry C. и соавт. (2016) было установлено, что протеазы нейтрофилов катепсин G, эластаза и протеиназа-3 являются мощными IL-36-активирующими ферментами, повышающими активность цитокинов IL-36 до 500

раз. При этом катепсин G преимущественно активирует IL-36 β , а эластаза и протеиназа-3 – IL-36 γ [20]. Цитокины IL-36, активированные катепсином G, индуцируют длительную экспрессию IL-17C, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и других воспалительных медиаторов, тогда как без протеолиза предшественники IL-36 имеют низкую активность в тех же самых условиях. Эти данные показывают, что активные цитокины семейства IL-36 могут участвовать в развитии иммунозависимого воспаления при псориазе, инициируя экспрессию разнообразных провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также стимулируя продукцию факторов роста кератиноцитов [20].

Таким образом, сериновые протеазы нейтрофилов влияют на соотношение активных и неактивных форм цитокинов IL-36 и, следовательно, могут принимать участие в регуляции IL-36-опосредованного воспаления [30].

Нейтрофильные внеклеточные ловушки

Развитие воспалительного процесса при большинстве аутоиммунных заболеваний провоцируется повреждением клеток, которое сопровождается демаскировкой аутоантигенов. Иммуноное воспаление контролируется Т-лимфоцитами и ДК. При псориазе в очаг поражения всегда мигрируют нейтрофильные гранулоциты, основной функцией которых считался фагоцитоз – поглощение антигенов и их переваривание [1, 36].

Сравнительно недавно был описан новый механизм участия нейтрофилов в иммунном ответе – нетоз. Оказалось, что нейтрофильные гранулоциты в очаге воспаления выбрасывают во внеклеточное пространство сетеподобные структуры, в состав которых входит ДНК, гистоны, а также различные компоненты гранул – кателицидин (LL-37), миелопероксидаза (MPO) и нейтрофильная эластаза (NE). Эти структуры были названы «нейтрофильные внеклеточные ловушки» (neutrophil extracellular traps, NETs) [1, 39]. Характерной стадией нетоза, предшествующей выбросу НВЛ, является деконденсация хроматина. Hu S. и соавт. (2016) обнаружили в периферической крови пациентов с псориазом значительное количество нейтрофильных гранулоцитов в состоянии нетоза, которое коррелировало с тяжестью заболевания. Кроме того, нейтрофилы, подвергающиеся нетозу, часто встречались в эпидермисе в области псориазических бляшек [21].

Выделяемые нейтрофильными гранулоцитами в процессе нетоза, пептид LL-37, NE и ингибитор секреторной лейкоцитарной протеазы (SLPI) могут формировать иммуностиму-

лирующие комплексы с внеклеточными ДНК и РНК, состоящие из пептидов и нуклеиновых кислот [36]. Уровень LL-37 в коже пациентов с псориазом значительно повышен. Этот пептид способен связываться с ДНК или РНК с образованием нерастворимых комплексов, устойчивых к действию ДНКазы и РНКазы [28, 38]. Комплексы LL-37/ДНК, взаимодействуя с TLR9 – сигнальной молекулой распознавания внеядерной ДНК, стимулируют продукцию кератиноцитами цитокина IL-1 β и интерферонов I и II типа плазматитоидными ДК. IFN α активирует макрофаги и ДК, что сопровождается увеличением экспрессии МНС и костимулирующих молекул на их поверхности. Высвобождаемый IL-1 β усиливает воспалительный процесс, а IFN γ через факторы транскрипции активирует большое количество интерферон-стимулируемых генов, кодирующих медиаторы воспаления. Комплексы LL-37/РНК через рецепторы TLR7 миелоидных ДК индуцируют синтез TNF α и IL-6 [17, 27]. Помимо кателицидина, в связывании внеклеточной ДНК в псориазических бляшках могут участвовать другие белки нейтрофильных гранулоцитов – NE и SLPI, образующие комплексы ДНК/NE/SLPI. В экспериментах *in vitro* было показано, что они являются еще более мощным индуктором синтеза IFN α , чем LL-37/ДНК [40].

Во время нетоза во внеклеточное пространство выделяется большое количество цитокинов, антимикробных пептидов, внутриклеточных компонентов, сериновых протеаз, которые могут быть вовлечены в инициирование и поддержание хронического воспалительного процесса при псориазе. Сериновые протеазы нейтрофилов катепсин G, эластаза и протеиназа-3, выделяемые во время нетоза, являются мощными IL-36-активирующими ферментами [20]. Внутриклеточные компоненты нейтрофилов, содержащие нуклеиновые кислоты и пептиды, могут выступать в качестве аутоантигенов, способных индуцировать аутоиммунный адаптивный ответ при псориазе [36].

Lin A. и соавт. (2011) обнаружили, что у больных псориазом в пораженной коже IL-17 могут продуцировать не только Th17, но и нейтрофильные гранулоциты [29]. Высокий уровень экспрессии этого ключевого цитокина псориазического воспаления отмечался в эпидермисе, особенно в субкорнеальных микроабсцессах. Предполагается, что IL-17 может усиливать развитие иммунных реакций на внеклеточные ДНК и РНК [29, 36].

Заключение

Совокупность приведенных данных указывает на значимую роль цитокинов семейства IL-36

в патогенезе псориаза. В то же время механизм их участия в развитии иммунного ответа, степень влияния на различные клетки человека еще предстоит изучить. Также недостаточно известна роль каждого из лигандов IL-36 в воспалительном процессе, при том что все они взаимодействуют с одним общим рецептором IL-36R. Требуется дополнительное исследование вопросы регуляции экспрессии и активации цитокинов, различия между активными и неактивными формами IL-36.

Появление сведений о новых цитокинах семейства IL-36 в качестве одних из основных медиаторов воспалительных заболеваний расширило знания о патогенезе псориаза, а также открыло новые

терапевтические цели для лечения этого заболевания [50]. Специфическое ингибирование передачи сигналов IL-36R путем использования рекомбинантных IL-36ra или моноклональных антител, блокирующих рецепторы, вероятно, будет успешной стратегией в терапии псориаза, особенно при пустулезных формах, ассоциированных с мутацией гена IL-36RN [41]. Другим подходом в лечении может стать ингибирование нейтрофильных протеаз катепсина G, нейтрофильной эластазы, осуществляющих активацию членов семейства IL-36 путем протеолитического процессинга. Дальнейшее изучение цитокинов семейства IL-36 и нейтрофилов при псориазе будет важным в разработке новых методов таргетной терапии.

Список литературы / References

1. Коротина О.Л., Генералов И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2012. № 4. С. 23-32. [Korotina O.L., Generalov I.I. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation, functions. *Immunopatologiya, Allergologiya, Infektologiya = International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2012, no. 4, pp. 23-32. (In Russ.)]
2. Самцов А.В., Барбинов В.В. Дерматовенерология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 432 с. [Samtsov A.V., Barbinov V.V. *Dermatovenerology: textbook*. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 432 p.]
3. Baliwag J., Barnes D.H., Johnston A. Cytokines in psoriasis. *Cytokine*, 2015, Vol. 73, no. 2, pp. 342-350.
4. Blumberg H., Dinh H., Dean C.Jr., Trueblood E.S., Bailey K., Shows D., Bhagavathula N., Aslam M.N., Varani J., Towne J.E., Sims J.E. IL-1RL2 and its ligands contribute to the cytokine network in psoriasis. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 7, pp. 4354-4362.
5. Blumberg H., Dinh H., Trueblood E.S., Pretorius J., Kugler D., Weng N., Kanaly S.T., Towne J.E., Willis C.R., Kuechle M.K., Sims J.E., Peschon J.J. Opposing activities of two novel members of the IL-1 ligand family regulate skin inflammation. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 11, pp. 2603-2614.
6. Carrier Y., Ma H.L., Ramon H.E., Napierata L., Small C., O'Toole M., Young D.A., Fouser L.A., Nickerson-Nutter C., Collins M., Dunussi-Joannopoulos K., Medley Q.G. Inter-regulation of Th17 cytokines and the IL-36 cytokines *in vitro* and *in vivo*: implications in psoriasis pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, 2011, Vol. 131, no. 12, pp. 2428-2437.
7. Chiricozzi A., Guttman-Yassky E., Suarez-Farinas M., Nogralas K.E., Tian S., Cardinale I., Chimenti S., Krueger J.G. Integrative responses to IL-17 and TNF-alpha in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 2011, Vol. 131, no. 3, pp. 677-687.
8. Derer A., Groetsch B., Harre U., Böhm C., Towne J., Schett G., Frey S., Hueber A.J. Blockade of IL-36 receptor signaling does not prevent from TNF-induced arthritis. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 8, e101954. doi: 10.1371/journal.pone.0101954.
9. D'Erme A.M., Wilschmann-Theis D., Wagenpfeil J., Hölzel M., Ferring-Schmitt S., Sternberg S., Wittmann M., Peters B., Bosio A., Bieber T., Wenzel J. IL36gamma (IL1F9) is a biomarker for psoriasis skin lesions. *J. Invest. Dermatol.*, 2015, Vol. 135, no. 4, pp. 1025-1032.
10. Dietrich D., Gabay C. IL 36 has proinflammatory effects in skin but not in joints. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2014, Vol. 10, no. 11, pp. 639-640.
11. Dietrich D., Martin P., Flacher V., Sun Y., Jarrossay D., Brembilla N., Mueller C., Arnett H.A., Palmer G., Towne J., Gabay C. Interleukin-36 potently stimulates human M2 macrophages, Langerhans cells and keratinocytes to produce pro-inflammatory cytokines. *Cytokine*, 2016, Vol. 84, pp. 88-98.
12. Foster A.M., Baliwag J., Chen C.S., Guzman A.M., Stoll S.W., Gudjonsson J.E., Ward N.L., Johnston A. IL-36 promotes myeloid cell infiltration, activation, and inflammatory activity in skin. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 12, pp. 6053-6061.
13. Frey S., Derer A., Messbacher M.E., Baeten D.L., Bugatti S., Montecucco C., Schett G., Hueber A.J. The novel cytokine interleukin-36 α is expressed in psoriatic and rheumatoid arthritis synovium. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013, Vol. 72, no. 9, pp. 1569-1574.
14. Friedrich M., Tillack C., Wollenberg A., Schaubert J., Brand S. IL36 gamma sustains a proinflammatory self-amplifying loop with IL17C in anti TNF induced psoriasiform skin lesions of patients with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel. Dis.*, 2014, Vol. 20, no. 11, pp. 1891-1901.
15. Futosi K., Fodor S., Mócsai A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.*, 2013, Vol. 17, no. 4, pp. 1185-1197.
16. Gabay C., Towne J.E. Regulation and function of interleukin-36 cytokines in homeostasis and pathological conditions. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 97, no. 4, pp. 645-652.

17. Ganguly D., Chamilos G., Lande R., Gregorio J., Meller S., Facchinetti V., Homey B., Barrat F.J., Zal T., Gilliet M. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 9, pp. 1983-1994.
18. Gresnigt M.S., van de Veerdonk F.L. Biology of IL-36 cytokines and their role in disease. *Semin. Immunol.*, 2013, Vol. 25, no. 6, pp. 458-465.
19. Gunther S., Sundberg E.J. Molecular determinants of agonist and antagonist signaling through the IL36 receptor. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 2, pp. 921-930.
20. Henry C.M., Sullivan G.P., Clancy D.M., Afonina I.S., Kulms D., Martin S.J. Neutrophil derived proteases escalate inflammation through activation of IL36 family cytokines. *Cell. Rep.*, 2016, Vol. 14, no. 4, pp. 708-722.
21. Hu S.C., Yu H.S., Yen F.L., Lin C.L., Chen G.S., Lan C.C. Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human β -defensin-2 production in epidermal keratinocytes. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 31119. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.072.
22. Johnston A., Fritz Y., Dawes S.M., Diaconu D., Al-Attar P.M., Guzman A.M., Chen C.S., Fu W., Gudjonsson J.E., McCormick T.S., Ward N.L. Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 5, pp. 2252-2262.
23. Johnston A., Xing X., Guzman A.M., Riblett M., Loyd C.M., Ward N.L., Wohn C., Prens E.P., Wang F., Maier L.E., Kang S., Voorhees J.J., Elder J.T., Gudjonsson J.E. IL-1F5, -F6, -F8, and -F9: a novel IL-1 family signaling system that is active in psoriasis and promotes keratinocyte antimicrobial peptide expression. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 4, pp. 2613-2622.
24. Johnston A., Xing X., Wolterink L., Barnes D.H., Yin Z., Reingold L., Kahlenberg J.M., Harms P.W., Gudjonsson J.E. IL-1 and IL-36 are dominant cytokines in generalized pustular psoriasis. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2016, Vol. S0091-6749, no. 16, pp. 32489-32497.
25. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 3, pp. 159-175.
26. Lamacchia C., Palmer G., Rodriguez E., Martin P., Vigne S., Seemayer C.A., Talabot-Ayer D., Towne J.E., Gabay C. The severity of experimental arthritis is independent of IL 36 receptor signaling. *Arthritis Res. Ther.*, 2013, Vol. 15, no. 2, p. 38.
27. Lande R., Ganguly D., Facchinetti V., Frasca L., Conrad C., Gregorio J., Meller S., Chamilos G., Sebasigari R., Ricciari V., Bassett R., Amuro H., Fukuhara S., Ito T., Liu Y.J., Gilliet M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2011, Vol. 73, no. 3, p. 19.
28. Lande R., Gregorio J., Facchinetti V., Chatterjee B., Wang Y.H., Homey B., Cao W., Wang Y.H., Su B., Nestle F.O., Zal T., Mellman I., Schröder J.M., Liu Y.J., Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 2007, Vol. 449, pp. 564-569.
29. Lin A.M., Rubin C.J., Khandpur R., Wang J.Y., Riblett M., Yalavarthi S., Villanueva E.C., Shah P., Kaplan M.J., Bruce A.T. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 1, pp. 490-500.
30. Macleod T., Doble R., McGonagle D., Wasson C.W., Alase A., Stacey M., Wittmann M. Neutrophil Elastase-mediated proteolysis activates the anti-inflammatory cytokine IL36 Receptor antagonist. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 24880. doi: 10.1038/srep24880.
31. Marrakchi S., Guigue P., Renshaw B.R., Puel A., Pei X.Y., Fraitag S., Zribi J., Bal E., Cluzeau C., Chrabieh M., Towne J.E., Douangpanya J., Pons C., Mansour S., Serre V., Makni H., Mahfoudh N., Fakhfakh F., Bodemer C., Feingold J., Hadj-Rabia S., Favre M., Genin E., Sahbatou M., Munnich A., Casanova J.L., Sims J.E., Turki H., Bachelez H., Smahi A. Interleukin-36-receptor antagonist deficiency and generalized pustular psoriasis. *N. Engl. J. Med.*, 2011, Vol. 365, no. 7, pp. 620-628.
32. Milora K.A., Fu H., Dubaz O., Jensen L.E. Unprocessed interleukin-36 α regulates psoriasis-like skin inflammation in cooperation with interleukin-1. *J. Invest. Dermatol.*, 2015, Vol. 135, no. 12, pp. 2992-3000.
33. Muhr P., Zeitvogel J., Heitland I., Werfel T., Wittmann M. Expression of interleukin (IL)-1 family members upon stimulation with IL-17 differs in keratinocytes derived from patients with psoriasis and healthy donors. *Br. J. Dermatol.*, 2011, Vol. 165, no. 1, pp. 189-193.
34. Mutamba S., Allison A., Mahida Y., Barrow P., Foster N. Expression of IL1Rrp2 by human myelomonocytic cells is unique to DCs and facilitates DC maturation by IL1F8 and IL1F9. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 3, pp. 607-617.
35. Onoufriadis A., Simpson M.A., Pink A.E., Di Meglio P., Smith C.H., Pullabhatla V., Knight J., Spain S.L., Nestle F.O., Burden A.D., Capon F., Trembath R.C., Barker J.N. Mutations in IL36RN/IL1F5 are associated with the severe episodic inflammatory skin disease known as generalized pustular psoriasis. *Am. J. Hum. Genet.*, 2011, Vol. 89, no. 3, pp. 432-437.
36. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity. Rev.*, 2015, Vol. 14, no. 7, pp. 633-640.
37. Raychaudhuri S.K., Maverakis E., Raychaudhuri S.P. Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmun. Rev.*, 2014, Vol. 13, no. 4, pp. 490-495.
38. Schitteck B., Paulmann M., Senyürek I., Steffen H. The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases. *Infect. Disord. Drug Targets*, 2008, Vol. 8, no. 3, pp. 135-143.
39. Schön M.P., Broekaert S.M., Erpenbeck L. Sexy again: The renaissance of neutrophils in psoriasis. *Exp. Dermatol.*, 2016, Vol. 26, no. 4, pp. 305-311.

40. Skrzeczynska-Moncznik J., Wlodarczyk A., Zabieglo K., Kapinska-Mrowiecka M., Marewicz E., Dubin A., Potempa J., Cichy J. Secretory leukocyte proteinase inhibitor-competent DNA deposits are potent stimulators of plasmacytoid dendritic cells: implication for psoriasis. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 4, pp. 1611-1617.
41. Sugiura K. The genetic background of generalized pustular psoriasis: IL36RN mutations and CARD14 gain-of-function variants. *J. Dermatol. Sci.*, 2014, Vol. 74, no. 3, pp. 187-192.
42. Sugiura K., Takemoto A., Yamaguchi M., Takahashi H., Shoda Y., Mitsuma T., Tsuda K., Nishida E., Togawa Y., Nakajima K., Sakakibara A., Kawachi S., Shimizu M., Ito Y., Takeichi T., Kono M., Ogawa Y., Muro Y., Ishida-Yamamoto A., Sano S., Matsue H., Morita A., Mizutani H., Iizuka H., Muto M., Akiyama M. The majority of generalized pustular psoriasis without psoriasis vulgaris is caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist. *J. Invest. Dermatol.*, 2013, Vol. 133, no. 11, pp. 2514-2521.
43. Tecchio C., Micheletti A., Cassatella M.A. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 508.
44. Tortola L., Rosenwald E., Abel B., Blumberg H., Schäfer M., Coyle A.J., Renauld J.C., Werner S., Kisielow J., Kopf M. Psoriasisform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 11, pp. 3965-3976.
45. Towne J.E., Garka K.E., Renshaw B.R., Virca G.D., Sims J.E. Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 14, pp. 13677-13688.
46. Towne J.E., Renshaw B.R., Douangpanya J., Lipsky B.P., Shen M., Gabel C.A., Sims J.E. Interleukin-36 (IL-36) ligands require processing for full agonist (IL-36 alpha, IL-36 beta, and IL-36 gamma) or antagonist (IL-36ra) activity. *J. Biol. Chem.*, 2011, Vol. 286, no. 49, pp. 42594-42602.
47. Towne J.E., Sims J.E. IL-36 in psoriasis. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2012, Vol. 12, no. 4, pp. 486-490.
48. Vigne S., Palmer G., Lamacchia C., Martin P., Talabot-Ayer D., Rodriguez E., Ronchi F., Sallusto F., Dinh H., Sims J.E., Gabay C. IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 22, pp. 5813-5823.
49. Vigne S., Palmer G., Martin P., Lamacchia C., Strelbel D., Rodriguez E., Olleros M.L., Vesin D., Garcia I., Ronchi F., Sallusto F., Sims J.E., Gabay C. IL-36 signaling amplifies Th1 responses by enhancing proliferation and Th1 polarization of naive CD4⁺ T cells. *Blood*, 2012, Vol. 120, no. 17, pp. 3478-3487.
50. Walsh P.T., Fallon P.G. The emergence of the IL-36 cytokine family as novel targets for inflammatory diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2016. doi: 10.1111/nyas.13280.

Авторы:

Пашкин А.Ю. — клинический ординатор кафедры кожных и венерических болезней ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия

Воробьева Е.И. — инженер НИЛ «Клеточная биотехнология» ФГБВОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Санкт-Петербург, Россия

Хайрутдинов В.Р. — д.м.н., доцент кафедры кожных и венерических болезней ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства образования РФ, Санкт-Петербург, Россия

Белюсова И.Э. — д.м.н., профессор кафедры кожных и венерических болезней ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства образования РФ, Санкт-Петербург, Россия

Самцов А.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой кожных и венерических болезней ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства образования РФ, Санкт-Петербург, Россия

Гарабаджу А.В. — д.х.н., проректор по научной работе ФГБВОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Pashkin A. Yu., Clinical Resident, Department of Dermatology and Venerology, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Vorobyeva E.I., Engineer, Research Laboratory "Cell Biotechnology", St. Petersburg State Technological Institute (Technical University), St. Petersburg, Russian Federation

Khairutdinov V.R., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Dermatology and Venerology, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Belousova I.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Dermatology and Venerology, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Samtsov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Dermatology and Venerology, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Garabagiou A.V., PhD, MD (Chemistry), Vice-Rector for Research St. Petersburg State Technological Institute (Technical University), St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 11.07.2017

Отправлена на доработку 22.09.2017

Принята к печати 12.10.2017

Received 11.07.2017

Revision received 22.09.2017

Accepted 12.10.2017

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ НЕЙРОИММУННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ ПРЕПАРАТОМ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2

Шанин С.Н.¹, Фомичева Е.Е.¹, Филатенкова Т.А.¹, Серебряная Н.Б.^{1,2,3}

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

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) — многофункциональное заболевание, которое характеризуется высокой летальностью и развитием хронической неврологической патологии у значительной части пострадавших. В иммунной системе на фоне ЧМТ развиваются разнонаправленные нарушения, затрагивающие содержание Т-, В- и НК-лимфоцитов, что приводит как к инфекционным осложнениям, так и аутосенсбилизации.

Для восстановления нарушенных нейроиммунных взаимодействий после ЧМТ представляется возможным использование иммуномодуляторов, обладающих нейропротекторной способностью и потенциалом для стимуляции регенераторной активности ЦНС. Одним из цитокинов, имеющих нейрорепаративную и нейропротекторную активность, является IL-2. Известно, что в иммунной системе IL-2 продуцируется Т-клетками в ответ на антигенную стимуляцию, а в ЦНС — клетками головного мозга. В случае нарушения продукции IL-2 как Т-лимфоцитами, так и клетками мозга, создаются условия для развития аутоиммунной и воспалительной патологии.

Настоящее исследование было направлено на изучение возможности использования рекомбинантного IL-2 (rIL-2) человека (Ронколейкин ООО «БИОТЕХ», Санкт-Петербург, Россия) для коррекции иммунных и нейроэндокринных изменений, развивающихся после ЧМТ. Работа выполнена на взрослых крысах-самцах породы Wistar, в качестве модели механической травмы головного мозга использовали модель «падающего груза». Через 72 часа после нанесения ЧМТ крысам в течение 3-х дней один раз в сутки внутривентриально вводили препарат rIL-2 в дозе 30 мг/кг. Контрольные животные получали 0,15М раствор NaCl в те же сроки. В работе показано, что в первые часы и сутки после нанесения ЧМТ в крови животных значительно повышается уровень кортикостерона и одновременно снижается концентрация тестостерона. В эти же сроки отмечено повышение цитотоксической и пролиферативной активности спленоцитов, а также увеличение количества спленоцитов, находящихся в поздней стадии апоптоза. В результате 3-дневного введения rIL-2 в дозе 30 мг/кг травмированным животным существенно повышает уровни кортикостерона и тестостерона на 7 сутки после ЧМТ. У животных, получавших rIL-2, отмечают более раннюю нормализацию показатели ци-

Адрес для переписки:

Шанин Сергей Николаевич
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. акад. Павлова, 9а.
Тел.: 8 (812) 234-15-83.
Факс: 8 (812) 234-94-93.
E-mail: shanins@yandex.ru

Address for correspondence:

Shanin Sergey N.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 9a.
Phone: 7 (812) 234-15-83.
Fax: 7 (812) 234-94-93.
E-mail: shanins@yandex.ru

Образец цитирования:

С.Н. Шанин, Е.Е. Фомичева, Т.А. Филатенкова,
Н.Б. Серебряная «Коррекция нарушений нейроиммунных
взаимодействий при экспериментальной черепно-
мозговой травме препаратом рекомбинантного
интерлейкина-2» // Медицинская иммунология, 2018.
Т. 20, № 2. С. 171-178.

doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-171-178

© Шанин С.Н. и соавт., 2018

For citation:

S.N. Shanin, E.E. Fomicheva, T.A. Filatenkova,
N.B. Serebryanaya "Correction of disturbed neuroimmune
interactions in experimental traumatic brain injury by means
of recombinant interleukin 2", *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2,
pp. 171-178.

doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-171-178

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-171-178

тотоксической и пролиферативной активности спленоцитов и соотношения количества пролиферирующих спленоцитов к числу клеток, вошедших в апоптоз. Таким образом, применение rIL-2 может скорректировать нарушение нейроэндокринных и иммунных дисфункций после ЧМТ и обеспечить снижение риска развития хронической неврологической патологии у больных ЧМТ.

Ключевые слова: экспериментальная ЧМТ, rIL-2, кортикостерон, тестостерон, цитотоксичность, пролиферация лимфоцитов, апоптоз

CORRECTION OF DISTURBED NEUROIMMUNE INTERACTIONS IN EXPERIMENTAL TRAUMATIC BRAIN INJURY BY MEANS OF RECOMBINANT INTERLEUKIN 2

Shanin S.N.^a, Fomicheva E.E.^a, Filatenkova T.A.^a, Serebryanaya N.B.^{a, b, c}

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

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^c I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Traumatic brain injury (TBI) commonly proceeds as a severe disease with high morbidity that can lead to neurological disorders in some of these patients. TBI is associated by multidirectional abnormalities of immune system, which affect quantity and functions of T-, B-, and NK-lymphocytes leading to infectious complications or autosensibilization. Restoration of the disturbances in neuroimmune interactions after TBI may be achieved by means of immunomodulators that have neuroprotective properties and may potentially initiate regenerative CNS activity. IL-2 is a cytokine that possesses neurooperative and neuroprotective properties. In immune system, IL-2 is produced by T-cells in response to antigen stimuli; in CNS, by brain cells. Lack of IL-2 production by both T-lymphocytes and brain cells increases a possibility of autoimmune and inflammatory pathologies. The objective of present study was to evaluate possible effects of human recombinant IL-2 (rIL-2, Roncoleukin[®], Biothech Ltd., Russia) upon state and correction of immune and neuro-endocrine TBI consequences. The study was performed in adult Wistar rats. Mechanical TBI was produced by the dropping load model. 72 hours after inflicting the TBI, r-IL-2, at dose 30 mg/kg was injected once a day for three times. The animals from control group received 0.15M NaCl solution over the same period. The results have shown that, within first hours and days after TBI, corticosterone levels showed a sharp increase, whereas testosterone concentrations were decreased. In parallel, an increase in cytotoxic and proliferative activity of splenocytes was revealed, as well as increased number of splenocytes at their late apoptotic stage. Three daily injections of rIL-2 resulted into a significant increase in corticosterone and testosterone levels in injured animals on the day 7 after TBI. The animals treated with rIL-2 have exhibited more rapid normalization of cytotoxic and proliferative activity of splenocytes and return to normal ratio of proliferating splenocytes vs. apoptotic cells. Therefore, usage of rIL-2 may correct neuro-endocrine and immune interaction disturbances after TBI and decrease risk of chronic neurological disorders in TBI patients.

Keywords: traumatic brain injury, experimental, rIL-2, corticosterone, testosterone, cytotoxicity, lymphocyte proliferation, apoptosis

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) — многофункциональное заболевание, которое характеризуется высокой летальностью и инвалидизацией значительной части пострадавших [3]. Первичное повреждение в области ЦНС приводит к развитию более широкого вторичного повреждения и нейровоспаления, которое в конечном счете определяет степень нейродегенерации, развитие неврологических заболеваний и поведенческих нарушений [14, 19, 20]. В иммунной системе на фоне ЧМТ развиваются разнонаправленные нарушения, затрагивающие содержание Т-, В- и NK-лимфоцитов, что приводит к брон-

хо-легочным осложнениям и аутосенсбилизации организма, в частности появлению аутоантител к антигенам структур мозга [3, 6].

В целом иммунная реакция на повреждение ткани мозга начинается с активации резидентных клеток врожденного иммунитета (микроглии и перицитов), привлечения к месту повреждения нейтрофилов, дендритных клеток, макрофагов, а также других клеточных и молекулярных компонентов [14]. Врожденная иммунная реакция, как правило, приводит к активации антигенспецифичных адаптивных иммунных реакций, причем этот переход регулируется несколькими механизмами. Важнейшим негативным регулято-

ром врожденных адаптивных иммунных реакций и острой фазы воспаления являются кортикостероиды. Активация продукции кортикостероидов инициируется провоспалительными цитокинами путем запуска гипоталамо-гипофизарной-адренкортикальной системы (ГПАКС). При экспериментальной ЧМТ активация этой адаптивной системы вызывает повышение уровня кортикостерона и снижение функциональной активности иммунокомпетентных клеток [8].

Показано, что уже в раннем периоде после ЧМТ развиваются лейко-, лимфо- и моноцитопения, снижается активность эффекторного звена клеточного иммунитета при повышении относительных количеств CD8⁺, CD20⁺, CD95⁺ клеток и уровней регулирующих воспаление цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10) в крови [1, 3, 6].

Для восстановления нарушенных нейроиммунных взаимодействий после ЧМТ представляется возможным использование иммуномодуляторов, обладающих нейропротекторной способностью и потенциалом для стимуляции регенераторной активности ЦНС [8, 11]. Одним из иммуномодуляторов, имеющих нейрорепаративную и нейропротекторную активность, является препарат рекомбинантного IL-2 (rIL-2) человека – ронколейкин (ООО «БИОТЕХ», Санкт-Петербург, Россия) [9].

Известно, что в иммунной системе IL-2 продуцируется Т-клетками в ответ на антигенную и митогенную стимуляцию, обеспечивая их пролиферацию. Однако незаменимым фактором роста IL-2 является только для регуляторных супрессорных Т-лимфоцитов (Treg), функцию и жизнеспособность которых он поддерживает [2]. Дефицит IL-2 в иммунной системе животных приводит к спонтанному развитию аутоиммунного заболевания, характеризуемого инфильтрацией Т-клеток (а в некоторых случаях и депонированием аутоантител), поражающего определенные органы и системы [13].

В ЦНС IL-2 синтезируется в нейронах головного мозга, а альфа-цепь высокоаффинного рецептора (CD25) к этому цитокину экспрессируется на клетках микроглии. В случае нарушения продукции IL-2 только клетками головного мозга (без дефицита этого цитокина в иммунной системе) количество Т-клеток, поступающих во все области мозга, удваивается, создавая условия для развития аутоиммунного повреждения ЦНС [12, 16]. То есть при дефиците IL-2 нарушения развиваются как в иммунной системе, так и в ЦНС, причем коррекция процессов, происходящих в ЦНС, возможна при периферическом введении IL-2. Так, при внутрибрюшинном введении IL-2 увеличивается активация микроглии,

приводя к метаболическим изменениям и повышению экспрессии альфа-цепи рецептора IL-2 (CD25) [12].

Клинические данные показали, что тяжелая черепно-мозговая травма вызывает снижение мозгового кровотока в 2-3 раза за счет повышения тонуса артерий и артериол, а использование rIL-2 у больных ЧМТ в ранние сроки (3, 6, 9 дни) способствовало улучшению мозгового кровотока. Кроме того, введение rIL-2 существенно нормализовало количественные показатели Т-лимфоцитов в периферической крови, что приводило к снижению частоты развития внутричерепных гнойно-воспалительных осложнений [4].

Исходя из представления о способности rIL-2 улучшать течение нейрорепаративных процессов, в работе была поставлена задача исследовать влияние rIL-2 человека на изменение посттравматических показателей защитных функций организма в условиях восстановления после ЧМТ.

Материалы и методы

Работа выполнена на взрослых крысах-самцах породы Wistar массой 200-300 г (питомник «Рапполово», Ленинградская область). Использование rIL-2 человека при изучении экспериментальной ЧМТ у крыс было возможно, поскольку этот цитокин эволюционно консервативен (последовательности гена IL-2 человека и крысы имеют гомологию в пределах 70%), и проводимые ранее исследования показали, что у грызунов rIL-2 человека изменяет параметры иммунной системы и поведенческие реакции аналогично тому, как он действует у человека [17].

В качестве модели механической травмы головного мозга использовали модель «падающего груза»: груз массой 115 г падал с высоты 120 см в центр теменной части головы животного [8]. Через 72 часа после нанесения ЧМТ крысам в течение 3-х дней ежедневно внутрибрюшинно вводили коммерческий препарат дрожжевого рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 – ронколейкин (ООО «БИОТЕХ», Санкт-Петербург, Россия), который разводили стерильным изотоническим раствором хлорида натрия, в дозе 30 мкг/кг массы животного (на весь курс – 3 инъекции).

Контрольным животным (также с ЧМТ) по той же схеме вводили 0,15М раствор NaCl в том же объеме и в те же дни. На 7-14 сутки после нанесения ЧМТ и после окончания курса лечения rIL-2 животные выводились из эксперимента декапитацией: собирали кровь для определения содержания гормонов и извлекали селезенки для постановки иммунологических тестов.

Концентрацию гормонов в сыворотке крови экспериментальных животных измеряли иммуноферментным методом с использованием ELISA kit фирмы DRG Diagnostic (Германия).

Цитотоксическую активность спленоцитов — естественных киллерных (ЕК) клеток крыс — оценивали по их способности лизировать клетки эритромиелолойкоза человека К-562 (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) *in vitro* [8]. Реакцию между ЕК-клетками селезенки крыс и клетками-мишенями (при соотношениях эффектор:мишень 2:1, 5:1 и 10:1) учитывали по восстановлению резазурина (Sigma-Aldrich, США) на планшетном флуориметре (POLARstar Omega, BMG Labtech).

Пролиферативную активность и апоптоз спленоцитов определяли по интенсивности их реакции в ответ на воздействие Конканавалина А (Sigma-Aldrich, США) в оптимальной дозе с последующей окраской ДНК клеток пропидиумом йодидом (Sigma-Aldrich, США) [8]. Учитывали эти реакции на проточном цитофлуориметре Becton Dickinson. Данные обработаны статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты

Изменение концентраций кортикостерона (Кс) и тестостерона (Тс) в крови животных после ЧМТ и введения rIL-2

Активность ГТАКС и гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы (ГГГС) как стресс-систем, функциональная активность которых отражает включение регуляторных механизмов [8], направленных на преодоление последствий ЧМТ,

оценивалась по показателям концентрации кортикостерона и тестостерона в крови животных после ЧМТ. Полученные результаты свидетельствуют, что в первые часы после ЧМТ уровни гормонов изменяются разнонаправленно: концентрация тестостерона (Тс) в крови достоверно снижается ($p < 0,05$), тогда как концентрация кортикостерона (Кс) после ЧМТ резко повышается ($p > 0,05$) (рис. 1А, Б). Снижение уровня тестостерона, как и повышение уровня кортикостерона, являются чувствительными индикаторами развития стресса и имеют адаптивный характер, направленный на оптимизацию защитных реакций [7].

Дальнейшее наблюдение выявило, что уровень кортикостерона после кратковременного пика существенно снижается до уровня интактных животных к 7-м суткам, а далее увеличивается к 14 суткам до уровня в 2 раза более высокого, чем у животных в контрольной группе (рис. 1А).

Уровень тестостерона после кратковременного падения начинает повышаться уже к концу первых суток, практически достигая нормальных значений к 3 суткам, максимальные значения регистрируются на 7-ой день, после чего возвращаются к уровню интактных животных к 14 дню после ЧМТ (рис. 1Б).

Введение rIL-2 контрольным животным (без ЧМТ) само по себе повышает концентрацию исследованных гормонов к 7-м суткам эксперимента, причем уровень Кс сохраняется повышенным и на 14 сутки по сравнению с уровнем гормона у интактных животных.

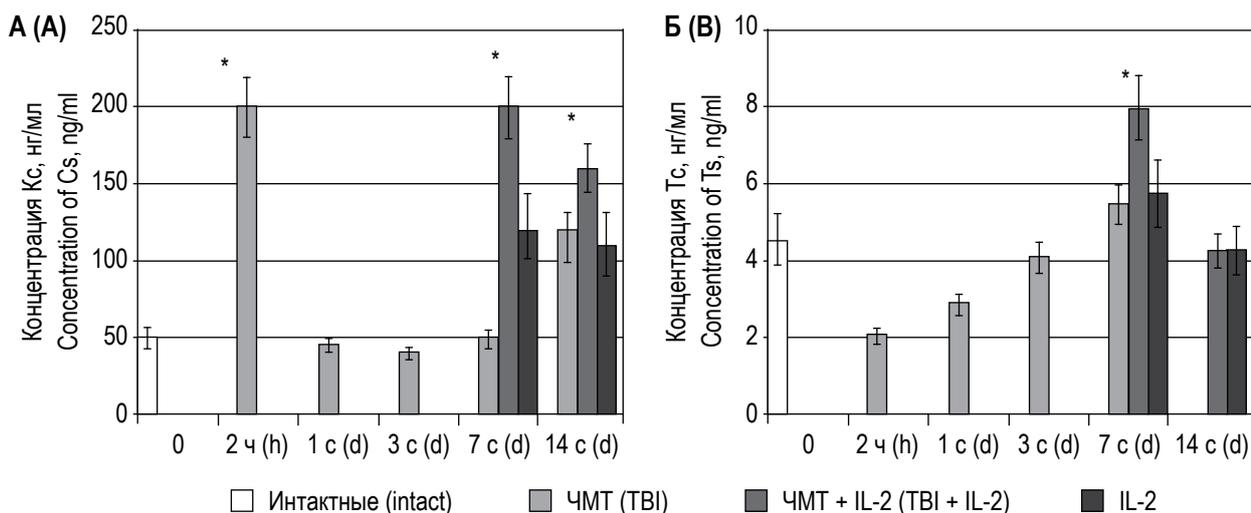


Рисунок 1. Изменение концентрации кортикостерона (Кс) нг/мл (А) и тестостерона (Тс) нг/мл (Б) у крыс, подвергнутых ЧМТ и получавших в/бр rIL-2

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с уровнем гормона у интактных животных.

Figure 1. Changes in corticosterone (Cs), ng/ml (A), and testosterone (Ts) ng/ml (B) concentrations in rats subjected to TBI and treated with rIL-2 *i/p*

Note. *, $p < 0.05$ compared to the levels of the hormone in intact animals.

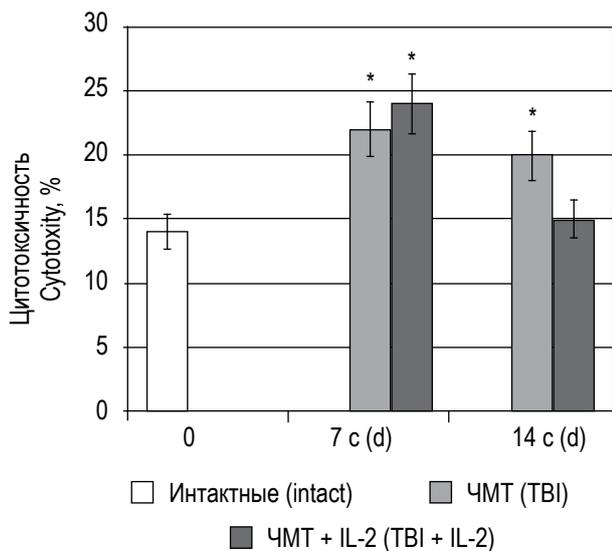


Рисунок 2. Цитотоксическая активность ЕК клеток селезенки крыс на 7-е и 14-е сутки после нанесения ЧМТ и введения rIL-2

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с показателем цитотоксической активности ЕК клеток у контрольных животных.

Figure 2. Cytotoxic activity of NK cells in the spleen of rats on the 7th and 14th day after experimental TBI and rIL-2 treatment
Note. *, $p < 0.05$ as compared with indices of NK cytotoxic activity in control animals.

Курсовое введение rIL-2 травмированным животным вызывает существенное повышение уровней и Кс, и Тс на 7 сутки после ЧМТ, как по сравнению с животными контрольной группы, не получавшими rIL-2 после травмы, так и по сравнению с животными, получившими rIL-2 без ЧМТ. К 14 суткам после ЧМТ уровень Кс остается еще повышенным, а уровень Тс сравнивается с показателями у интактных животных. То есть введение препарата rIL-2 отменяло длительное снижение уровней гормонов, вызываемое ЧМТ. Полученные результаты свидетельствуют о развитии системных нейроэндокринных регуляторных реакций при введении rIL-2.

Изменение цитотоксической и пролиферативной активности клеток селезенки после ЧМТ и введения rIL-2

На фоне гормональных нарушений, наблюдаемых после ЧМТ, изменяются и параметры клеточного иммунитета, такие как естественная цитотоксическая активность против мишеней К-562 и пролиферативная активность спленоцитов в ответ на действие Конканавалина А. Так, после окончания травмирующего воздействия и цитотоксическая, и пролиферативная активность спленоцитов остаются повышенными на 7-е

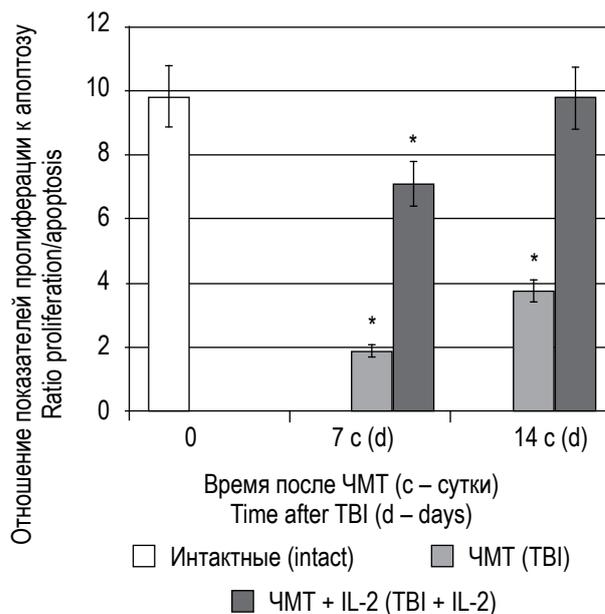


Рисунок 3. Отношение количества спленоцитов в G2/M фазе клеточного цикла к количеству клеток с гиподиплоидным набором ДНК на 7-е и 14-е сутки после нанесения ЧМТ и введения rIL-2

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с показателем у контрольных животных.

Figure 3. Ratio of G2/M-phase splenocyte numbers to amounts of cells with DNA hypodiploidy on the day 7 and 14 after TBI and rIL-2 treatment

Note. *, $p < 0.05$ as compared with the rates in the control animals.

и 14-е сутки наблюдения (рис. 2, табл. 1). Вместе с повышением пролиферативной активности наблюдается значительное увеличение количества спленоцитов с гиподиплоидным набором ДНК, находящихся в поздней стадии апоптоза (табл. 1).

Курсовое введение rIL-2 травмированным крысам не изменяет уровень активности спленоцитов в реакции естественной цитотоксичности и бласттрансформации на 7-й день после ЧМТ, но к 14-му дню эти параметры существенно снижаются до уровня активности клеток интактных животных, не получивших ЧМТ (рис. 2, табл. 1). В это же время снижается и количество апоптотических спленоцитов, что приводит к нормализации соотношения количества пролиферирующих спленоцитов к числу клеток, вошедших в апоптоз при применении rIL-2, по сравнению с группой травмированных крыс, не получивших этого препарата (рис. 3). Таким образом, анализ соотношения количества пролиферирующих спленоцитов к числу клеток, вошедших в апоптоз, показывает, что применение rIL-2 ускоряет нормализацию этого показателя у травмированных животных, что свидетельствует о восстановлении их функциональных характеристик.

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО АПОПТОТИЧЕСКИХ И ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ СПЛЕНОЦИТОВ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧМТ И ВВЕДЕНИЯ rIL-2

TABLE 1. PERCENTAGES OF APOPTOTIC AND PROLIFERATING SPLENOCYTES AFTER EXPERIMENTAL TBI AND THE rIL-2 INJECTIONS

Экспериментальные группы Experimental groups	Фазы клеточного цикла Phases of the cell cycle			
	SubG ₀	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
	апоптотические спленоциты, % apoptotic splenocytes	покоящиеся спленоциты, % resting splenocytes	пролиферирующие спленоциты, % proliferating splenocytes	
Контроль Controls	2,57±0,68	57,54±1,01	9,55±1,92	25,08±0,91
7 сутки после ЧМТ 7 th day after TBI	17,22±1,10*	29,19±3,11*	8,99±1,08	32,68±2,52*
14 сутки после ЧМТ 14 th day after TBI	8,78±0,23*	36,87±1,83*	9,16±0,84	31,18±1,40*
7 сутки после ЧМТ и введения rIL-2 7 th day after TBI + treatment with rIL-2 i/p	4,33±0,31*	43,75±2,12*	9,05±2,58	30,84±1,11*
14 сутки после ЧМТ и введения rIL-2 14 th day after TBI and treatment with rIL-2 i/p	2,72±0,22	55,37±2,93	8,88±1,20	26,62±9,04

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с количеством спленоцитов у животных контрольной группы.

SubG₀ – клетки, вступившие в апоптоз, несут неполный или гиподиплоидный набор ДНК (менее 2N).

G₀/G₁ – покоящиеся клетки (G₀) и клетки, находящиеся в фазе G₁ клеточного цикла, содержат диплоидный набор ДНК (2N).

S – в фазе синтеза клеточного цикла содержание ДНК постепенно возрастает с 2N до 4N.

G₂/M – в фазе G₂ и во время митоза содержание ДНК и количество хромосом удваиваются (4N).

Note. *, $p < 0.05$ in comparison to the number of splenocytes in control group.

SubG₀, cells which entered into apoptosis, are incomplete or hypodiploidy DNA set (less than 2N).

G₀/G₁, resting cells (G₀) and cells in G₁ phase of the cell cycle containing a diploid DNA set (2N).

S, cells in DNA-synthetic phase: gradual increase of DNA content from 2N to 4N.

G₂/M, cells in G₂ phase or mitosis (M): DNA content and double chromosome number (4N).

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют, что после ЧМТ у экспериментальных животных развиваются нейроэндокринные изменения, отражающие включение стрессорных регуляторных механизмов [8], что проявляется в снижении уровня тестостерона, значительном повышении уровня секреции кортикостерона с последующим выраженным угнетением уровня обоих гормонов. Ранее показано, что повышение концентрации эндогенного кортикостерона в физиологических пределах, например, при развитии стрессорной реакции, не только не тормозит, но и оказывает стимулирующее действие на пролиферативные процессы, оптимизирует реализацию иммунного ответа, а также индуцирует выделение ряда провоспалительных цитокинов [7]. Наблюдаемое отсутствие адаптивного повышения уровня Кс

у травмированных животных можно расценивать как неблагоприятное, связанное с риском развития гиперактивности иммунных реакций, которые могут сопровождаться как усилением воспалительного повреждения, так и развитием аутоиммунитета [18]. Длительное угнетение гормональной функции гонад также является неблагоприятным фактором, способствующим развитию депрессии и других стресс-индуцированных патологических состояний [10].

Гормональный дисбаланс, наблюдаемый у животных после нанесения ЧМТ, был ассоциирован с возрастанием цитотоксической и пролиферативной активности спленоцитов, сопровождаемой усилением апоптотической гибели значительной части клеток. Описанные нарушения нейроиммунных взаимодействий при черепно-мозговой травме в определенной степени

корректировались у крыс, получавших после повреждения рекомбинантный IL-2 человека (ронколейкин). Трехкратное введение rIL-2 как нормализовало изменения в периферической иммунной системе к 14 дню после травмы (по показателям пролиферации и апоптоза спленоцитов), так и восстанавливало уровень тестостерона и повышало уровень Кс у травмированных животных. Нормализация соотношения количества пролиферирующих спленоцитов к числу клеток, вошедших в апоптоз при применении rIL-2, может свидетельствовать об информативности этого показателя для оценки динамики иммунных процессов после ЧМТ. Опубликованные результаты клинических исследований свидетельствуют,

что введение rIL-2 (ронколейкина) пациентам с ЧМТ значительно улучшает показатели Т-клеточного иммунитета (отменяет дефицит Т-лимфоцитов и моноцитов и их функциональную недостаточность) и снижает интенсивность посттравматических воспалительных процессов, определяя позитивный исход заболевания [5].

Полученные данные позволяют предположить, что применение rIL-2 может скорректировать нарушение нейроиммунных взаимодействий после ЧМТ, препятствуя развитию дисфункций иммунной системы, что снизит риск развития хронической неврологической патологии, регистрируемой у части больных после ЧМТ [3, 15, 19].

Список литературы / References

1. Исаева Р.Х., Антонюк И.А., Гридякина А.В., Евстафьева А.Е. Иммунологические изменения при черепно-мозговой травме // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2014. № 8-2. С. 41-47. [Isaeva R.Ch., Antoniuk I.A., Gridyakina A.V., Evstafieva A.E. Immunologic changes in traumatic brain injury. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*, 2014, no. 8-2, pp. 41-47. (In Russ.)]
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 550 с. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines]. St. Petersburg: Foliant, 2008. 550 p.
3. Коновалов А.Н., Лихтерман Л.Б., Потапов А.А. Клиническое руководство по черепно-мозговой травме. Т. 1. М.: Антидор, 1998. 553 с. [Konovalov A.N., Likhтерman L.B., Potapov A.A. Clinical manual of head injury. Vol. 1]. Moscow: Antidor, 1998. 553 p.
4. Леонов А.В. Мозговой кровоток при тяжелых черепно-мозговых травмах // Общая реаниматология, 2008. Т. 4, № 2. С. 9-13. [Leonov A.V. Cerebral blood flow in severe brain injuries. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2008, Vol. 4, no. 2, pp. 9-13. (In Russ.)]
5. Леонов А.В., Иванов Г.К. Апоптоз при тяжелой черепно-мозговой травме и его изменение при иммуномодуляции ронколейкином // Иммунология, 2006. Т. 27, № 4. С. 246-248. [Leonov A.V., Ivanov G.K. Apoptosis and its changes at skull-brain injury after roncoleukin immunomodulation. *Immunologiya = Immunology*, 2006, Vol. 27, no. 4, pp. 246-248. (In Russ.)]
6. Мамытова Э.М. Динамика иммунологического ответа у пациентов с черепно-мозговой травмой в раннем посттравматическом периоде // Медицинская наука и образование Урала, 2014. Т. 15, № 3. С. 96-99. [Mamytova E.M. Dynamics of the immunological response in patients with traumatic brain injury in the acute posttraumatic period. *Meditinskaya nauka i obrazovanie Urala = Medical Science and Education of Ural*, 2014, Vol. 15, no. 3, pp. 96-99. (In Russ.)]
7. Рыбакина Е.Г., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Козинец И.А., Корнева Е.А. Активность защитных функций организма при стрессе и их коррекция препаратом деринат // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 4-5. С. 431-438. [Rybakina E.G., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Kozinec I.A., Korneva E.A. Activity of host defense functions in stress conditions by the Derinat drug. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 4-5, pp. 431-438. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2008-4-5-431-438.
8. Рыбакина Е.Г., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Филатенкова Т.А., Дмитриенко Е.В. Клеточно-молекулярные механизмы изменения защитных функций организма при черепно-мозговой травме и попытка лечения // Медицинский академический журнал, 2014. Т. 14, №4. С. 55-62. [Rybakina E.G., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Filatenkova T.A., Dmitrienko E.V. Cell-molecular mechanisms of protective function's changes under traumatic brain injury and ways for it's medication. *Meditinskiy akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*, 2014, Vol. 14, no. 4, pp. 55-62. (In Russ.)]
9. Серебряная Н.Б., Липатова Л.В., Сивакова Н.А., Василенко А.В. Рекомбинантный интерлейкин IL-2 человека как агент антиэпилептической терапии // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 3. С. 723-726. [Serebryanya N.B., Lipatova L.V., Sivakova N.A., Vasilenko A.V. The recombinant human interleukin-2 (IL-2) as the agent of antiepileptic therapies. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 3, pp. 723-726. (In Russ.)]
10. Чирков А.М., Кацья Г.В., Чиркова С.К., Гончаров Н.П. Влияние иммобилизационного стресса на гонадотропную функцию гипофиза самцов павианов гамадрилов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1989. Т. 107, № 2. С. 231-234. [Chirkov A.M., Katsiya G.V., Chirkova S.K., Goncharov N.P. Effect of immobilization stress on pituitary gonadotropin of baboon (*Papio hamadryas*). *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1989, Vol. 107, no. 2, pp. 231-234. (In Russ.)]

11. Hernandez-Ontiveros D.G., Tajiri N., Acosta S., Giunta B., Tan J., Borlongan C.V. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front. Neurol.*, 2013, Vol. 4, no. 30, pp. 1-9.
12. Huang Z., Meola D., Petitto J.M. Loss of CNS IL-2 gene expression modifies brain T lymphocyte trafficking: response of normal versus autoreactive Treg-deficient T cells. *Neurosci Lett.*, 2011, Vol. 499, no. 3, pp. 213-218.
13. Huang Z., Dauer D.J., Ha G.K., Lewis M.H., Petitto J.M. Interleukin-2 deficiency-induced T cell autoimmunity in the mouse brain. *Neurosci. Lett.*, 2009, Vol. 463, no. 3, pp. 44-48.
14. Loane D.J., Byrnes K.R. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*, 2010, Vol. 7, no. 4, pp. 366-377.
15. Menon D.K., Risdall J.E. Traumatic brain injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*, 2011, Vol. 366, no. 1562, pp. 241-250.
16. Ousman S.S., Kubes P. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Neurosci.*, 2012, Vol. 15, no. 8, pp. 1096-1101.
17. Saleem Basha N., Kewani Ghirmay, Melles Kahase. In silico comparison of interleukin-2 of Homo sapiens with different species. *Pharma Focus: The journal of Eritrean Pharmaceutical Association (ERIPA)*, 2011, Vol. 14, no. 10, pp. 32-37.
18. Sternberg E.M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 2006, Vol. 6, pp. 318-328.
19. Tobin R.P., Mukherjee S., Kain J.M., Rogers S.K., Henderson S.K., Motal H.L., Rogers M., Newell K., Shapiro L.A. Traumatic brain injury causes selective, CD74-dependent peripheral lymphocyte activation that exacerbates neurodegeneration. *Acta Neuropathologica Communications*, 2014, Vol. 2, p. 143.
20. Walker K.R., Tesco G. Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury. *Front Aging Neurosci.*, 2013, Vol. 5, pp. 29-40.

Авторы:

Шанин С.Н. — к.м.н., старший научный сотрудник, отдел общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Фомичева Е.Е. — к.б.н., старший научный сотрудник, отдел общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Филатенкова Т.А. — научный сотрудник, отдел общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Серебряная Н.Б. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник, отдел общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Shanin S.N., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Fomicheva E.E., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Filatenkova T.A., Research Associate, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Serebryanaya N.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine; St. Petersburg State University; I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 30.06.2017
Принята к печати 13.07.2017

Received 30.06.2017
Accepted 13.07.2017

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭХИНОХРОМА А, ОКСИГЕНИРОВАННЫХ КАРОТИНОИДОВ, ГИНЗЕНОЗИДА Rh2, ДИСУЛЬФАТА ЛЮТЕОЛИНА И МЕТФОРМИНА КАК СРЕДСТВ ПОТЕНЦИРОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКСОРУБИЦИНА

**Цыбульский А.В.¹, Попов А.М.^{1,2}, Климович А.А.², Артюков А.А.²,
Костецкий Э.Я.¹, Веселова М.Д.¹**

¹ ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

² ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова» Дальневосточного
отделения РАН, г. Владивосток, Россия

Резюме. Настоящая работа посвящена сравнительному исследованию потенцирующего действия ряда препаратов природного происхождения, а также метформина на противоопухолевую активность доксорубина. В условиях *in vivo* на модели асцитной карциномы Эрлиха показано повышение терапевтической эффективности доксорубина при его сочетанном применении с эхинохромом А, оксикаротиноидами, гинзенозидом Rh2, а также метформином. В исследованных концентрациях (10 мг/кг массы тела) установлено негативное влияние дисульфата лютеолина на эффективность противоопухолевой терапии. При изучении влияния этих веществ на уровень внутриклеточных АФК на первичных культурах клеток селезенки мышей с помощью селективного флуоресцентного индикатора 2',7'-дихлорфлуоресцеин-диацетата показано отсутствие положительной корреляции у изучаемых соединений между индукцией дополнительного синтеза АФК и потенцирующим действием при терапии доксорубином. У части изучаемых соединений отмечена положительная корреляция между интерферон-индуцирующей активностью и негативная корреляция между повышенным содержанием IL-1 с одной стороны и усилением противоопухолевого эффекта доксорубина с другой. Полученные результаты указывают на целесообразность дальнейшего изучения препаратов эхинохрома, гинзенозида Rh2, смеси оксигенированных каротиноидов и метформина как перспективных средств потенцирования эффективности противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: противоопухолевая активность, доксорубин, эхинохром А, гликозиды женьшеня, оксикаротиноиды, дисульфат лютеолина, метформин, активные формы кислорода, цитокины

Адрес для переписки:

Цыбульский Александр Васильевич
ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»
690000, Россия, г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27.
Тел./факс: 8 (4232) 45-77-79.
E-mail: tsybulskiy.av@dvfu.ru; avt_biotech@mail.ru

Address for correspondence:

Tsybulsky Alexander V.
Far Eastern Federal University
690000, Russian Federation, Vladivostok,
Oktyabrskaya str., 27.
Phone/Fax: 7 (4232) 45-77-79.
E-mail: tsybulskiy.av@dvfu.ru; avt_biotech@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Цыбульский, А.М. Попов, А.А. Климович,
А.А. Артюков, Э.Я. Костецкий, М.Д. Веселова
«Сравнительное изучение эхинохрома А,
оксигенированных каротиноидов, гинзенозида Rh2,
дисульфата лютеолина и метформина как средств
потенцирования противоопухолевого действия
доксорубина» // Медицинская иммунология, 2018.
Т. 20, № 2. С. 179-192.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-179-192

© Цыбульский А.В. и соавт., 2018

For citation:

A.V. Tsybulsky, A.M. Popov, A.A. Klimovich, A.A. Artyukov,
E.Ya. Kostetsky, M.D. Veselova "Comparative study of
echinochrome A, oxygenated carotenoids, ginsenoside Rh2,
luteolin disulfate and metformin as a mean to potentiate
antitumor effect of doxorubicin", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2,
pp. 179-192.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-179-192

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-179-192

COMPARATIVE STUDY OF ECHINOCHROME A, OXYGENATED CAROTENOIDS, GINSENOSE Rh2, LUTEOLIN DISULFATE AND METFORMIN AS A MEAN TO POTENTIATE ANTITUMOR EFFECT OF DOXORUBICIN

Tsybulsky A.V.^a, Popov A.M.^{a,b}, Klimovich A.A.^b, Artyukov A.A.^b, Kostetsky E.Ya.^a, Veselova M.D.^a

^a Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^b Pacific Ocean G.B. Elyakov Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. This work concerned a comparative study of potentiating effects produced by some drugs of natural origin, as well as metformin, upon antitumor activity of doxorubicin. An increased therapeutic efficacy of doxorubicin used in combination with echinochrome A, oxycarotenoids, ginsenoside Rh2, and metformin was tested in the *in vivo* Ehrlich ascites carcinoma model. The negative effect of luteolin disulfate (10 mg/kg body weight) upon efficacy of antitumor therapy was revealed. When studying the effect of these substances on the level of intracellular ROS in primary cultures of murine spleen cells, using a selective fluorescent indicator (2',7'-dichlorofluorescein-diacetate), we did not find a positive correlation between induction of excessive ROS synthesis and potentiation of doxorubicin action with the compounds studied. Some of the studied agents showed a positive correlation between interferon-inducing activity, as well as a negative correlation between increased IL-1 content, and higher antitumor effect of doxorubicin. The obtained results suggest expedience of further studies of antitumor effect potentiation using preparations of echinochrome, ginsenoside Rh2, a mixture of oxygenated carotenoids and metformin.

Keywords: antitumor activity, doxorubicin, echinochrome A, ginsenosides, oxygenated carotenoids, Rh2, luteolin disulfate, metformin, reactive oxygen species, cytokines

Список сокращений: ДР – доксорубин, АФК – активные формы кислорода, ДХФ-ДА – 2', 7'-дихлорфлуоресцеин-диацетат, ЭХА – эхинохром А, СОК – смесь оксигенированных каротиноидов, ДСЛ – дисульфат лютеолина

List of the used abbreviations: DR – doxorubicin, ROS – reactive oxygen species, DCF-DA – 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate, ECHA – echinochrome A, MOC – mixture of oxygenated carotenoids, DSL – disulfate of luteolin.

Работа выполнена при финансовой поддержке российского научного фонда (проект № 14-50-00034).

Введение

Доксорубин (ДР), относящийся к группе антрациклиновых антибиотиков, является одним из самых эффективных и популярных средств противоопухолевой терапии и применяется как в виде монотерапии, так и в составе различных химиотерапевтических схем. Механизмы противоопухолевого действия ДР реализуются посредством генотоксической активности, а также путем индукции повышенной продукции опухолевыми клетками активных форм кислорода (АФК), что

повреждает структуру биомолекул клеток-мишени и способствует их гибели (в частности за счет активации апоптозных программ). Эти эффекты в то же время ответственны за побочное действие данного препарата [11].

Интересным является вопрос о возможности сочетания ДР с препаратами, не обладающими собственной противоопухолевой активностью, но обладающими способностью модулировать различные физиологические системы организма – иммунную, нервную, цитокиновые и гормональные механизмы регуляции и др. Применение подобных препаратов может, с одной стороны, снизить тяжесть побочных эффектов химиотерапии, а с другой – повысить ее эффективность (что может обеспечить достижение клинического эффекта при применении меньших доз противоопухолевого препарата). В настоящее время подобные подходы в тактике лечения онкопатологии активно исследуются.

Среди биологически активных веществ (БАВ), получаемых из природных источников, оксигенированные каротиноиды, а именно: астаксантин (АК), лютеин и зеаксантин привлекают особое внимание исследователей в качестве новых лечебно-профилактических средств и функциональных

элементов пищи. Оксикаротиноиды занимают особое место среди низкомолекулярных природных соединений и характеризуются высоким потенциалом защиты организма от широкого круга заболеваний при отсутствии побочных и токсических эффектов. АК запатентован как биологически активная добавка и применяется в виде различных лекарственных форм [7, 8, 14].

Сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН выделен ряд нафтохинонов из морских ежей, наибольший интерес из которых вызвал 1,4-полигидроксинафтохинон эхинохром А (ЭХА) из плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis* [12]. Некоторые фармакологические эффекты ЭХА обеспечили возможность его внедрения в клинику сердечно-сосудистых и офтальмологических заболеваний в виде препарата «Гистохром» [8, 13]. На ультраструктурном уровне доказано протективное действие препаратов ЭХА при экспериментальном стрессе [12], что выражается в сохранении нормальной структуры миофибриллярного аппарата и митохондрий кардиомиоцитов у животных, улучшение митохондриального дыхательного контроля и стимулирования митохондриального биогенеза. Нарушение функции митохондриального аппарата клеток является характерной чертой многих патологических состояний. ЭХА может выступать в роли эффективного переносчика электронов между различными митохондриальными электрон-донорными и электрон-акцепторными ферментативными комплексами и тем самым уменьшать нарушения в механизмах энергогенерации [8, 9, 15]. Это имеет большое значение для поддержания здоровья в широком смысле этого слова: увеличения продолжительности жизни, улучшения использования энергии и защиты от АФК.

Применение ЭХА в стрессовых условиях не оказывает влияния на уровень половых гормонов в плазме крови и является более безопасным, чем фармакологическое действие некоторых биофлавоноидов (генестеин, лютеолин и др.), которые обладают эстрогеноподобной активностью. То есть использование ЭХА в рамках адаптации к стрессу не несет в себе риска развития комплекса дисгормональных последствий [12].

Пероральное применение ЭХА приводит к системному защитному эффекту, возможно, связанному с повышением как антиоксидантных, так и адаптационно-приспособительных механизмов защиты организма животных, которые возникают в ответ на продукцию физиологических концентраций перекиси водорода, индуцируемую ЭХА [8]. Пероральное применение ЭХА в перспективе может стать наиболее рациональным маршрутом его введения в организм человека.

Однако препараты ЭХА, помимо антиоксидантной активности, имеют гораздо более широкий позитивный спектр фармакологической активности. Так, на экспериментальных моделях атеросклероза и диабета нами показана его лечебно-профилактическая активность: ЭХА эффективно защищает углеводный и жировой обмен в организме экспериментальных животных от патологических процессов, индуцируемых аллоксаном и другими токсинами [8, 15]. Поэтому мы посчитали логичным провести исследование ЭХА как адьювантного агента доксорубина, при проведении противоопухолевой терапии как фактора защиты от развития полиорганной недостаточности, так и, возможно, фактора потенцирования противоопухолевой активности ДР.

Многолетнее изучение гликозидов женьшеня (гинзенозидов) как в азиатских, так и в европейских странах показывает, что при их применении снижается риск заболевания разными видами опухолей. Это показано не только на экспериментальных опухолевых моделях, но и на людях (данные онкоэпидемиологических исследований) [10, 25].

Гинзенозид Rh₂ в дозах от 10 до 50 мг/кг повышает биологическую реактивность интактного и опухоленесущего организма экспериментальных животных, положительно влияет на иммунную систему: стимулирует фагоцитарную активность макрофагов, усиливает продукцию активных форм кислорода и оксида азота (NO), повышает активность НК-лимфоцитов. Антиметастатическая и иммуномодулирующая активности этих гинзенозидов сочетаются со способностью оказывать прямое цитостатическое действие на опухолевые клетки. В ряде работ показано, что гинзенозид Rh₂ усиливает инфильтрацию опухоли Т-лимфоцитами и активизирует цитотоксичность лимфоцитов селезенки. Получены доказательства того, что лечение гинзенозидом Rh₂ усиливает противоопухолевый иммунологический ответ, который может быть использован для терапии меланомы и ряда других опухолей [3, 17, 21].

Исследователи считают, что действие минорных гликозидов женьшеня на опухолевые и иммунокомпетентные клетки осуществляется трансмембранно в виде сети отдельных сигнальных путей, которые дивергируют на постмембранной и цитоплазматической стадиях трансдукции гликозидных сигналов [3]. Действие этих гликозидов направлено на координацию и регуляцию механизмов, способных осуществлять переключение внутриклеточных сигналов с одного пути на другой. Доза гликозида, его химическая структура и используемая биологическая модель определя-

ют выбор пути трансдукции сигнала: например, запуск апоптозной программы или отключение программ, ведущих к пролиферации клеток (т.е. цитостатический эффект). Активация цитотоксической активности иммунокомпетентных клеток в отношении опухолевых клеток может быть обусловлена активными видами кислорода, генерируемыми НАДН-оксидазой, NO-синтазой, а также другими внутриклеточными оксидазами, опосредующими антиметастатический эффект данных гликозидов [3].

Лютеолин (ЛТ), водонерастворимый 3,4,5,7-тетрагидроксифлавоноид, является одним из наиболее изученных представителей биофлавоноидов. Изменяя активность различных ферментов, рецепторов-мишеней и сигнальных трансдукторных путей, ЛТ обладает широким спектром биологической активности. При изучении химического состава полифенольных соединений, выделенных из морских трав семейства *Zosteraceae* (*Zostera marina* и *Z. asiatica*), нами было установлено, что значительную часть полифенольного комплекса (около 40%) составляет 7,3'-дисульфат лютеолина [8]. При моделировании различных патологий *in vivo* нами была изучена фармакологическая активность дисульфата лютеолина (ДСЛ): противовоспалительный, кардиопротекторный, антидиабетический, антиоксидантный, гепатопротекторный, противовирусный эффекты в сравнении с ЛТ [5, 23]. ДСЛ оказался более удобной формой ЛТ, так как обладает хорошей водорастворимостью и может применяться как парентерально, так и перорально. Нами показано, что протективная фармакологическая активность ДСЛ при моделировании патологий углеводного (аллоксановый диабет) и липидного (гиперлипидемия) обмена, а также противовирусная активность в отношении вируса клещевого энцефалита заметно выше, чем у ЛТ [2, 4]. Поэтому представляло интерес провести исследования потенцирующего потенциала этого обладающего большим спектром биологической активности биофлавоноида при экспериментальной комбинированной противоопухолевой терапии ДР.

В последнее время начали появляться сообщения об обнаружении противоопухолевой активности препаратов, в фармакологическом спектре действия которых противоопухолевый эффект ранее никогда не фигурировал. Примером подобного препарата является сахароснижающий препарат метформин, давно с успехом применяющийся в практике лечения предиабетических состояний и диабета, для которого в последнее время установлена способность заметно снижать риск развития раковых заболеваний некоторых локализаций [16, 19, 20]. Мы посчитали интерес-

ным оценить возможное синергичное действие метформина в отношении ДР, а также использовали метформин в качестве препарата сравнения.

Способность различных химических соединений и лекарственных препаратов влиять на редокс-статус клеток может вносить существенный вклад в их лечебное действие [1, 7, 23]. Выяснение роли АФК в фармакологической активности и молекулярных механизмах действия природных редокс-активных соединений является особенно актуальной задачей, так как за последнее время появилось немало обоснованных суждений о потенциальной опасности в отношении канцерогенного риска при применении, например, средств с выраженной антиоксидантной активностью [18, 24]. Представления прежних лет о том, что применение антиоксидантов всегда дает позитивный фармакологический эффект, выражающийся в торможении развития признаков старения и канцерогенеза, требуют в настоящее время серьезной коррекции. Мы не являемся сторонниками экстремальной точки зрения, что применение антиоксидантов — это однозначный риск повышения канцерогенной опасности. Однако требуется проведение масштабных углубленных исследований механизмов действия редокс-активных соединений. Эти соединения могут являться представителями совершенно разных классов веществ, каждый из которых требует детального изучения и формирования в итоге показаний или противопоказаний для применения в схемах противоопухолевой терапии.

Данное исследование направлено на изучение в условиях лабораторного эксперимента возможности применения ряда препаратов природного происхождения (выделенных из морских гидробионтов ЭХА, СОК, ДСЛ, а также гинзенозида Rh2 и фармакопейного препарата метформина) как средств потенцирования противоопухолевого эффекта ДР. Рассмотрение вопроса об активности всех изученных нами в данной работе соединений как редокс-активных веществ, а также изучение некоторых цитокиновых параметров, важных для функционирования механизмов иммунологического противоопухолевого надзора, составляет содержание данной работы.

Материалы и методы

Экспериментальные животные: 150 мышей линии CD-1 массой 20-22 г, самки. Животные получены из питомника лабораторных животных Филиала ИБХ РАН в г. Пущино (Московская обл.) и содержались в виварии ТИБОХ ДВО РАН.

Экспериментальная модель онкологического заболевания — перевивная асцитная карцинома Эрлиха. Клетки карциномы Эрлиха получены из банка клеточных культур ТИБОХ ДВО РАН.

Инокуляция опухоли проводилась путем внутрибрюшинного (в/бр) введения 3×10^6 опухолевых клеток в объеме 0,5 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ).

Препараты

В работе использовали: 1) Доксорубин (ДР) (Pharmachemie); 2) полученный путем органического синтеза индивидуальный гликозид женьшеня Rh2 (любезно предоставленный для работы сотрудником лаборатории органического синтеза природных соединений ТИБОХ ДВО РАН Атопкиной Л.Н.); 3, 4, 5) дисульфатированное производное лютеолина ДСЛ из морской травы *Zostera marina*, полигидроксинафтахинон эхинохром А (ЭХА) из морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, смесь оксигенированных каротиноидов (СОК) из морской звезды *Patiria pectinifera* (выделены в лаборатории биотехнологии ТИБОХ ДВО РАН); 6) метформин (Глюкофаж – препарат метформина пролонгированного действия производства Merck serono, Германия). Структурные формулы всех использованных препаратов представлены на рисунке 1.

Методом газо-жидкостной хроматографии было определено, что основными компонентами СОК являются астаксантин – 46%, лютеин – 23%, зеаксантин – 23%, что отражено на рисунке 2.

Экспериментальные группы животных (все животные кроме группы интактных мышей – с асцитной карциномой Эрлиха)

Сформированы А: 8 групп животных (в каждой группе $n = 10$) для краткосрочного 9-дневного эксперимента (оценка продукции АФК спленocyтaми и содержания цитокинов в сыворотке крови): 1) интактные, 2) контроль – опухоленосители без лечения, 3) «ДР», 4) «ДР + Метформин», 5) «ДР + Rh2», 6) «ДР + ДСЛ», 7) «ДР + ЭХА», 8) «ДР + СОК», Б: 7 групп животных ($n = 10$) для долгосрочного 68-дневного эксперимента (оценка параметров выживаемости): 1) контроль – опухоленосители без лечения, 2) «ДР», 3) «ДР + Метформин», 4) «ДР + Rh2», 5) «ДР + ДСЛ», 6) «ДР + ЭХА», 7) «ДР + СОК».

Дозы препаратов

ДР вводили в дозе 0,5 мг/кг массы тела, все остальные препараты – в дозе 10 мг/кг.

Схемы экспериментального лечения: лечение препаратами начинали через сутки после инокуляции опухоли и проводили путем 5-кратного в/бр (ДР и Rh2) или перорального введения (ЭХА, СОК, Метформин) в объеме 0,2 мл ФСБ с суточным интервалом. Терминацию эксперимента проводили, соответственно, через 9 (эксперимент А) и 68 суток (эксперимент Б) после инокуляции опухоли.

Рассчитывали % выживших животных и показатель средней длительности жизни ($M \pm m$) в днях.

Реактивность иммунокомпетентных клеток селезенки к опухолевым клеткам и цитокиновые параметры сыворотки крови оценивали в условиях той же модели перевивной асцитной карциномы Эрлиха при лечении аналогично вышеописанному способу. Забой животных проводили на 9 сутки после инокуляции опухоли, когда опухоль имела средние размеры и фактов гибели животных-опухоленосителей не регистрировалось. Получали фракцию мононуклеарных клеток селезенки, а также сыворотку крови экспериментальных животных.

Тест оценки интенсивности образования АФК использовали для определения активности иммунокомпетентных клеток после 1-часовой инкубации спленocyтa с опухолевыми клетками карциномы Эрлиха, инактивированными путем трехкратной процедуры замораживания-оттаивания. Инкубация проводилась в лунках черного непрозрачного 96-луночного планшета (Greiner, США) в течение 1 час при 37 °С. Соотношение спленocyтa/опухолевые клетки составляло, соответственно, $2 \times 10^4/10^3$ клеток на лунку планшета. Клетки вносили в объеме 0,2 мл на лунку в питательной среде ДМЕМ («Биолот», Россия). По окончании инкубации для оценки уровня продукции АФК в каждую лунку вносили 10 мкл рабочего разведения флуоресцентного зонда 2',7'-дихлорфлуоресцеин-диацетата (ДФФ-ДА) (Sigma, США), растворенного в ДМСО. Конечная концентрация красителя в инкубационной среде составляла 10 мкМ/мл. ДФФ-ДА проявляет селективную чувствительность к H_2O_2 и супероксид-аниону O_2^- и, окисляясь в их присутствии внутри клетки, приобретает флуоресцентные свойства [22]. Оценку флуоресцентной активности проводили на планшетном ридере Fluoroscan Ascent FL (Labsystems, США) при экстинкции 485 нм и эмиссии 538 нм, Scaling Factor: 1/1 и выражали в единицах флуоресценции.

Цитокины: содержание в сыворотке крови мышей интерлейкинов IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, интерферона $IFN\gamma$, фактора некроза опухоли $TNF\alpha$ оценивали методом твердофазного неконкурентного гетерогенного иммуноферментного анализа с применением тест-систем ELISA Mouse Set (Bioscience, США) в соответствии с приложенной лот-специфической инструкцией. Использовали 96-луночные планшеты для ELISA (NUNC, Дания). Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере ELS 808 (BioTeck, США) при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов выражали в пг/мл. Для графического представления массива данных

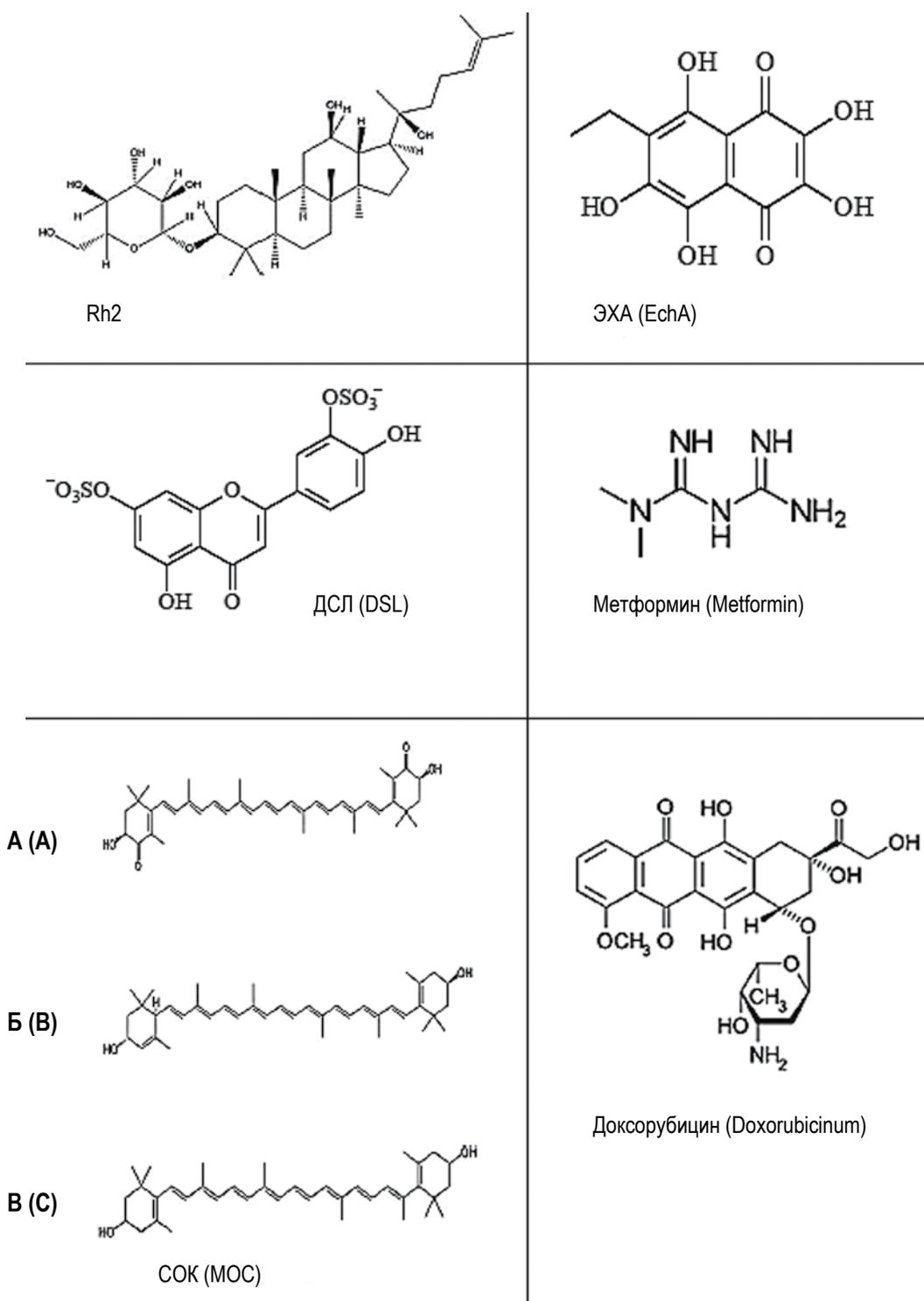


Рисунок 1. Структурные формулы веществ, использованных в эксперименте

Примечание. Rh2 – индивидуальный гликозид женьшеня, ЭХА – эхинохром А, ДСЛ – дисульфат лютеолина, СОК – смесь оксигенированных каротиноидов (А) астаксантин, (Б) лютеин, (В) зеаксантин.

Figure 1. Structural formulas of substances used in experiments

Note. Rh2, individual ginseng glycoside; EchA, Echinochrome A; DSL, luteolin disulfate; MOK, mixture of oxygenated carotenoids: (A) astaxanthin, (B) lutein, (C) zeaxanthin.

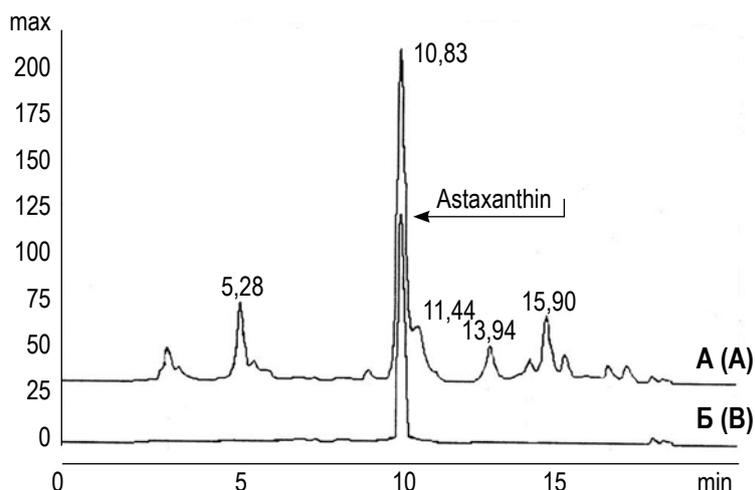


Рисунок 2. Хроматографические профили смеси оксигенированных каротиноидов (А) из морской звезды *Patiria pectinifera* и эталонного препарата астаксантин (Б)

Примечание. Содержание астаксантина в смеси оксигенированных каротиноидов составляет около 46%.

Figure 2. Chromatographic profiles of a mixture of oxygenated carotenoids (A) from *Patiria pectinifera* and a reference preparation of astaxanthin (B)

Note. Astaxanthin content makes about 46% in a total mixture of oxygenated carotenoids.

рассчитывали процент изменения концентрации цитокинов в опытной группе относительно соответствующих показателей интактных животных.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS 11/0 с определением критерия достоверности Фишера—Стьюдента. Различия между средними считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Изучение показателей выживаемости

Анализ количества выживших мышей и средней длительности жизни животных с асцитной карциномой Эрлиха — контрольных и получавших монотерапию ДР и лечение ДР в сочетании с различными природными соединениями и метформин, показал следующие результаты (рис. 3).

В группе мышей с опухолью, не получавших никакого лечения, погибли все животные в сроки 16 ± 2 дней после в/бр инокуляции опухоли. Применение ДР оказало выраженный лечебный эффект: на 68-й день эксперимента (дата прекращения наблюдений) выявлено 60% живых мышей, а средняя длительность жизни относительно срока наблюдения составила $52,5 \pm 3,9$ дней ($p < 0,01$). Потенцирующее действие на эффективность терапевтического эффекта ДР оказали препараты метформин, ЭХА, СОК и Rh2: регистрируется повышение процента выживших животных и увеличение средней длительности жизни. В то же время ДСЛ проявил негативный эффект при его комбинации с ДР: произошло до-

стоверное снижение как показателя выживших животных, так и показателя длительности жизни в сравнении с группой ДР ($p < 0,05$).

Анализ уровня продукции АФК

Индукцируемый ДР окислительный стресс вносит существенный вклад в его противоопухолевое действие. АФК действуют как прямые цитотоксические агенты, повреждая различные биомолекулы по механизму перекисного окисления, а также являются индукторами апоптоза в клетке, повышая активность редокс-чувствительных систем регуляции апоптозных программ [1, 11]. Для оценки влияния изученных препаратов на параметры АФК иммунокомпетентных клеток мы использовали флуоресцентный зонд ДХФ-ДА, способный проникать внутрь клетки и дезацетилироваться при участии внутриклеточных эстераз. Окисляясь преимущественно под действием H_2O_2 , зонд образует интенсивно флуоресцирующий 2',7'-дихлорфлуоресцеин (ДХФ). Эта реакция позволяет оценить динамику изменения уровня внутриклеточных АФК, главным образом H_2O_2 [22]. С использованием ДХФ-ДА была исследована способность спленоцитов, полученных через 9 дней после в/бр инокуляции мышам 3×10^6 опухолевых клеток, продуцировать АФК при контакте *in vitro* с целыми, но нежизнеспособными клетками карциномы, т.е. оценивалась общесистемная реактивность иммунокомпетентных клеток в модели прямого контакта *in vitro* с опухолевыми клетками (рис. 4).

По данным этого эксперимента не выявлено достоверных различий в реактивности сплено-

цитов к опухолевым клеткам в сравнении с контрольной группой мышей-опухоленосителей. Выявляется только некоторая тенденция повышенной чувствительности спленоцитов к опухолевым клеткам в группах «ДР + метформин» и «ДР + ДСЛ»: повышенная продукция АФК спленоцитами мышей этих групп при контакте с клетками карциномы Эрлиха в течение 1 часа. На этом основании можно предположить, что иммунокомпетентные клетки мышей этих групп более реактивны в отношении опухолевых клеток. Однако в отношении группы «ДР + ДСЛ» этот эффект не коррелирует с протективным эффектом (рис. 3). В то же время ни в одной из экспериментальных групп, в которых был выявлен положительный клинический эффект (группы «ДР», «ДР + метформин», «ДР + СОК», «ДР + ЭХА», «ДР + Rh2»), не определяется существенных сдвигов по показателю, характеризующему АФК-генерирующую активность.

Цитокиновые параметры сыворотки крови

При изучении содержания цитокинов IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ , TNF α в сыворотке крови животных-опухоленосителей мы установили следующие изменения (рис. 5).

В контрольной группе мышей-опухоленосителей определяется умеренное повышение уровня IL-1, а также IL-2 и IL-10. Уровень цитокинов IL-12, IFN γ и TNF α , значимых для противоопу-

холевой резистентности, практически не изменяется, оставаясь на уровне показателей интактных животных. В группе мышей, получавших лечебные ДР, отмечается другая картина – отсутствие повышения титра провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-6 на фоне увеличения содержания в сыворотке крови IFN γ и TNF α . Исходя из этих данных, можно предположить позитивное значение таких сдвигов цитокиновых параметров в отношении клинической эффективности и других терапевтических схем. В группах «ДР + Rh2», «ДР + ЭХА» и «ДР + СОК», где был достигнут потенцирующий терапевтический эффект, мы также зарегистрировали повышение содержания IFN γ и TNF α . Изменения содержания других цитокинов не позволяют выявить какой-либо четко выраженной тенденции.

В группе «ДР + Метформин», где также был установлен потенцирующий терапевтический эффект, установлено заметное снижение содержания большинства изученных цитокинов в сравнении с животными-опухоленосителями. Снижено содержание IL-1 и IL-6, IL-10, IL-12, TNF α . Это в целом можно трактовать как свидетельство подавления провоспалительных реакций в организме мышей с опухолью. При этом активность ключевого фактора роста Т-лимфоцитов – IL-2 – не подвергается супрессии.

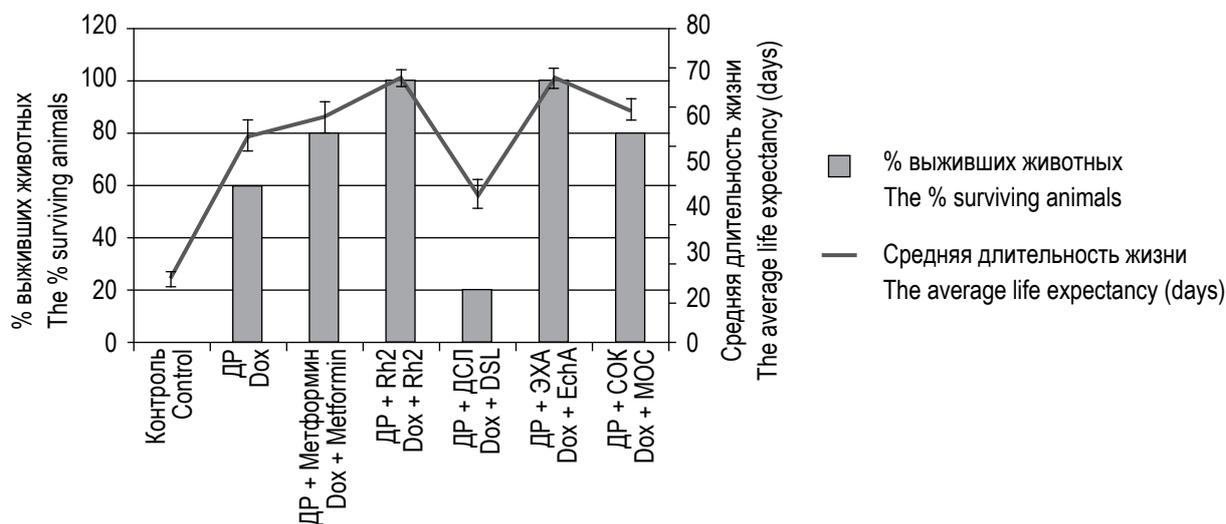


Рисунок 3. Показатели % выживших животных и средней длительности жизни мышей линии CD-1 с асцитным вариантом перевивной карциномы Эрлиха

Примечание. По оси абсцисс – экспериментальные группы животных. По оси ординат (слева) – количество выживших животных в %. По оси ординат (справа) – средняя длительность жизни животных-опухоленосителей (в днях после в/брюшкоуляции 5 млн клеток карциномы Эрлиха).

Figure 3. Percentage of surviving animals and average life-span of CD-1 mice with Ehrlich carcinoma ascites

Note. Abscissa, experimental groups of animals. Ordinate (left), number of surviving animals, % of total. Ordinate (right), the average life-span (days) of tumor-bearing animals (terms after inoculation with 5×10^6 Ehrlich carcinoma cells).

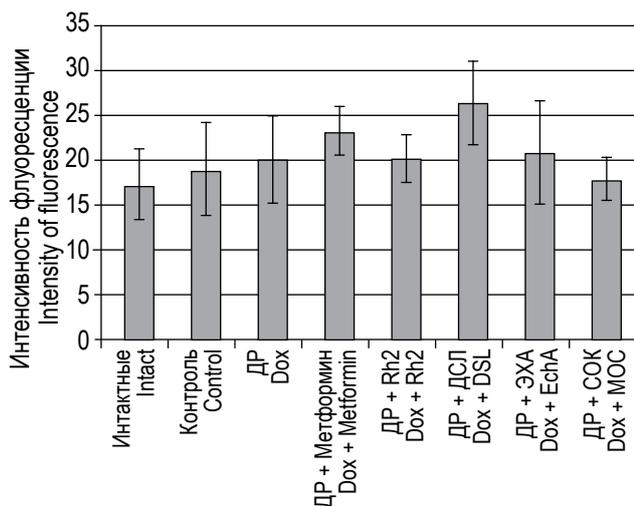


Рисунок 4. Реактивность спленцитов мышей-опухоленосителей с асцитным вариантом перевивной карциномы Эрлиха в отношении нежизнеспособных клеток этой опухоли в условиях *in vitro*

Примечание. Тест с флуоресцентным зондом ДХФ-ДА. По оси абсцисс – экспериментальные группы животных. По оси ординат – показатели флуоресцентной активности.

Figure 4. *In vitro* reactivity of splenocytes from tumor-bearing mice with Ehrlich carcinoma ascites against non-viable cells of the tumor

Note. A test with a fluorescent DXF-DA probe. Abscissa, experimental groups of animals. Ordinate, arbitrary fluorescence intensity.

Обсуждение

Установлена принципиальная возможность повысить эффективность противоопухолевой терапии ДР при использовании в качестве средств дополнительной терапии самых разнообразных соединений – полифенолов и оксикаротиноидов, полученных из морских гидробионтов, индивидуального гинзенозида Rh2 и сахароснижающего бигуанида метформина. Определяется существенный прирост показателей выживаемости и длительности жизни животных с моделированным онкологическим процессом (рис. 3). Причем, если для метформина и Rh2 имеются данные о наличии собственной некоторой противоопухолевой активности, проявляющейся при монотерапии этими препаратами [10, 20, 21, 25], то для ЭХА, СОК и ДСЛ, позиционируемых как редокс-соединения, обладающие выраженной антиоксидантной активностью [6, 8, 9, 12, 15], противоопухолевых свойств в наших исследованиях не установлено (данные не представлены).

В нашем эксперименте ЭХА и СОК проявили потенцирующий эффект в отношении противоопухолевой активности ДР, тогда как ДСЛ резко ее снизил. Можно предположить, что этот нега-

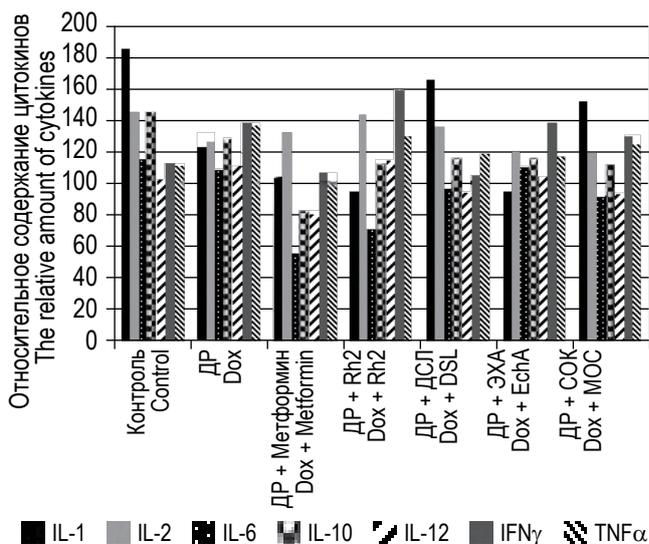


Рисунок 5. Относительное содержание цитокинов в сыворотке крови мышей с асцитной карциномой Эрлиха в сравнении с интактными животными

Примечание. По оси абсцисс – экспериментальные группы животных. По оси ординат – относительное содержание цитокинов в % по отношению к показателям интактных животных (принятых за 100%)

Figure 5. Relative contents of cytokines in the serum of mice with ascitic Ehrlich carcinoma as compared to intact animals

Note. Abscissa, experimental groups of animals. Ordinate, relative content of cytokines (per cent of appropriate indices in normal animals taken as 100%).

тивный эффект является следствием «гашения» АФК, роль которых для реализации противоопухолевого эффекта ДР считается важной [11]. Кроме того, известно, что для препаратов лютеолина характерна активность фитоэстрогенов [4], обладающих большим спектром биологической активности и способных, в частности, стимулировать процессы пролиферации некоторых типов клеток. Поскольку в нашем эксперименте использовались мыши-самки, было бы интересным сравнить эффект модуляции активности ДР при терапии препаратом ДСЛ мышей-самцов. Результаты предварительно проведенных нами экспериментов показывают, что такие гендерные различия действительно имеются (данные не представлены). Это еще больше усложняет проблему применения подобных препаратов (позиционируемых как мощные антиоксиданты, но реально обладающих более широким и часто недостаточно изученным спектром биологической активности) в качестве средств потенцирования противоопухолевой терапии. Имеющие место опасения в отношении повышения канцерогенного риска при применении антиоксидантов [18, 24] объясняются именно недостаточной изученностью подобных средств, в группу которых включаются самые разнообразные соединения:

биофлавоноиды, полифенолы, каротиноиды, лигнаны, различные витамины, стильбены и т.п. Причем, по нашей оценке, в группу «мощных антиоксидантов» нередко произвольно включают соединения, способные реализовывать при некоторых условиях и противоположный прооксидантный эффект. Таким образом, требуется более глубокое изучение подобных препаратов с целью определения спектра их биологической активности для более рационального включения их в схемы комбинированной противоопухолевой терапии. По результатам нашей работы, можно предположить что перспективными препаратами для продолжения их исследования как средств потенцирования эффективности противоопухолевой химиотерапии являются RН2, ЭХА, СОК, а также метформин.

Оценивая результаты исследования *in vitro* реактивности спленоцитов по отношению к «нагрузке» опухолевыми клетками, отметим, что нам не удалось подтвердить предполагаемое *a priori* усиление иммунореактивности иммунокомпетентных клеток у животных, получающих терапию ДР как в виде монотерапии, так и в комбинации с препаратами потенцирования. Различия между экспериментальными группами определяются только на уровне статистически недостоверных тенденций (рис. 4). В серии других экспериментов с применением этого флуоресцентного зонда мы убеждались в его исключительно высокой чувствительности к АФК, поэтому вышеописанные результаты позволяют однозначно говорить об ареактивности, инертности клеток селезенки мышей-опухоленосителей к клеткам этой опухоли, т.е. об отсутствии активации общесистемного иммунного ответа к клеткам развивающейся опухоли. Можно предположить, что более заметные проявления реактивности к опухолевым клеткам могут иметь место на локальном уровне, т.е. в брюшной полости при прямом контакте иммунокомпетентных клеток с клетками асцитной опухоли. Очевидно, что для проверки этого положения необходим соответствующий эксперимент с оценкой АФК-продуцирующей активности иммунокомпетентных клеток брюшной полости по отношению к опухолевым клеткам асцитной карциномы.

Анализируя результаты, представленные на рисунке 4, тем не менее нужно обратить внимание на особенно заметную тенденцию к усилению АФК-продукции клеток селезенки мышей, получавших в качестве средства потенцирования ДСЛ. Эта группа является единственной, статистически достоверно отличающейся ($p < 0,05$) по уровню этого показателя от интактных животных. Величина этого показателя не является достаточной, чтобы говорить об усилении цитотоксического противоопухолевого потенциала

спленоцитов мышей, получавших ДСЛ. Скорее, это отражает некоторую антиген-специфическую активацию спленоцитов. Требуется проведение дополнительных исследований для определения иммунофенотипа клеток, отвечающих на контакт с опухолевыми клетками подобным образом. Понятно, что исход подобной активации будет принципиально разным в том случае, если такой активации подвергаются СТЛ, НК-лимфоциты или Treg. Таким образом, полученные нами результаты подчеркивают обоснованность мнения о том, что представления о принципиальной канцерогенной опасности антиоксидантов являются не совсем корректными. Каждая из групп соединений, относимых к антиоксидантам, требует продолжения масштабных исследований их фармакологической активности на молекулярном и других уровнях. Актуальность такой работы подтверждается тем, что некоторые из этих соединений могут действительно оказать потенцирующий эффект на проводимую противоопухолевую терапию, что и показано в нашей работе. Этот эффект может заключаться, например, в защите мембранных структур и других биомолекул от альтерирующего действия свободных радикалов, в активации процессов клеточной дифференцировки (что хорошо известно, например, в отношении транс-ретиноевой кислоты), модуляции апоптозных программ и механизмов иммунологического противоопухолевого надзора.

Подобные соединения потенциально могут выступать и в роли индукторов синтеза различных регуляторных и эффекторных цитокинов. Общесистемная регуляция функций иммунной системы, и механизмов иммунологического противоопухолевого надзора в том числе, в значительной степени обусловлена цитокиновыми сетями регуляции. Это очень важный аспект изучения механизмов канцерогенеза и противоопухолевого иммунитета с фундаментальной точки зрения, также имеющий очевидное практическое значение. Выявление цитокиновых сдвигов в организме-опухоленосителе может быть важным для таргет-специфических подходов к модуляции иммунной системы с целью повышения ее противоопухолевого потенциала. Клиническая эффективность в схеме биотерапии рака таких цитокинов, как рекомбинантные препараты IL-1, IL-2, интерфероны различных классов, TNF, демонстрирует перспективность такого подхода. Однако ввиду большой сложности, многокомпонентности, плейотропности и полифункциональности многих компонентов цитокиновых сетей эти подходы до сих пор плохо охарактеризованы и недостаточно оптимизированы. В связи с чем отсутствуют четкие алгоритмы для определения показаний и формирования

схем биотерапии опухолей на основе применения препаратов цитокинов.

В нашей работе изучение цитокиновых параметров по семи различным цитокинам: IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ , TNF α выявило неоднозначную картину. Не выявлено значительных по величине сдвигов содержания этих цитокинов в сыворотке крови мышей в сроки на 9 сутки после в/бр инокуляции 3×10^6 опухолевых клеток (рис. 5). Очевидно, что общесистемный уровень содержания цитокинов в условиях нашего эксперимента является недостаточно информативным, поскольку основные события на данном этапе онкологического процесса разворачиваются *in situ* в брюшной полости (что требует соответствующего изучения). Тем не менее некоторые тенденции определяются достаточно четко при экстраполяции этих данных по цитокинам на параметры выживаемости в более отдаленные сроки в 68 суток после инокуляции опухоли (рис. 3). В экспериментальных группах животных с выраженным лечебным эффектом ДР выявлено отсутствие повышения титра провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-6 на фоне увеличения содержания в сыворотке крови IFN γ и TNF α . Можно предположить позитивное значение таких сдвигов цитокиновых параметров в отношении клинической эффективности других терапевтических схем. В группах «ДР + Rh2», «ДР + ЭХА» и «ДР + СОК», где был достигнут потенцирующий терапевтический эффект, также зарегистрировано повышение содержания IFN γ и TNF α . Изменения содержания других цитокинов не позволяют выявить каких-либо четко выраженных закономерностей, что, очевидно, определяется большими различиями в природе и механизмах действия изучаемых соединений (гликозидов, полифенолов, оксикаротиноидов).

В группе «ДР + метформин», где также был установлен потенцирующий терапевтический эффект, сдвиги цитокиновых параметров имеют особенности, характеризующиеся заметным снижением содержания большинства изученных цитокинов в сравнении с контрольными животными-опухоленосителями. Снижено содержание IL-1 и IL-6, IL-10, IL-12, TNF α . Это в целом можно трактовать как свидетельство подавления провоспалительных реакций в организме мышей с опухолью. При этом активность IFN γ и ключевого фактора роста Т-лимфоцитов – IL-2 – не подвергается супрессии.

Имеет ли потенцирующий противоопухолевый эффект метформина значимую связь с такими цитокиновыми сдвигами или же цитокиновые сдвиги являются только проявлением иммуносупрессии вследствие снижения энергетического метаболизма под влиянием этого сахароснижающего бигуанида? Данный вопрос на этом эта-

пе исследований не имеет корректного ответа и требует проведения дополнительных исследований. Отметим, что отсутствие факта снижения реактивности спленоцитов мышей этой группы в отношении клеток опухоли (рис. 4) позволяет предположить нелинейность характера индуцируемых в ответ на развитие опухоли реакций.

Исходя из представленных результатов, можно предположить перспективным вариант противоопухолевой терапевтической схемы с применением ДР, метформина и какого-либо из препаратов, обладающих выраженной интерферон-индуцирующей активностью.

Необходимо также подчеркнуть, что показавшие способность потенцировать эффективность противоопухолевой химиотерапии препараты ЭХА, СОК и метформина оказались эффективными при пероральном употреблении, что дополнительно подчеркивает перспективность их дальнейшего исследования.

Выводы

1) Применение препаратов ЭХА, СОК, Rh2 совместно с доксорубицином в схеме краткосрочной терапии экспериментального опухолевого процесса у мышей способно обеспечить потенцирующий эффект, т.е. повышение эффективности противоопухолевой терапии.

2) Применение метформина совместно с доксорубицином в схеме краткосрочной терапии экспериментального опухолевого процесса способно обеспечить потенцирующий противоопухолевый эффект.

3) Потенцирующий противоопухолевый эффект ЭХА, СОК, Rh2 коррелирует с общесистемным повышением содержания IFN γ и TNF α , на фоне снижения содержания провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-6.

4) Применение ДСЛ в использованной концентрации (10 мг/кг массы тела) совместно с доксорубицином приводит к негативному эффекту – снижению эффективности противоопухолевой терапии. Данный эффект не обусловлен отсутствием общесистемной реактивности иммунокомпетентных клеток к опухоли и, видимо, не связан с антиоксидантной активностью ДСЛ.

5) Потенцирующий противоопухолевый эффект метформина в условиях экспериментального опухолевого процесса у мышей имеет механизмы, не связанные с активацией цитокиновых сетей регуляции: определяется значительное снижение общесистемной концентрации IL-1 и IL-6, IL-10, IL-12, TNF α . Это в целом можно трактовать как свидетельство значительного подавления провоспалительных реакций в организме мышей с опухолью.

Список литературы / References

1. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // Успехи биологической химии, 2014. Т. 54. С. 299-348. [Kalinina E.V., Chernov N.N., Novichkova M.D. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biochemistry*, 2014, Vol. 54, pp. 299-348. (In Russ.)]
2. Крылова Н.В., Попов А.М., Леонова Г.Н. Антиоксиданты как потенциальные антивирусные агенты при флавивирусных инфекциях // Антибиотики и химиотерапия, 2016. Т. 61, № 5-6. С. 25-31. [Krylova N.V., Popov A.M., Leonova G.N. Antioxidants as potential antiviral agents for flavivirus infections. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2016, Vol. 61, no. 5-6, pp. 25-31. (In Russ.)]
3. Попов А.М. Противоопухолевая и антиметастатическая активность моногликозидов женьшеня: современные представления // Биофармацевтический журнал, 2011. Т. 3, № 5. С. 3-8. [Popov A.M. Antineoplastic and antimetastatic activity of ginseng monoglycosides: modern concepts. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2011, Vol. 3, no. 5, pp. 3-8. (In Russ.)]
4. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А. Сравнительная оценка фармакологической активности лютелина и 7,3'-дисульфата лютеолина при моделировании разных патологий // Биофармацевтический журнал, 2011. Т. 3, № 4. С. 27-33. [Popov A.M., Krivoshapko O.N., Artyukov A.A. The comparative evaluation of the pharmacological activity of luteolin and luteolin 7,3'-disulfate in the modeling of various pathologies. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2011, Vol. 3, no. 4, pp. 27-33. (In Russ.)]
5. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А. Механизмы протективной фармакологической активности флавоноидов // Биофармацевтический журнал, 2012. Т. 4, № 4. С. 27-41. [Popov A.M., Krivoshapko O.N., Artyukov A.A. Mechanisms of protective pharmacological activity of flavonoids. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2012, Vol. 4, no. 4, pp. 27-41. (In Russ.)]
6. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А. Перспективы клинического применения астаксантина и других оксигенированных каротиноидов // Биофармацевтический журнал, 2013. Т. 5, № 5. С. 13-30. [Popov A.M., Krivoshapko O.N., Artyukov A.A. Prospects for the clinical use of astaxanthin and other oxygenated carotenoids. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2013, Vol. 5, no. 5, pp. 13-30. (In Russ.)]
7. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Цыбульский А.В., Штода Ю.П., Климович А.А., Шнайдер К.Д., Артюков А.А. Оценка лечебной активности различных природных соединений при моделировании аллергического контактного дерматита // Биофармацевтический журнал, 2014. Т. 6, № 5. С. 3-10. [Popov A.M., Krivoshapko O.N., Tsybulsky A.V., Shtoda Yu.P., Klimovich A.A., Schneider K.D., Artyukov A.A. Evaluation of the therapeutic activity of various natural compounds in the modeling of allergic contact dermatitis. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2014, Vol. 6, no. 5, pp. 3-10. (In Russ.)]
8. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А. Механизмы протективного действия эхинохрома А при различных патологиях // Биофармацевтический журнал, 2016. Т. 8, № 4. С. 7-13. [Popov A.M., Krivoshapko O.N., Artyukov A.A. Mechanisms of the protective effect of echinochrome A for various pathologies. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2016, Vol. 8, no. 4, pp. 7-13. (In Russ.)]
9. Попов А.М., Осипов А.Н., Корепанова Е.А., Кривошапко О.Н., Артюков А.А., Климович А.А. Изучение антиоксидантной и мембранной активности эхинохрома А с использованием различных модельных систем // Биофизика, 2017. Т. 62, № 3. С. 509-517. [Popov A.M., Osipov A.N., Korepanova E.A., Krivoshapko O.N., Artyukov A.A., Klimovich A.A. The study of antioxidant and membrane activity of echinochrome A using various model systems. *Biofizika = Biophysics*, 2017, Vol. 62, no. 3, pp. 509-517. (In Russ.)]
10. Разина Т.Г., Крылова С.Г., Амосова Е.Н., Зуева Е.П., Лопатина К.А., Попов А.М., Атопкина Л.Н., Козловская Э.П. Влияние гинзенозида Rh2 на развитие перевиваемых опухолей животных и эффективность химиотерапии // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2010. Т. 73, № 4. С. 27-30. [Razina T.G., Krylova S.G., Amosova E.N., Zueva E.P., Lopatina K.A., Popov A.M., Atopkina L.N., Kozlovskaya E.P. The influence of ginsenoside Rh2 on the development of transplanted animal tumors and the effectiveness of chemotherapy. *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*, 2010, Vol. 73, no. 4, pp. 27-30. (In Russ.)]
11. Саенко Ю.В., Шутов А.М. Изучение генотоксических свойств доxorубина с использованием клеточной модели *Saccharomyces cerevisiae* // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2007. Т. 70, № 3. С. 29-32. [Saenko Yu.V., Shutov A.M. The study of the genotoxic properties of doxorubicin using the *Saccharomyces cerevisiae* cell model. *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*, 2007, Vol. 70, no. 3, pp. 29-32. (In Russ.)]
12. Цыбульский А.В., Попов А.М., Артюков А.А., Костецкий Э.Я., Кривошапко О.Н., Мазейка А.Н., Козловская Э.П. Сравнительное изучение лечебного действия лютеолина, розмариновой кислоты и эхинохрома А при экспериментальной кардиопатологии, индуцированной стрессом // Биомедицинская химия, 2011. Т. 57, № 3. С. 314-325. [Tsybulsky A.V., Popov A.M., Artyukov A.A., Kostetsky E.Y., Krivoshapko O.N., Maseyka A.N., Kozlovskaya E.P. The comparative study of the medical action of luteolin, rosmarinic acid and echinochrome A at experimental stress-induced cardiopathology. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2011, Vol. 57, no. 3, pp. 314-325. (In Russ.)]

13. Цыбульский А.В., Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А., Козловская Э.П., Богданович Л.Н., Крыжановский С.П., Блинов Ю.Г. Влияние эхинохрома А на биохимические параметры крови у больных с кардиопатологией // Биомедицинская химия, 2014. Т. 60, № 1. С. 115-124. [Tsybulsky A.V., Popov A.M., Artiukhov A.A., Krivoshapko O.N., Kozlovskaya E.P., Bogdanovich L.N., Kryzhanovsky S.P., Blinov I.G. The effects of preparation «Histochrome» in biochemical parameters of blood for patients with cardiopathologies. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2014, Vol. 60, no. 1, pp. 115-124. (In Russ.)]
14. Ambati R.R., Phang S.-M., Ravi S., Aswathanarayana R.G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications. A Review. *Marine Drugs*, 2014, Vol. 12, no. 1, pp. 128-152.
15. Artyukov A.A., Popov A.M., Tsybulsky A.V., Krivoshapko O.N., Polyakova N.V. Pharmacological activity of echinochrome a alone and in the biologically active additive timarin. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2013, Vol. 7, pp. 237-242.
16. Evans J.M., Donnelly L.A., Emslie-Smith A.M., Alessi D.R., Morris A.D. Metformin and reduced risk of cancer of 25-37% in diabetic patients. *British Medical Journal*, 2005, Vol. 330, pp. 1304-1305.
17. Feng Z., Zhao L., Luo L., You Z., Li D., Xia J., Zuo G., Chen D. Effect of ginsenoside Rh2 on the migratory ability of HepG2 liver carcinoma cells: Recruiting histone deacetylase and inhibiting activator protein 1 transcription factors. *Molecular Medicine Reports*, 2014, Vol. 10, pp. 1779-1785.
18. Kaiser J. Antioxidants could spur tumors by acting on cancer gene. *Science*, 2014, Vol. 343, no. 6170, p. 477.
19. Li D., Yeung S.C., Hassan M.M., Konopleva M., Abbruzzese J.L. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 2009, Vol. 137, no. 2, pp. 482-488.
20. Libby G., Donnelly L.A., Donnan P.T., Alessi D.R., Morris A.D., Evans J.M. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2009, Vol. 32, pp. 1620-1625.
21. Liu S., Chen M., Li P, Wu Y., Chang C., Qiu Y., Cao L., Liu Z., Jia C. Ginsenoside Rh2 inhibits cancer stem-like cells in skin squamous cell carcinoma cell. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2015, Vol. 36, pp. 499-508.
22. Loetchutinat C., Kothan S., Dechsupa S., Meesungnoen J., Jay-Gerin J.P., Mankhetkorn S.J. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry*, 2005, Vol. 72, no. 2-3, pp. 323-331.
23. Popov A.M., Krivoshapko O.N. Protective effects of polar lipids and redox-active compounds from marine organisms at modeling of hyperlipidemia and diabetes. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2013, Vol. 6, pp. 543-550.
24. Sayin V.I., Ibrahim M.X., Larsson E., Nilsson J.A., Lindahl P., Bergo M.O. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Science Translational Medicine*, 2014, Vol. 6, pp. 221-225.
25. Shin H.R., Kim J.Y., Yun T.K., Morgan G., Vainio H. The cancer-preventive potential of Panax ginseng: a review of human and experimental evidence. *Cancer Causes and Control*, 2000, Vol. 11, no. 6, pp. 565-576.

Авторы:

Цыбульский А.В. — к.м.н., доцент кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии Школы естественных наук ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Попов А.М. — д.б.н., руководитель группы изучения биологически активных добавок ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения РАН; профессор кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии Школы естественных наук ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Климович А.А. — аспирант группы изучения биологически активных добавок ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения РАН, г. Владивосток, Россия

Authors:

Tsybulsky A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Biochemistry, Microbiology and Biotechnology Department, Natural Sciences School, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Popov A.M., PhD, MD (Biology), Head, Group of Study Biologically Active Supplements, Pacific Ocean G.B. Elyakov Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Biochemistry, Microbiology and Biotechnology Department, Natural Sciences School, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Klimovich A.A., Graduate Student, Group of Study Biologically Active Supplements, Pacific Ocean G.B. Elyakov Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Артюков А.А. — д.б.н., руководитель лаборатории биотехнологии ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения РАН, г. Владивосток, Россия

Artyukov A.A., PhD, MD (Biology), Head, Biotechnology Laboratory, Pacific Ocean G.B. Elyakov Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Костецкий Э.Я. — д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии, микробиологии и биотехнологии Школы естественных наук ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Kostetsky E.Ya. — PhD, MD (Biology), Professor, Head, Biochemistry, Microbiology and Biotechnology Department, Natural Sciences School, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Веселова М.Д. — бакалавр кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии Школы естественных наук ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Veselova M.D., Bachelor, Biotechnology Laboratory, Pacific Ocean G.B. Elyakov Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 22.06.2017
Отправлена на доработку 13.07.2017
Принята к печати 18.07.2017

Received 22.06.2017
Revision received 13.07.2017
Accepted 18.07.2017

АНТИТЕЛА К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЦИТОКИНОВ: АССОЦИИАЦИИ С РАКОМ ЛЕГКОГО У МУЖЧИН

Глушков А.Н.^{1,3}, Поленок Е.Г.¹, Гордеева Л.А.¹, Мун С.А.¹,
Костянко М.В.^{1,3}, Титов В.А.², Вафин И.А.⁴, Рагожина С.Е.⁴

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» Сибирского отделения Российской академии наук, Институт экологии человека, г. Кемерово, Россия

² ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия

³ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

⁴ ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия

Резюме. Ранее обнаружили ассоциации антител, специфичных к химическим канцерогенам и стероидным гормонам, с раком легкого. Однако механизмы их образования и действия остаются не вполне понятными. В частности, неизвестно, взаимосвязано ли их содержание в сыворотке крови с генетическим полиморфизмом цитокинов.

Цель исследования – выявить предполагаемые ассоциации антител класса А, специфичных к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону (IgA-Vp, IgA-Es и IgA-Pg) в совокупности с полиморфными вариантами генов (*IL1RN*, *IL1B*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *TNFA*) с раком легкого у мужчин.

Были обследованы курящие мужчины: 381 больной раком легкого и 158 условно здоровых доноров без патологии органов дыхания. Исследование антител было выполнено с помощью твердофазного неконкурентного иммуноферментного анализа. Типирование полиморфизма генов *IL1RN* (VNTR, интрон 2), *IL4* (VNTR, интрон 3) проводили с помощью ПЦР, генов *IL1B* (rs1143634) и *IL6* (rs1800795) – с помощью полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ), генов *TNFA* (rs1800629, rs361525) и *IL10* (rs1800896) – с помощью TaqMan ПЦР в режиме реального времени.

У больных раком легкого доля случаев с уровнями IgA-Pg, превышающими уровни IgA-Vp и IgA-Es, была значимо меньше, чем у здоровых (OR = 0,31; p < 0,0001). И наоборот, превышение уровней и IgA-Vp и IgA-Es над уровнями IgA-Pg встречалось чаще у больных раком легкого (OR = 3,6; p < 0,0001). Не выявлено искомым взаимосвязей уровней исследуемых антител с генетическим полиморфизмом цитокинов. Вместе с тем обнаруженные ассоциации соотношений IgA-Vp и IgA-Es с IgA-Pg проявлялись только у носителей определенных генотипов цитокинов, в частности у гетерозигот АС гена *IL10*.

Полученные результаты косвенно подтверждают предположение, что IgA-Vp и IgA-Es стимулируют возникновение рака легкого, воздействуя на фазы инициации и промоции. IgA-Pg ингибирует канцерогенез, воздействуя на фазу промоции. Показана высокая информативность иммуноанализа IgA-Vp и IgA-Es и IgA-Pg в сочетании с молекулярно-генетическим анализом *IL10* для определения риска рака легкого у курящих мужчин.

Ключевые слова: рак легкого, антитела, бензо[а]пирен, эстрадиол, прогестерон, полиморфизмы генов, канцерогенез

Адрес для переписки:

Поленок Елена Геннадьевна
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля
и углехимии» Сибирского отделения Российской академии
наук, Институт экологии человека
650065, Россия, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10.
Тел./факс: 8 (3842) 57-50-79.
E-mail: egpolenok@mail.ru

Address for correspondence:

Polenok Elena G.
Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian
Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute of Human
Ecology
650065, Russian Federation, Kemerovo, Leningradsky ave, 10.
Phone/Fax: 7 (3842) 57-50-79.
E-mail: egpolenok@mail.ru

Образец цитирования:

А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, Л.А. Гордеева,
С.А. Мун, М.В. Костянко, В.А. Титов, И.А. Вафин,
С.Е. Рагожина «Антитела к бензо[а]пирену, эстрадиолу
и прогестерону и генетический полиморфизм
цитокинов: ассоциации с раком легкого у мужчин»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2.
С. 193–202. doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-193-202

© Глушков А.Н. и соавт., 2018

For citation:

A.N. Glushkov, E.G. Polenok, L.A. Gordeeva, S.A. Mun,
M.V. Kostyanko, V.A. Titov, I.A. Vafin, S.E. Ragozhina
“Antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone
and gene polymorphisms of cytokines: associations with lung
cancer in men”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 193–202.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-193-202

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-193-202

ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE AND GENE POLYMORPHISMS OF CYTOKINES: ASSOCIATIONS WITH LUNG CANCER IN MEN

Glushkov A.N.^{a,c}, Polenok E.G.^a, Gordeeva L.A.^a, Mun S.A.^a, Kostyanko M.V.^c, Titov V.A.^b, Vafin I.A.^d, Ragozhina S.E.^d

^a Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute of Human Ecology, Kemerovo, Russian Federation

^b Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^c Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

^d Regional Center of Blood, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Previous studies have revealed associations of antibodies, specific to chemical carcinogens and steroid hormones with lung cancer in men. However, the mechanisms of their formation and action were remained unclear. In particular, the relationships between antibodies and gene polymorphisms of cytokines were unknown. The purpose of this study was to identify possible associations between occurrence of A class antibodies, specific to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone (IgA-Bp, IgA-Es and IgA-Pg), and frequency of genetic polymorphisms of *IL1RN VNTR*, *IL1B* (rs1143634, rs16944), *IL4 VNTR*, *IL6* (rs1800795), *IL10* (rs1800896), *TNFA* (rs1800629, rs361525) genes in healthy male smokers and lung cancer patients.

We have examined 381 men with non-small cell lung cancer and 158 apparently healthy donors without respiratory diseases. A non-competitive solid phase immunoassay of antibodies was performed. Analysis of polymorphic loci of *IL1RN* (VNTR, intron 2), *IL4* (VNTR, intron 3) was performed by means of conventional PCR; *IL1B* (rs1143634, rs16944), *IL6* (rs1800795) SNPs were detected by RFLP, and *IL10* (rs1800896), *TNFA* (rs1800629, rs361525) genotyping was carried out with TaqMan Real-time PCR. Results of the study have shown that the proportion of cases with high level of IgA-Pg and low levels of both IgA-Bp and IgA-Es among the lung cancer patients was lower than in healthy men (OR = 0.31, $p < 0.0001$). *Vice versa*, the ratio of cases with high levels of both IgA-Bp and IgA-Es and low levels of IgA-Pg was higher in lung cancer patients (OR = 3.6, $p < 0.0001$). No relationships were revealed between the levels of antibodies, and rates of genetic polymorphisms for the studied cytokines in both groups of men. At the same time, the detected associations of IgA-Bp, IgA-Es and IgA-Pg with lung cancer proved to be significant only in carriers of certain cytokine genotypes, e.g., in AG *IL10* heterozygotes (OR = 5.1, $p < 0.0001$).

In conclusion, these results provide indirect evidence that IgA-Bp and IgA-Es could stimulate initiation and promotion of lung carcinogenesis. On the contrary, IgA-Pg could inhibit the promotion of carcinogenesis. Immunoassay of these antibodies combined with molecular biology studies of *IL10* gene variants are recommended for the lung cancer risk assessment.

Keywords: lung cancer, antibodies, benzo[a]pyrene, estradiol, progesterone, genes polymorphisms, carcinogenesis

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 16-15-00034.

Введение

Основной причиной возникновения рака легкого (РЛ) является воздействие на эпителий бронхов химических канцерогенов, таких как полициклические ароматические углеводороды, в частности бензо[а]пирена (Вр) [37]. Применение антиканцерогенных вакцин рассматривается как перспективное направление профилактики рака [11, 38, 39].

Активное участие в патогенезе РЛ принимают стероидные гормоны. Доказано стимулирующее действие эстрадиола (Es) на канцерогенез, а се-

лективные модуляторы эстрогеновых рецепторов предлагается использовать в комплексе лечения РЛ [6]. Обнаружено взаимное перекрестное влияние полициклических ароматических углеводородов и эстрогенов на канцерогенез легкого [17]. С одной стороны, некоторые метаболиты Вр, связываясь с эстрогеновыми рецепторами, проявляют эстрогеновую или антиэстрогеновую активность [23]. С другой стороны, эстрогены способны усиливать канцерогенез, индуцированный Вр [14], или действуют как мутагены в различных моделях *in vitro* и *in vivo* [25]. Таким образом, Вр действует как инициатор, а Es – как промотор в возникновении РЛ, согласно классической теории химического канцерогенеза [7].

Противоположные эффекты проявляет прогестерон (Pg). Пролиферация клеток РЛ, экспрессирующих Pg-рецепторы, ингибируется Pg в системах *in vitro* и *in vivo*, а наличие Pg-рецепторов в немелкоклеточных РЛ ассоциировано со снижением метастатической активности и высокой дифференцировкой опухоли [24]. Высокие уровни Es-рецепторов при одновременно низких уровнях Pg-рецепторов ассоциированы с агрессивным течением РЛ [40].

В связи с этим особый интерес представляет изучение роли антител (АТ), специфичных к Вр и эндогенным стероидам, в возникновении РЛ у человека. Повышенное содержание АТ, специфичных к аддуктам ДНК с Вр-диолэпоксидом, обнаружено в сыворотке крови курящих доноров [31, 35], рабочих коксохимического производства [29], больных псориазом при лечении каменноугольной смолой [9] и у людей с семейным анамнезом РЛ [35]. Данные об АТ, специфичных к Вр, противоречивы. Содержание АТ класса А против Вр было ниже у больных РЛ по сравнению со здоровыми донорами [31]. У больных раком молочной железы и раком яичника уровни IgA к Вр оказались более высокими, чем в контроле [12, 36].

Ни в одном из известных исследований АТ к химическим канцерогенам анализ АТ к эндогенным стероидам не выполнялся. Между тем, совместное участие химических канцерогенов и стероидных гормонов в этиопатогенезе наиболее распространенных опухолей у человека предполагает совместное изучение АТ, специфичных к этим группам химических соединений. Очевидно, что индивидуальный спектр АТ, специфичных к отдельным низкомолекулярным ксено- и эндобиотикам, зависит от персональных особенностей ферментов биотрансформации, главного комплекса гистосовместимости и цитокинового статуса организма, коль скоро эти системы обеспечивают образование метаболитов и аддуктов этих соединений макромолекулами, распознавание гаптен-иммунной системой и выраженность соответствующих специфических иммунных реакций [2]. Поэтому нами начаты исследования механизмов образования и функций АТ, участвующих в канцерогенезе, с целью разработки новых методов определения индивидуальных онкорисков, а в перспективе — новых методов профилактики злокачественных опухолей.

На первом этапе были обнаружены особенности образования АТ к Вр, эстрадиолу (Es) и прогестерону (Pg), каждого по отдельности и в различных сочетаниях, у больных РЛ по сравнению со здоровыми мужчинами [4]. Однако выявленные общие закономерности не позволили

выделить наиболее информированные критерии для определения индивидуальных рисков РЛ с учетом возраста и факторов курения. Осталась неизвестной роль цитокинов в образовании этих АТ.

Цель настоящей работы — исследовать ассоциации АТ класса А, специфичных к Вр, Es и Pg (IgA-Вр, IgA-Es и IgA-Pg) в совокупности с полиморфными вариантами генов цитокинов (*ILRN, IL1B, IL4, IL6, IL10, TNFA*) с РЛ у курящих мужчин.

Материалы и методы

Нами были обследованы 539 курящих мужчин. В исследуемую группу был включен 381 человек с диагнозом «немелкоклеточный РЛ», которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз «РЛ» в каждом случае был подтвержден морфологически, рентгенологически и эндоскопически. В группу сравнения были включены 158 условно здоровых мужчин из Кемеровского центра крови, не болеющие РЛ и другими заболеваниями дыхательных путей. Все обследуемые мужчины были старше 40 лет.

Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинской декларацией 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем.

Иммуноанализ IgA АТ к Вр, Es и Pg (IgA-Вр, IgA-Es, IgA-Pg) проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа, подробная методика описана в работе [3]. В качестве антигенов на полистирольные иммунологические планшеты были иммобилизованы конъюгаты Вр, Es и Pg с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Конъюгат Вр-BSA был синтезирован по методике, описанной в работе [3]. Конъюгат Es-BSA был синтезирован путем присоединения BSA к эстрадиолхинонам, полученным окислением Es солью Фреми. Конъюгат Pg-BSA был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидроксипрогестерона и BSA карбодиимидным способом. Иммунологические планшеты сенсibilizировали конъюгатами гаптен-BSA в течение ночи при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови в разведении 1:20 вносили по 100 мкл в лунки планшета в дублях, инкубировали 1 ч при 37 °С на шейкере. Связавшиеся АТ выявляли с помощью козьих АТ против IgA человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США), разведение конъюгата 1:10000. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводи-

ли с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (ТМВ, США), на фотометре (Пикон, Россия) при длине волны 450 нм. Уровни АТ выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$$IgA-X = (OD_{X-BSA} - OD_{BSA}) / OD_{BSA},$$

где X = Вр, Es, Pг; OD_{X-BSA} – связывание АТ с конъюгатом гаптен-BSA, OD_{BSA} – фоновое связывание с BSA.

Генотипирование

Образцы ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью метода фенол-хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом, образцы ДНК хранили при -20 °С.

В работе исследовали содержащиеся однонуклеотидные замены (SNP) варианты генов: *IL1B* +3953C>T (rs1143634), *TNFA* -308G>A (rs1800629), *TNFA* -238G>A (rs361525), *IL6* -174G>C (rs1800795), *IL10* -1082G>A (rs1800896), и минисателлитные маркеры, характеризующиеся различным числом tandemных повторов (VNTR), во 2 интроне гена *IL1RN* и в 3 интроне гена *IL4*.

Типирование полиморфных локусов *TNFA* (rs361525) и *IL10* (rs1800896) проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (RealTime) с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК. Каждый образец амплифицировался с использованием пары специфических праймеров и двух зондов (табл. 1), несущих «гаситель» на 3'-конце и флуоресцентные красители (FAM и R6G) на 5'-конце.

Детальное описание типирования полиморфизма генов *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* (VNTR интрона 2), *IL4* (VNTR интрона 3), *IL6* (rs1800795) и *TNFA* (rs1800629) представлено в работе [5]. VNTR аллели гена *IL1RN* обозначали следующим образом: аллель *IL1RN**1 содержал четыре тан-

демных повтора по 86 н.п.; аллель *IL1RN**2 – два tandemных повтора; аллель *IL1RN**3 – пять tandemных повторов; аллель *IL1RN**4 – три tandemных повтора. VNTR аллели гена *IL4* обозначали как: 2R – два tandemных повтора по 70 н.п., 3R – три tandemных повтора.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США), GenABEL, Genetics программного обеспечения R-project (www.r-project.org). Соответствие частот генотипов изучаемых генов цитокинов равновесию Харди–Вайнберга (HWE) оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона. Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$. Ненормальный характер распределения количественных показателей определили с помощью критерия Шапиро–Уилка и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявляли с помощью U-критерия Манна–Уитни для независимых выборок и непараметрического критерия χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность вариации. За критический уровень значимости принималось значение $p < 0,05$. Для выявления пороговых значений уровней АТ (cut-off) был проведен ROC-анализ [21]. Силу ассоциации АТ и генотипов с РЛ оценивали с помощью величины отношения шансов (odds ratio, OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости, полученных на основе логистического регрессионного анализа (функция «glm» программы R). В качестве базовой модели исследовали аддитивную модель наследования признака.

Результаты

Сначала с помощью ROC-анализа определили пограничные значения уровней исследуемых АТ, по которым сравниваемые группы курящих мужчин имели наиболее значимые различия. Таковым оказались: для IgA-Вр и IgA-Es = 3,

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ И ЗОНДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА В ГЕНАХ *TNFA* (rs361525) И *IL10* (rs1800896)

TABLE 1. PRIMERS AND PROBES FOR DETERMINING POLYMORPHIC NUCLEOTIDE SITES IN *TNFA* (rs361525) AND *IL10* (rs1800896) GENES

Полиморфизм Polymorphism	Праймеры Primers	Последовательность праймеров Sequence of primers	Последовательность зондов Sequence of probes
<i>TNFA</i> (rs361525)	прямой direct	5'-GTCCTACACACAAATCAGTCAGT-3'	5'-Fam-TCCTCCCTGCTCtGATTC-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-TTGGGGACACACAAGCATCA-3'	5'-R6G-TCCTCCCTGCTCcGATTC-BHQ-3'
<i>IL10</i> (rs1800896)	прямой direct	5'-CACAAATCCAAGACAACACTACT -3'	5'-R6G-CTTCCCCcTCCCAAAGAAGC -BHQ-3'
	обратный reverse	5'-GATAGGAGGTCCCTTACTTTCC -3'	5'-FAM-CTTCCCCtTCCCAAAGAAGC -BHQ-3'

для IgA-Pg = 2. В таблице 2 представлены: число случаев (n) и частота обнаружения (%) высоких (>) значений уровней указанных АТ. Оказалось, что у больных РЛ частоты обнаружения IgA-Bp и IgA-Es статистически достоверно превышают таковые у здоровых доноров (позиции 1.1 и 1.2). Значение OR, рассчитанные с помощью лог-регрессионного анализа с учетом возраста в качестве предиктора, составили, соответственно, 1,9 и 1,7. По содержанию высоких уровней IgA-Pg (позиция 1.3) различий не выявлено. Эти результаты подтверждают данные, полученные ранее без учета факторов курения и возраста [4].

Далее рассчитали соотношения уровней IgA-Bp и IgA-Pg по сравнению с уровнями IgA-Pg (IgA-Bp/Pg и IgA-Es/Pg). Значения указанных соотношений > 1 показывают, что уровни IgA-Bp и IgA-Es превышают уровни IgA-Pg в каждом образце исследуемых сывороток крови. Выяснилось, что соотношение IgA-Bp/Pg > 1 и IgA-Es/Pg > 1 (позиции 2.1 и 2.2.) встречаются у больных РЛ статистически чаще, чем в группе

сравнения. При этом OR составляли 2,3 и 3,9 соответственно.

Учитывая то, что в каждом индивидуальном случае возможны различные комбинации высоких и низких уровней исследуемых АТ, рассчитали частоту обнаружения четырех возможных комбинаций соотношений IgA-Bp/Pg и IgA-Es/Pg (позиции 3.1-3.4 в таблице 2). Обнаружили следующее:

– одновременно низкие значения IgA-Bp/Pg ≤ 1 и IgA-Es/Pg ≤ 1 (комбинация 3.1) встречались у больных РЛ значимо реже, чем у здоровых мужчин с OR = 0,31;

– соотношение IgA-Bp/Pg > 1 в сочетании с IgA-Es/Pg ≤ 1 (комбинация 3.2) у больных РЛ встречалось значительно реже, чем в контрольной группе с OR = 0,53;

– соотношение IgA-Bp/Pg ≤ 1 в сочетании с IgA-Es/Pg > 1 (комбинация 3.3) встречалось почти с одинаковой частотой в сравниваемых группах (различия статистически недостоверны);

– одновременное превышение уровней IgA-Bp и IgA-Es над уровнями IgA-Pg (комбинация 3.4)

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО СЛУЧАЕВ (n) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ ВЫСОКИХ (>) УРОВНЕЙ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ (IgA-Bp, IgA-Es, IgA-Pg), ИХ СООТНОШЕНИЙ (IgA-Bp/Pg, IgA-Es/Pg), А ТАКЖЕ ВОЗМОЖНЫХ КОМБИНАЦИЙ ЭТИХ СООТНОШЕНИЙ У ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО (РЛ)

TABLE 2. NUMBER OF CASES (n) AND FREQUENCY (%) OF HIGH (>) LEVELS OF ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL, AND PROGESTERONE (IgA-Bp, IgA-Es, IgA-Pg), THEIR RATIOS (IgA-Bp/Pg, IgA-Es/Pg), AND POSSIBLE COMBINATIONS OF THESE RATIOS IN HEALTHY MEN AND PATIENTS WITH LUNG CANCER (CL)

Антитела, соотношения антител и их комбинации Antibodies, antibody ratios and their combinations	Здоровые мужчины Healthy men n = 158	Больные РЛ Lung cancer patients n = 381	OR (95%CI), (p)
	n/%	n/%	
1.1. IgA-Bp > 3	51/32,3	189/49,6	1,9 (1,2-3,0) (0,005)
1.2. IgA-Es > 3	51/32,3	190/49,9	1,7 (1,1-2,7) (0,02)
1.3. IgA-Pg > 2	89/56,3	223/58,5	0,9 (0,5-1,4) (0,55)
2.1. IgA-Bp/Pg > 1	75/47,5	242/63,5	2,3 (1,5-3,6) (0,0003)
2.2. IgA-Es/Pg > 1	60/38,0	265/69,6	3,9 (2,4-6,1) (< 0,0001)
3.1. IgA-Bp/Pg ≤ 1 IgA-Es/Pg ≤ 1	65/41,1	73/19,2	0,31 (0,2-0,5) (< 0,0001)
3.2. IgA-Bp/Pg > 1 IgA-Es/Pg ≤ 1	33/20,9	43/11,3	0,53 (0,3-0,9) (0,03)
3.3. IgA-Bp/Pg ≤ 1 IgA-Es/Pg > 1	18/11,4	66/17,3	1,3 (0,7-2,5) (0,36)
3.4. IgA-Bp/Pg > 1 IgA-Es/Pg > 1	42/26,6	199/52,2	3,6 (2,2-5,8) (< 0,0001)

встречалось статистически значимо чаще у больных РЛ с OR = 3,6.

Изучение предполагаемых взаимосвязей АТ к химическим канцерогенам и стероидным гормонам с генетическим полиморфизмом цитокинов проводили с помощью критерия χ^2 для произвольных таблиц и методом лог-регрессии с учетом возраста у здоровых мужчин и больных РЛ. Никакое из исследованных АТ (IgA-Bp, IgA-Es, IgA-Pg), ни их соотношения (IgA-Bp/Pg и IgA-Es/Pg), ни их четыре комбинации не были ассоциированы с полиморфными вариантами генов *IL1RN*, *IL1B*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *TNFA* ни у больных РЛ, ни у здоровых мужчин.

В качестве примера в таблице 3 приведены результаты анализа возможных комбинаций соотношений IgA-Bp/Pg и IgA-Es/Pg у носителей трех генотипов *IL10* в сравниваемых группах. Распределение числа случаев всех четырех комбинаций оказалось независимым от генотипов AA, AG и GG у здоровых мужчин ($p = 0,09$, d.f. = 6). При сравнении только двух крайних комбинаций 1 и 4 не было выявлено никаких различий ($p = 0,13$, d.f. = 2). У больных РЛ искомые ассоциации тоже не обнаружены ($p = 0,95$, d.f. = 6 и $p = 0,86$, d.f. = 2 соответственно).

Вместе с тем вышеописанные ассоциации с РЛ отдельных комбинаций соотношений ис-

следуемых АТ (табл. 3) оказались высокодостоверными только у гетерозигот AG гена *IL10*. Превышение уровней IgA-Bp и IgA-Es над уровнями IgA-Pg (комбинация 1) у больных РЛ встречалось значительно реже с OR = 0,3 ($p < 0,0001$). Превышение уровней IgA-Pg над уровнями IgA-Bp и IgA-Es (комбинация 4) у больных РЛ обнаруживали значительно чаще с OR = 5,1 ($p < 0,0001$). У гомозигот AA и GG такие взаимосвязи были менее значимы ($p = 0,03-0,048$) либо вообще отсутствовали.

Обсуждение

В некоторых экспериментах *in vivo* было показано, что активная иммунизация животных Bp, конъюгированным с белками-носителями, приводила к увеличению количества Bp-индуцированных опухолей [15], увеличению Bp и его метаболитов в крови, печени, селезенке и почках в прямой корреляции с уровнем АТ к Bp [20]. В экспериментах *in vitro* установлено, что моноклональные АТ к Bp, имитирующие действие сывороточных АТ, усиливали пенетрацию Bp через монослой эпителиальных клеток и повышали содержание реактивных метаболитов Bp в этих клетках [16]. В многочисленных экспериментах *in vivo* иммунизация животных против половых гормонов приводила к значительному по-

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВО СЛУЧАЕВ (n) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ СЛУЧАЕВ С ОПРЕДЕЛЕННЫМИ КОМБИНАЦИЯМИ СООТНОШЕНИЙ IgA-Bp/Pg И IgA-Es/Pg У НОСИТЕЛЕЙ ТРЕХ ГЕНОТИПОВ *IL10* В СРАВНИВАЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 3. NUMBER OF CASES (n) AND FREQUENCY (%) OF CASES WITH SPECIFIC IgA-Bp/Pg AND IgA-Es/Pg COMBINATIONS IN CARRIERS OF THREE *IL10* GENOTYPES FOR THE GROUPS UNDER STUDY

Комбинации соотношений антител Combinations of antibody ratios	Здоровые мужчины Healthy men n = 158			Больные РЛ Lung cancer patients n = 378			OR (95%CI) (p)		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG	AA	AG	GG
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%			
1. IgA-Bp/Pg ≤ 1 IgA-Es/Pg ≤ 1	16/10,1	39/24,7	10/6,3	27/7,1	36/9,5	9/2,4	(0,06)	0,3 (0,1-0,5) ($< 0,0001$)	(0,13)
2. IgA-Bp/Pg > 1 IgA-Es/Pg ≤ 1	15/9,5	12/7,6	6/3,8	18/4,8	17/4,5	8/2,1	(0,03)	0,3 (0,1-0,9) (0,03)	(0,57)
3. IgA-Bp/Pg ≤ 1 IgA-Es/Pg > 1	2/1,3	12/7,6	4/2,5	24/6,3	31/8,2	11/2,9	(0,06)	(0,91)	(0,76)
4. IgA-Bp/Pg > 1 IgA-Es/Pg > 1	17/10,8	17/10,8	8/5,1	72/19,0	95/25,1	30/7,9	(0,048)	2,3 (1,0-5,4) (0,048)	5,1 (2,4-10,7) ($< 0,0001$) (0,05)
χ^2 (p) 1-2-3-4	11,1 (0,09)			1,7 (0,95)					
χ^2 (p) 1-4	4,1 (0,13)			0,3 (0,86)					

вышению их содержания в крови и нарушениям их биологических функций [10, 13, 22].

На основе этих данных предположили, что в естественных условиях АТ против химических канцерогенов и эндогенных стероидов в некоторых случаях стимулируют возникновение злокачественных опухолей у человека [18, 19]. Возможные механизмы иммуностимуляции канцерогенеза обусловлены, в частности, особыми свойствами сывороточных АТ класса А:

- усиливать транспорт химических канцерогенов из окружающей среды через поверхностный эпителий бронхов и желудочно-кишечного тракта во внутренние среды организма;

- повышать содержание химических канцерогенов и стероидных гормонов в крови и доступность их к органам-мишеням;

- обеспечивать доставку химических канцерогенов и стероидных гормонов в эпителиальные клетки-мишени через поверхностные Fc-рецепторы IgA.

Конечный эффект АТ (стимуляция или угнетение канцерогенеза), очевидно, зависит от индивидуальных особенностей специфических иммунных реакций на химические канцерогены с одной стороны и на стероидные гормоны с другой стороны.

Полученные результаты косвенно подтверждают эти предложения. Высокие уровни IgA-Vp и IgA-Es были ассоциированы с РЛ у курящих мужчин со значениями OR 1,9 и 1,7 соответственно. IgA-Pg сами по себе не были связаны с РЛ. В то же время высокие показатели соотношений уровней IgA-Vp или IgA-Es над уровнями IgA-Pg были ассоциированы с РЛ с более выраженными значениями OR (2,3 и 3,9 соответственно) при значительно большей статистической значимости.

Однако эти взаимосвязи оказались действительными только при одновременном превышении уровней и IgA-Vp, и IgA-Es над уровнями IgA-Pg (OR = 3,6). Если содержание IgA-Vp было выше, а IgA-Es ниже, чем IgA-Pg, ассоциация с РЛ оказалась отрицательной (OR = 0,53). В обратной ситуации, когда уровни IgA-Vp были ниже, а IgA-Es выше, чем IgA-Pg, искомым ассоциации не выявлено ($p = 0,36$). Если уровни IgA-Pg были выше, чем уровни обоих IgA-Vp и IgA-Es, ассоциация с РЛ оказалась отрицательной (OR = 0,31).

Таким образом, стимуляция иницирующего действия Vp и промоторного действия Es за счет IgA-Vp и IgA-Es возможна только при их совместном образовании и только при низких уровнях IgA-Pg. В свою очередь антиканцерогенное действие IgA-Pg проявляется, только если его уровни превышают таковые IgA-Vp и IgA-Es.

По результатам метаанализов связь полиморфизма в генах цитокинов с РЛ противоречива.

Так, аллель G (генотип GG) гена *IL10* (rs1800896) ассоциирован с риском РЛ [33]. В то же время для полиморфизма в генах цитокинов *IL1B* (rs1143634, rs16944), *IL1RN* (VNTR, интрон 2), *IL6* (rs1800795) и *TNFA* (rs1800629) такие ассоциации отсутствовали или носили пограничный характер [41, 42, 44].

Нам не удалось выявить никаких взаимосвязей исследуемых АТ с полиморфными вариантами генов цитокинов. Очевидно, известные ассоциации цитокинов с РЛ связаны с механизмами противоопухолевого иммунитета, направленного на злокачественные клетки, но не на низкомолекулярные ксено- и эндобиотики. Вероятно, отсутствие искомым ассоциаций исследуемых АТ с генетическими полиморфизмами цитокинов в настоящей работе обусловлено недостаточным количеством наблюдений. Поскольку доказано участие этих цитокинов в АТ-генезе, поиск предполагаемых взаимосвязей с образованием АТ к химическим канцерогенам и эндогенным стероидам целесообразно продолжить.

Вместе с тем выявленные взаимосвязи АТ к химическим канцерогенам и стероидным гормонам могут быть детерминированы не только генами цитокинов, но и генами ферментов их биотрансформации, так как последние действительно ассоциированы с РЛ за счет образования реактивных метаболитов указанных соединений [1, 8, 26, 32] и их аддуктов с макромолекулами организма [27, 34]. Коль скоро в иммунологическом распознавании гаптенных в составе аддуктов, очевидно, принимают участие молекулы HLA, целесообразно исследовать искомые взаимосвязи с генетическим полиморфизмом главного комплекса гистосовместимости, для которого тоже доказаны ассоциации с РЛ [28, 30, 43]. По-видимому, полное раскрытие механизмов образования АТ к химическим канцерогенам и эндогенным стероидам достижимо при исследовании межгенных взаимодействий ферментов их метаболизма, HLA и цитокинов.

Прикладное значение полученных результатов состоит в следующем. Обнаружение высоких уровней только IgA-Vp или только IgA-Es без учета IgA-Pg может оказаться ложноположительным в оценке риска возникновения РЛ у курящих мужчин. Например, при высоких уровнях IgA-Vp (> 3) OR составляет 1,9, а при соотношении $IgA-Vp/Pg > 1$ OR достигает 2,3. Но если при этом соотношение $IgA-Es/Pg \leq 1$, OR составляет всего 0,53. Поэтому с практической целью необходимо анализировать уровни всех трех IgA и рассчитывать их соотношения с учетом возможной комбинации в каждом персональном случае.

Информативность метода повышается при сочетании иммуноанализа указанных АТ с ана-

лизом генетических полиморфизмов цитокинов. Наиболее предпочтительным представляется исследование полиморфных вариантов гена *IL10*. С одной стороны, доказана ассоциация *IL10* с РЛ [33]. С другой стороны, статистически достоверной оказалась взаимосвязь исследованных АТ с РЛ только у гетерозигот АГ гена *IL10*.

Благодарности

Авторы благодарят сотрудников лаборатории иммунохимии Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН Аносову Т.П., Аносову М.П., Красильникову К.С., Гурова Е.А. за техническую поддержку настоящей работы.

Список литературы / References

1. Белогубова Е.В., Того А.В., Суворова И.К., Карпова М.Б., Улыбина Ю.М., Зайцева О.А., Яцук О.С., Шуткин В.А., Рябоконт С.А., Соколенко А.П., Иевлева А.Г., Чекмарева Е.В., Лемехов В.Г., Колосков А.В., Кучинский А.П., Хансон К.П., Имянитов Е.Н. Распределение аллелей гена *CYP1A1* у больных раком легкого, доноров среднего возраста и пожилых людей без онкологической патологии // Вопросы онкологии, 2004. Т. 50, № 2. С. 165-168. [Belogubova E.V., Togo A.V., Suvorova I.K., Karpova M.B., Ulybina Yu.M., Zaitseva O.A., Jatsook O.S., Shootkin V.A., Ryabokon S.A., Sokolenko A.P., Iyevleva A.G., Chekmareva E.V., Lemekhov V.G., Koloskov A.V., Kuchinsky A.P., Hanson K.P., Imyaninov E.N. *CYP1A1* allele distribution in lung cancer patients, middle-aged donor and elderly tumor-free subjects. *Voprosy onkologii = Problems of Oncology*, 2004, Vol. 50, no. 2, pp. 165-168. (In Russ.)]
2. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А., Баканова М.Л., Минина В.И., Мун С.А., Ларин С.А., Костянко М.В. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные аберрации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия // Российский иммунологический журнал, 2011. Т. 5 (14), № 1. С. 39-44. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Anosova T.P., Savchenko Ya.A., Bakanova M.L., Minina V.I., Mun S.A., Larin S.A., Kostyanko M.V. Serum antibodies to benzo[a]pyrene and chromosomal aberrations in lymphocytes peripheral blood at the workers of coal processing enterprise. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2011, Vol. 5(14), no. 1, pp. 39-44. (In Russ.)]
3. Глушков А.Н. Клиническая иммунохимия канцерогенеза: новые задачи и перспективы // Российский иммунологический журнал, 2013. Т. 7 (16), № 1. С. 27-34. [Glushkov A.N. Immunochimistry on carcinogenesis: new tasks and perspectives. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (16), no. 1, pp. 27-34. (In Russ.)]
4. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Костянко М.В., Титов В.А., Вафин И.А., Рагожина С.Е. Взаимное влияние антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону на риски возникновения рака легкого // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 3. С. 343-349. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Titov V.A., Vafin I.A., Ragozhina S.E. Mutual effects of antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone on the lung cancer risks. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 3, pp. 343-349. (In Russ.)]
5. Гордеева Л.А., Глушкова О.А., Воронина Е.Н., Шаталина И.В., Шутров А.Е., Попова О.С., Гареева Ю.В., Симонова Т.А., Сутулина И.М., Филипенко М.Л., Глушков А.Н. Ассоциации материнских полиморфизмов генов цитокинов (*IL-1B*, *IL-1RN*, *TNF*, *IL-4*, *IL-6*) с врожденными пороками развития у плода и новорожденного // Иммунология, 2013. Т. 34, № 6. С. 298-304. [Gordeeva L.A., Glushkova O.A., Voronina E.N., Shatalina I.V., Shutrov A.E., Popova O.S., Gareeva Yu.V., Simonova T.A., Sutulina I.M., Filipenko M.L., Glushkov A.N. Association of maternal polymorphisms of cytokine gene (*IL1B*, *IL1RN*, *TNF*, *IL4*, *IL6*) with congenital malformations in fetus and newborn. *Immunologia = Immunology*, 2013, Vol. 34, no. 6, pp. 298-304. (In Russ.)]
6. Давыдов М.И., Богуш Т.А., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А. Эстрогеновые рецепторы β – новая мишень в терапии немелкоклеточного рака легкого // Вестник РАМН, 2012. Т. 67, № 2. С. 16-22. [Davidov M.I., Bogush T.A., Polotskiy B.E., Tylyandin S.A. Estrogen receptors β – new target in cellular lung cancer treatment. *Vestnik Rossiyskoi akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, Vol. 67, no. 2, pp. 16-22. (In Russ.)]
7. Худoley В.В. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия. СПб.: НИИ Химии СПбГУ, 1990. 419 с. [Khudoley V.V. Carcinogens: characteristics, patterns, mechanisms of action]. St.-Peterburg: Research Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, 1990. 419 p.
8. Bartsch H., Nair U., Risch A., Rojas M., Wikman H., Alexandrov K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2000, Vol. 9, no. 1, pp. 3-28.
9. Borska L., Andrys C., Krejsek J., Palicka V., Chmelarova M., Hamakova K., Kremlacek J., Borsky P., Fiala Z. Serum level of antibody against benzo[a]pyrene – 7,8-diol-9,10-epoxide-DNA adducts in people dermally exposed to PAHs. *J. Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2014, Article ID 834389, 6 p. doi: 10.1155/2014/834389.
10. Bourtourault M., Shacoori V., Guerin J., Saiag B., Rault B. Effects of simultaneous active immunization against 17 beta-estradiol and testosterone on pituitary and ovarian activity in rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1991, Vol. 72, no. 3, pp. 273-284.
11. Černohorská H., Klimešová S., Lepša L., Jinoch P., Milcová A., Schmuczerová J., Topinka J., Lábaj J. Influence of immunization with non-genotoxic PAH-KLH conjugates on the resistance of organisms exposed to benzo[a]pyrene. *Mut. Res.*, 2012, Vol. 742, no. 1-2, pp. 2-10.

12. Chagnaud J.L., Faiderbe S., Geffard M. Identification and immunochemical characterization of IgA in sera of patients with mammary tumors. *Int. J. Cancer*, 1992, Vol. 50, pp. 395-401.
13. Chang C.F., Roberts A.J., Reeves J.J. Increased luteinizing hormone secretion and ovarian function in Heifers actively immunized against estrogen and progesterone. *J. Anim. Sci.*, 1987, Vol. 65, no. 3, pp. 771-776.
14. Chen Z., Zhang Y., Yang J., Jin M., Wang X.W., Shen Z.Q., Qiu Z., Zhao G., Wang J., Li J.W. Estrogen promotes benzo[a]pyrene-induced lung carcinogenesis through oxidative stress damage and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway in female mice. *Cancer Lett.*, 2011, Vol. 308, no. 1, pp. 14-22.
15. Curtis G.L., Ryan W.L., Stenbäck F. Antibody stimulation of benzo[a]pyrene carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 1978, Vol. 4, no. 4, pp. 223-228.
16. De Buck S.S., Augustijns P., Muller C.P. Specific antibody modulates absorptive transport and metabolic activation of benzo[a]pyrene across Caco-2 monolayers. *J. Pharmacol. Experim. Therap.*, 2005, Vol. 313, no. 2, pp. 640-646.
17. Fucic A., Gamulin M., Ferencic Z., Rokotov D.S., Katic A., Bartonova A., Lovasic I.B., Merlo D.F. Lung cancer and environmental exposure: a review of our current state of knowledge with reference to the role of hormones and hormone receptors as an increased risk factor for developing lung cancer in man. *Toxicol. Pathol.*, 2010, Vol. 38, no. 6, pp. 849-855.
18. Glushkov A.N. Immunological disbalance in carcinogenesis. *Med. Hypotheses*, 2014, Vol. 83, no. 2, pp. 166-171.
19. Glushkov A.N., Polenok E.G., Ustinov V.A. Immunomodulation of human carcinogenesis by the blood serum antibodies against benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone. *Open J. Immunol.*, 2016, Vol. 6, no. 3, pp. 67-72.
20. Grova N., Prodhomme E.J., Schellenberger M.T., Farinelle S., Muller C.P. Modulation of carcinogen bioavailability by immunization with benzo[a]pyrene – conjugate vaccines. *Vaccine*, 2009, Vol. 27, no. 31, pp. 4142-4151.
21. Hajian-Tilaki K. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Caspian J. Intern. Med.*, 2013, Vol. 4, no. 2, pp. 627-635.
22. Hillier S.G., Groom G.V., Boyns A.R., Cameron E.H. Effects of active immunisation against steroids upon circulating hormone concentrations. *J. Steroid Biochem.*, 1975, Vol. 6, no. 3-4, pp. 529-535.
23. Hirose T., Morito K., Kizu R., Toriba A., Hayakawa K., Ogawa S., Inoue S., Muramatsu M., Masamune Y. Estrogenic/antiestrogenic activities of benzo[a]pyrene monohydroxy derivatives. *J. Health Sci.*, 2001, Vol. 47, no. 6, pp. 552-558.
24. Ishibashi H., Suzuki T., Suzuki S., Niikawa H., Lu L., Miki Y., Moriya T., Hayashi S., Handa M., Kondo T., Sasano H. Progesterone receptor in non-small cell lung cancer – a potent prognostic factor and possible target for endocrine therapy. *Cancer Res.*, 2005, Vol. 65, no. 14, pp. 6450-6458.
25. Kreuzer M., Gerken M., Heinrich J., Kreienbrock L., Wichmann H.E. Hormonal factors and risk of lung cancer among women? *Int. J. Epidemiol.*, 2003, Vol. 32, no. 2, pp. 263-271.
26. Liu K., Lin X., Zhou Q., Ma T., Han L., Mao G., Chen J., Yue X., Wang H., Zhang L., Jin G., Jiang J., Zhao J., Zou B. The associations between two vital GSTs genetic polymorphisms and lung cancer risk in the Chinese population: evidence from 71 studies. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 7, e102372. doi: 10.1371/journal.pone.0102372.
27. Lodovici M., Luceri C., Guglielmi F., Bacci C., Akpan V., Fonnesu M.L., Boddi V., Dolara P. Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2004, Vol. 13, no. 8, pp. 1342-1348.
28. Nagata Y., Hanagiri T., Mizukami M., Kuroda K., Shigematsu Y., Baba T., Ichiki Y., Yasuda M., So T., Takenoyama M., Sugio K., Nagashima A., Yasumoto K. Clinical significance of HLA class I alleles on postoperative prognosis of lung cancer patients in Japan. *Lung Cancer*, 2009, Vol. 65, no. 1, pp. 91-97.
29. Newman M.J., Light B.A., Weston A., Tollurud D., Clark J.L., Mann D.L., Blackmon J.P., Harris C.C. Defection and characterization of human serum antibodies to polycyclic aromatic hydrocarbon diol-epoxide DNA adducts. *J. Clin. Invest.*, 1988, Vol. 82, no. 1, pp. 145-153.
30. Ozbek N., Birinci A., Karaoglanoglu O., Coban A.Y., Okumus B., Cakir S., Durupinar B. HLA alleles and lung cancer in a Turkish population. *Ann Saudi Med.*, 2004, Vol. 24, no. 2, pp. 106-111.
31. Pauk N., Klimesova S., Kara J., Topinka J., Labaj J. The relevance of monitoring of antibodies against polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and PAH-DNA adducts in serum in relation to lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Neoplasma*, 2013, Vol. 60, no. 2, pp. 182-187.
32. Pavannello S., Fedeli U., Mastrangelo G., Rota F., Overvad K., Raaschou-Nielsen O., Tjønneland A., Vogel U. Role of CYP1A2 polymorphisms on lung cancer risk in a prospective study. *Cancer Genet.*, 2012, Vol. 205, no. 6, pp. 278-284.
33. Peng W.J., He Q., Yang J.X., Wang B.X., Lu M.M., Wang S., Wang J. Meta-analysis of association between cytokine gene polymorphisms and lung cancer risk. *Mol. Biol. Rep.*, 2012, Vol. 39, no. 5, pp. 5187-5194.
34. Perera F.P., Tang D., Brandt-Rauf P., Santella R.M., Mooney L.V., Tu Y.H., Bendkowska I., Bell D.A. Lack of associations among cancer and albumin adducts, ras p21 oncoprotein levels, and protein CYP1A1, CYP2D6, NAT1, and NAT2 in a nested case-control study of lung cancer within the physicians' health study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2006, Vol. 15, no. 7, pp. 1417-1419.
35. Petruzzelli S., Celi A., Pulera N., Baliva F., Viegi G., Carrozzi L., Ciacchini G., Bottai M., Di Pede F., Paoletti P., Giuntini C. Serum antibodies to benzo(a) pyrene diol epoxide DNA adducts in the general population: effects of air pollution, tobacco smoking and family history of lung diseases. *Cancer Res.*, 1998, Vol. 58, no. 8, pp. 4122-4126.

36. Pouns O., Mangas A., Coveñas R., Geffard M. Circulating antibodies directed against “polycyclic aromatic hydrocarbon-like” structures in sera of cancer patients. *Cancer Epidemiol.*, 2009, Vol. 33, no. 1, pp. 3-8.
37. Rengarajan T., Rajendran P., Nandakumar N., Lokeshkumar B., Rajendran P., Nishigaki I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2015, Vol. 5, no. 3, pp. 182-189.
38. Schellenberger M.T., Farinelle S., Williéme S., Muller C.P. Evolution of adjuvants for a candidate conjugate vaccine against benzo[a]pyrene. *Hum. Vaccin.*, 2011, Vol. 7, no. 1, pp. 166-173.
39. Silbart L.K., Rasmussen M.V., Oliver A.R. Immunoprophylactic intervention in chemical toxicity and carcinogenicity. *Vet. Hum. Toxicol.*, 1997, Vol. 39, no. 1, pp. 37-43.
40. Stabile L.P., Dacic S., Land S.R., Lenzner D.E., Dhir R., Acquafondata M., Landreneau R.J., Grandis J.R., Siegfried J.M. Combined analysis of estrogen receptor beta-1 and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome. *Clin. Cancer Res.*, 2011, Vol. 17, no. 1, pp. 154-164.
41. Xu J., Yin Z., Cao S., Gao W., Liu L., Yin Y., Liu P., Shu Y. Systematic review and meta-analysis on the association between IL-1B polymorphisms and cancer risk. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 5, e63654. doi: 10.1371/journal.pone.0063654.
42. Zhang Y., Liu C., Peng H., Zhang J., Feng Q. IL1 receptor antagonist gene *IL1-RN* variable number of tandem repeats polymorphism and cancer risk: a literature review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 9, e46017. doi: 10.1371/journal.pone.0046017.
43. Zhao J., Wang H., Hu W., Jin Y. Effect of HLA-B-associated transcript 3 polymorphisms on lung cancer risk: a meta-analysis. *Med. Sci. Monit.*, 2014, Vol. 20, pp. 2461-2465.
44. Zhou W., Zhang S., Hu Y., Na J., Wang N., Ma X., Yuan L., Meng F. Retraction note to: Meta-analysis of the associations between TNF- α or IL-6 gene polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Eur. J. Med. Res.*, 2016, Vol. 21, no. 1, p. 31.

Авторы:

Глушков А.Н. — д.м.н., профессор, директор Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии «Сибирского отделения Российской академии наук»; профессор кафедры генетики биологического факультета ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

Поленок Е.Г. — к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии «Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Гордеева Л.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии «Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Мун С.А. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии «Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Костянко М.В. — ведущий инженер кафедры органической химии Института фундаментальных наук ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

Титов В.А. — заведующий торакальным отделением ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия

Вафин И.А. — главный врач ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия

Рагожина С.Е. — заместитель главного врача по медицинской части ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия.

Authors:

Glushkov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Genetics, Institute of Ecology, Biodiversity and Natural Resources, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

Polenok E.G., PhD (Pharmacy), Leading Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Gordeeva L.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunogenetics, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Mun S.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunogenetics, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Kostyanko M.V., Leading Engineer, Department of Organic Chemistry, Institute of Fundamental Sciences, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

Titov V.A., Chief, Thoracic Department, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Vafin I.A., Physician-in-Chief, Regional Center of Blood, Kemerovo, Russian Federation

Ragozhina S.E., Deputy Physician-in-Chief for Medicine, Regional Center of Blood, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 30.06.2017
Принята к печати 13.07.2017

Received 30.06.2017
Accepted 13.07.2017

ДИСБАЛАНС В СИСТЕМЕ «ЦИТОКИНОВАЯ СЕТЬ – РЕГУЛЯТОРНО-ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ» ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ БЕСПЛОДИЯ В ПРОГРАММАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

**Зорина В.Н., Лихачева В.В., Зорина Р.М., Баженова Л.Г.,
Третьякова Т.В., Архипова С.В., Ренге Л.В., Зорин Н.А.**

Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Резюме. При лечении хронического бесплодия эффективность программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) не превышает 40%. Важнейшей задачей является изучение патогенетических механизмов, выявление и коррекция факторов, отрицательно влияющих на прогноз наступления и исход ожидаемой беременности. Известно, что гиперсекреция цитокинов препятствует имплантации, однако их взаимосвязь с иммунорегуляторными белками при различных видах бесплодия малоизученна.

Цель исследования: изучение изменений содержания цитокинов (IL-8, IL-6, TNF α , IFN γ), лактоферрина и α 2-макроглобулина в фолликулярной жидкости и венозной крови женщин с бесплодием различного генеза, для оценки их влияния на результаты программ ЭКО.

Изученные показатели определялись в образцах, полученных в день проведения трансвагинальной пункции фолликулов у 28 бесплодных с наружным генитальным эндометриозом, 38 – с хроническим эндометритом, 31 – с синдромом поликистозных яичников, 25 с аденомиозом, а также у группы сравнения (37 женщин с «чистым» трубным фактором бесплодия). По результатам ЭКО женщины были ретроспективно разделены на забеременевших и незабеременевших.

Установлено, что при наружном генитальном эндометриозе в фолликулярной жидкости и крови снижено содержание хемоаттрактанта IL-8 и модулирующего его синтез лактоферрина, обладающего антипролиферативной активностью. При трубном бесплодии, ассоциированном с хроническим эндометритом, выявлено повышение концентрации провоспалительного TNF α и лактоферрина в крови незабеременевших, свидетельствующее о наличии скрытого воспаления. У женщин с синдромом

Адрес для переписки:

*Зорина Вероника Николаевна
Новокузнецкий государственный институт
усовершенствования врачей
654005, Россия, Кемеровская обл., г. Новокузнецк,
пр. Строителей, 5.
Тел.: 8 (3843) 45-84-18.
E-mail: macroglobulin@yandex.ru*

Address for correspondence:

*Zorina Veronika N.
Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical
Education
654005, Russian Federation, Kemerovo Region, Novokuznetsk,
Stroiteley ave, 5.
Phone: 7 (3843) 45-84-18.
E-mail: macroglobulin@yandex.ru*

Образец цитирования:

*В.Н. Зорина, В.В. Лихачева, Р.М. Зорина,
Л.Г. Баженова, Т.В. Третьякова, С.В. Архипова,
Л.В. Ренге, Н.А. Зорин «Дисбаланс в системе
«цитокиновая сеть – регуляторно-транспортные
белки» при различных видах бесплодия в программах
экстракорпорального оплодотворения» // Медицинская
иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 203–214.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-203-214*

© Зорина В.Н. и соавт., 2018

For citation:

*V.N. Zorina, V.V. Likhacheva, R.M. Zorina, L.G. Bazhenova,
T.V. Tretyakova, S.V. Arkhipova, L.V. Renge, N.A. Zorin
“Imbalance in cytokine network/regulatory transport protein
system in various types of infertility during in vitro fertilization
programs”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 203–214.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-203-214*

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-203-214

поликистозных яичников снижена концентрация $\text{TNF}\alpha$ в фолликулярной жидкости и крови на фоне повышенного содержания $\text{IFN}\gamma$. При аденомиозе повышен уровень $\text{IFN}\gamma$ в фолликулярной жидкости при сниженном содержании регуляторно-транспортного $\alpha 2$ -макроглобулина в крови.

Выявленные изменения концентраций цитокинов и регулирующих их синтез белков у бесплодных женщин обосновывают неэффективность программ ЭКО в ряде случаев – данный дисбаланс оказывает негативное влияние на развитие ооцитов, формирование и развитие эмбрионов, а также на их способность к имплантации. Необходимо углубленное изучение подобных факторов патогенеза для совершенствования подходов к предгравидарной подготовке, повышающих эффективность лечения хронического бесплодия методом ЭКО.

Ключевые слова: цитокины, альфа-2-макроглобулин, лактоферрин, бесплодие, ЭКО, прогноз

IMBALANCE IN CYTOKINE NETWORK/REGULATORY TRANSPORT PROTEIN SYSTEM IN VARIOUS TYPES OF INFERTILITY DURING *IN VITRO* FERTILIZATION PROGRAMS

Zorina V.N., Likhacheva V.V., Zorina R.M., Bazhenova L.G.,
Tretyakova T.V., Arkhipova S.V., Renge L.V., Zorin N.A.

Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education, a Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Abstract. Treatment efficiency of chronic infertility does not exceed 40% when using *in vitro* fertilization (IVF) programs. Therefore, sufficient attention should be given to studies of pathogenetic mechanisms, identification and correction of the factors that adversely affect onset and outcomes of pregnancy. It is known that hypersecretion of cytokines interferes with implantation, but their relationship with immunoregulatory proteins is poorly understood for various types of infertility. The aim of present study was to investigate changes in cytokine contents (IL-8, IL-6, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$), lactoferrin and $\alpha 2$ -macroglobulin concentration in follicular fluid and venous blood of women with infertility of various genesis, and to evaluate their effects upon results of the IVF programs.

The studied proteins were determined in the samples obtained on the day of transvaginal puncture of follicles in 28 infertile women with external genital endometriosis, 38 cases of chronic endometritis, 31 women with polycystic ovary syndrome, 25 patients with adenomyosis, and in 37 women with pure tubal infertility factor (comparison group). According to IVF outcomes, the patients were retrospectively divided into those who became gravid, and women with pregnancy failure. In cases of external genital endometriosis, we have found reduced contents of chemoattractant IL-8 in follicular fluid and blood, as well decreased levels of lactoferrin, which modulates its synthesis and shows antiproliferative activity. In blood of non-pregnant women with tubal infertility associated with chronic endometritis, increased concentrations of pro-inflammatory $\text{TNF}\alpha$ and lactoferrin were revealed, thus suggesting presence of latent inflammation. Among women with polycystic ovary syndrome, the $\text{TNF}\alpha$ concentration in follicular fluid and blood was reduced, along with increased content of $\text{IFN}\gamma$. In cases of adenomyosis, the $\text{IFN}\gamma$ levels in follicular fluid were increased, accompanied by reduced content of regulatory-transport $\alpha 2$ -macroglobulin in blood samples.

The revealed changes in cytokine concentrations and proteins which regulate their synthesis, in biological samples from infertile women may explain the ineffectiveness of IVF programs in a number of cases. Such an imbalance has a negative impact upon development of oocytes, growth of embryos, and their ability for implantation. It is important to continue further investigations of such pathogenetic factors in order to improve approaches providing better efficiency of IVF in chronic infertility treatment.

Keywords: cytokines, alpha2-macroglobulin, lactoferrin, infertility, IVF, prognosis

Введение

Прогрессирующее ухудшение репродуктивного здоровья женщин является не только медицинской, но и социальной проблемой. По литературным данным, в мире бесплодны не менее 48,5 млн супружеских пар, из них 19,2 млн не могут родить первого ребенка, а 29,3 – второго, более половины нуждаются в использовании методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [8]. В структуре причин бесплодия часто встречаются: нарушение проходимости маточных труб, хроническое воспаление, препятствующее имплантации (эндометрит, аднексит), эндокринный фактор бесплодия (ановуляция), врожденные пороки развития, гинекологические заболевания с неуточненным патогенезом и аутоиммунными проявлениями (эндометриоз, синдром поликистозных яичников [СПКЯ]), а также мужской фактор. Применение ВРТ позволяет отчасти решить проблему бесплодия, однако, даже при получении эмбрионов хорошего качества, эффективность программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), по данным регистра ВРТ РАРЧ, не превышает 40%. Одной из причин снижения эффективности являются препятствующие имплантации и развитию беременности изменения цитокинового профиля, особенно IL-6, IL-11, LIF, а также TGF- β , EGF и других факторов роста [21], наблюдаемые при различных заболеваниях. Нередко исследователи не разделяют причины дисбаланса цитокинового профиля, приводящие к неудачному исходу программ ВРТ. В частности, при анализе аспириатов эндометрия перед проведением ЭКО у бесплодных женщин (вне зависимости от причины) установлено, что неудачный результат ассоциирован с повышенным содержанием TNF α и IL-10 при нормальном содержании IL-1 β [20]. Повышенные уровни IL-6 в фолликулярной жидкости чаще ассоциированы с отрицательным результатом ЭКО [7].

Однако сходные изменения, происходящие за счет остаточных проявлений воспалительной реакции, активации аутоиммунных процессов или за счет врожденных дефектов синтеза белков, могут различаться по следствиям. Известно, что в клетках эндометрия при остром эндометрите значительно усилена экспрессия IL-6, IL-1 β , TNF α [4] и IL-8 [15]. В венозной крови женщин с острым послеродовым эндометритом повышены концентрации провоспалительных IL-1 β , TNF α , в лохиях увеличено содержание IL-6 [17].

Очевидно, что изменения цитокинового профиля у женщин, вступающих в программу ЭКО после прегравидарной подготовки, должны быть менее выражены, чем при остром процессе, но и явления подострого воспаления поддерживают повышенные уровни цитокинов. Подтверждением этому является повышенное содержание IL-6, IL-1 β , TNF α в менструальной крови больных хроническим эндометритом [23], а также достоверное повышение α 1-антитрипсина, лактоферрина, TNF α и IFN γ в сыворотке крови женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия, без клинических проявлений воспаления, вступающих в программы ЭКО [1].

Высокий процент бесплодия при наружном генитальном эндометриозе, когда отсутствуют воспалительные проявления заболевания и нет механических препятствий для имплантации, объясняется избытком TNF α , провоцирующего активную децидуализацию эутопических стромальных клеток эндометрия [16], а также увеличением концентрации IL-8, HGF и снижением IL-13 в перитонеальной жидкости [14]. Ранее нами установлено, что в сыворотке крови женщин, страдающих тяжелыми формами эндометриоза, увеличены концентрации TNF α , лактоферрина, снижен уровень α 2-макроглобулина [2].

Бесплодие при синдроме поликистозных яичников ряд авторов связывают с аутоиммунной патологией, полиморфизмом генов различных цитокинов [12], экспрессия которых, включая IL-6, IL-8, ассоциирована как с воспалением, так и с онкопролиферацией [13].

При аденомиозе у женщин с бесплодием отмечается патологическая экспрессия клетками эндометрия IL-8 и его рецепторов CXCR1, CXCR2 [24], избыточная экспрессия IL-6, IL-17, IFN γ и сниженная – IL-10 [26].

Необходимо учитывать и влияние на патологические процессы при бесплодии иммуномодуляторных белков, таких как лактоферрин и α 2-макроглобулин (α 2-МГ). Известно, что лактоферрин, синтезированный эпителиальными клетками, а также депонированный в гранулах нейтрофилов, активно модулирует синтез цитокинов, является важным компонентом мукозального иммунитета (обладает выраженной антибактериальной, противовирусной, антипаразитарной, фунгицидной и антипролиферативной активностью), контролирует созревание Т- и В-клеток, обеспечивает взаимодействие между компонентами врожденного и адаптивного иммунитета, регулирует реакции на окислительный стресс и воспалительный ответ [6, 22]. По-

лифункциональный $\alpha 2$ -макроглобулин является не только ингибитором протеиназ и негативным реактантом воспаления — он оказывает иммуномодулирующее воздействие на синтез цитокинов, а также транспортирует их к клеткам-мишеням, защищая от разрушения свободными протеиназами [9, 19].

Целью данного исследования было изучение изменений содержания некоторых цитокинов, лактоферрина и $\alpha 2$ -макроглобулина в фолликулярной жидкости и венозной крови женщин с бесплодием различного генеза, для оценки их влияния на результаты программ ЭКО.

Материалы и методы

В исследование включены 159 пациенток, проходивших лечение бесплодия методом ЭКО. В зависимости от причины infertility и исхода программ все женщины были разделены на подгруппы: 28 пациенток составили группу с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ), из которых беременность наступила у 10 (38,5%) и не наступила у 18 (61,5%); 38 пациенток с трубным бесплодием, ассоциированным с хроническим эндометритом, из которых забеременели 18 (48,6%) и не забеременели 20 (51,4%); 31 пациентка с эндокринным фактором бесплодия на фоне синдрома поликистозных яичников (СПКЯ), из которых беременность наступила у 16 человек (51,6%) и не наступила у 15 (48,4%) и 25 женщин с аденомиозом, из которых забеременели 11 пациенток (44%) и не забеременели 14 (56%). Группу сравнения составили 37 пациенток с «чистым» трубным фактором бесплодия (без эндометрита), из которых забеременели 18 человек (48,6%) и не забеременели 19 (51,4%). Обследование и лечение проводилось на базе клиники «Медика» (группа компаний «Мать и дитя», г. Новокузнецк). От всех принимавших участие в исследовании женщин было получено добровольное информированное согласие.

Всем пациенткам проводилось комплексное обследование в соответствии с приказом № 107 н от 30.08.2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Верификация диагноза проводилась на основании общеклинических, лабораторных исследований, трансвагинальной эхографии в разные фазы менструального цикла, лапароскопии, гистероскопии, морфологического исследования биоптатов. После обследования и прегравидарной подготовки всем женщинам проводилась про-

грамма ЭКО. Индукция суперовуляции в обеих группах проводилась по «короткому» протоколу с использованием антагонистов гонадотропин-рилизинг-гормона по стандартной методике [3]. Оплодотворение ооцитов производилось методом ЭКО. Селективный перенос 1 бластоцисты проводился на 5-е сутки культивирования.

Получение фолликулярной жидкости осуществлялось во время проведения трансвагинальной пункции преовуляторных фолликулов. В случае попадания проводной крови в содержимое фолликулов исследование данного материала не проводилось. Образцы сыворотки венозной крови получали также в день пункции фолликулов. Биологический материал замораживали при температуре -20°C и хранили до проведения исследований.

Содержание цитокинов (IL-8, IL-6, TNF α , IFN γ) определяли методом ИФА с использованием соответствующих коммерческих тест-систем (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Содержание $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови и фолликулярной жидкости определяли методом количественного ракетного иммуноэлектрофореза, концентрации ЛФ оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), с использованием исследовательских тест-систем, разработанных на базе НИЛ иммунологии НГИУВ — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО (г. Новокузнецк).

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи сертифицированной программы InStat II (GraphPad, США). Использовалась проверка распределения по Колмогорову—Смирнову, в зависимости от ее результатов проводилось парное межгрупповое сравнение показателей с применением параметрического (по критерию Стьюдента) либо непараметрического вариантов t-статистики.

Результаты и обсуждение

Фолликулярная жидкость (табл. 1)

При наружном генитальном эндометриозе концентрация классического провоспалительного TNF α при наступлении беременности в программе ЭКО была достоверно ниже, чем в группе женщин с трубным бесплодием (группа сравнения), и в 2 раза ниже, чем в подгруппе с отрицательным результатом программы ЭКО. Уровни провоспалительного хемоаттрактанта IL-8, вне зависимости от результата ЭКО, были ниже, чем в группе сравнения. Содержание иммуномодуляторного лактоферрина, синтез ко-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ И ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ В Фолликулярной жидкости при бесплодии различного генеза в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО)

TABLE 1. CONTENTS OF CYTOKINES AND IMMUNOREGULATORY PROTEINS IN FOLLICULAR FLUID SAMPLES IN INFERTILITY OF DIFFERENT ORIGIN WHEN PERFORMING *IN VITRO* FERTILIZATION (IVF) PROGRAMS

Показатели Parameters	Результат ЭКО IVF results	Группа сравнения (трубный фактор бесплодия) Comparison group	Виды бесплодия Triggering factors of infertility			
			Наружный генитальный эндометриоз External genital endometriosis	Хронический эндометрит Chronic endometritis	Синдром поликистозных яичников Polycystic ovary syndrome	Аденомиоз Adenomyosis
TNF α , пкг/мл TNF α , pkg/ml	бер. (+) pregnant	2,1 \pm 0,4 (n = 18)	0,5 \pm 0,2 (n = 10) p = 0,0430 p ₃ = 0,0498	1,6 \pm 0,5 (n = 18)	2,0 \pm 0,7 (n = 12)	1,9 \pm 0,6 (n = 12)
	небер. (-) non-pregnant	1,5 \pm 0,2 (n = 21)	1,3 \pm 0,3 (n = 16)	2,2 \pm 0,7 (n = 19)	0,7 \pm 0,1 (n = 12) p = 0,0070 p ₃ = 0,0068	1,7 \pm 0,3 (n = 14)
IL-6, пкг/мл IL-6, pkg/ml	бер. (+) pregnant	16,4 \pm 2,8	15,2 \pm 2,5	12,1 \pm 1,7	13,9 \pm 3,1	14,6 \pm 1,9
	небер. (-) non-pregnant	16,5 \pm 1,9	14,7 \pm 2,9	17,5 \pm 2,9	15,4 \pm 3,5	21,9 \pm 5,7
IL-8, пкг/мл IL-8, pkg/ml	бер. (+) pregnant	257,6 \pm 14,3	188,9 \pm 24,5 p = 0,0150	223,9 \pm 20,2	203,8 \pm 24,9 p = 0,0480	223,3 \pm 13,0
	небер. (-) non-pregnant	267,0 \pm 14,2	189,8 \pm 12,2 p = 0,0003	261,2 \pm 20,8	151,5 \pm 38,9 p = 0,0022 p ₂ = 0,0110 p ₃ = 0,0426	241,5 \pm 20,2
IFN γ , пкг/мл IFN γ , pkg/ml	бер. (+) pregnant	5,0 \pm 0,5	6,5 \pm 0,2 p = 0,0400 p ₂ = 0,0152	4,7 \pm 0,5	7,1 \pm 0,4 p = 0,0050 p ₂ = 0,0018	6,4 \pm 0,2 p = 0,0360 p ₂ = 0,0125
	небер. (-) non-pregnant	5,0 \pm 0,3	6,1 \pm 0,2 p = 0,0070	5,8 \pm 0,5	6,8 \pm 0,2 p = 0,0002	6,8 \pm 0,5 p = 0,0024
α 2МГ, г/л α 2-macroglobulin, g/l	бер. (+) pregnant	0,14 \pm 0,02 (n = 24)	0,14 \pm 0,02 (n = 12)	0,14 \pm 0,02 (n = 30)	0,20 \pm 0,04 (n = 17)	0,18 \pm 0,03 (n = 12)
	небер. (-) non-pregnant	0,17 \pm 0,01 (n = 41)	0,16 \pm 0,01 (n = 17)	0,14 \pm 0,02 (n = 35)	0,16 \pm 0,02 (n = 16)	0,18 \pm 0,02 (n = 15)
ЛФ, мг/л Lactoferrin, mg/l	бер. (+) pregnant	0,21 \pm 0,03	0,14 \pm 0,02 p ₃ = 0,0098	0,20 \pm 0,02	0,18 \pm 0,02	0,22 \pm 0,02
	небер. (-) non-pregnant	0,21 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01 p = 0,0070 p ₂ = 0,0010 p ₃ = 0,0550 p ₄ = 0,0085	0,23 \pm 0,03	0,16 \pm 0,01	0,21 \pm 0,03

Примечание. p – статистическая достоверность отличий от группы сравнения, p₁ – различия между группами беременных и небеременных в рамках одной патологии, p₂ – отличие от подгруппы с хроническим эндометритом при сходном результате программы, p₃ – отличие от подгруппы с аденомиозом при сходном результате программы, p₄ – отличие от подгруппы с синдромом поликистозных яичников при сходном результате программы. Количество обследованных (n) одинаково для всех цитокинов и совпадает для белков, поэтому указано по первому цитокину и белку соответственно.

Note. p, statistical significance of differences from the comparison group, p₁, differences between groups of pregnant and non-pregnant patients within the same disorder; p₂, difference from the subgroup with chronic endometritis, with similar IVF result; p₃, difference from subgroup with adenomyosis with similar program result; p₄, difference from the subgroup with polycystic ovary syndrome, with a similar result of the program. The number of examined (n) is the same for all cytokines, being also equal for the proteins, so it is mentioned for TNF and α 2-macroglobulin, respectively.

того взаимосвязан с синтезом IL-8, вне зависимости от результатов ЭКО, было практически в 2 раза ниже, чем в группе сравнения. Уровень противовоспалительного IFN γ в фолликулярной жидкости, напротив, был достоверно выше показателей группы сравнения. Концентрации иммуномодуляторных IL-6 и α 2-МГ, синтез которых взаимосвязан, при наружном генитальном эндометриозе не зависели от результата ЭКО и не отличались от показателей, характерных для группы сравнения.

Таким образом, состав фолликулярной жидкости у женщин с диагнозом «наружный генитальный эндометриоз», вступивших в программу ЭКО, свидетельствовал об отсутствии даже минимальных проявлений классической воспалительной реакции. Достоверно сниженный уровень TNF α в группе женщин с наружным генитальным эндометриозом и положительным результатом ЭКО объясняется, вероятнее всего, не недостатком синтеза, а несколько повышенными уровнями данного цитокина в группе женщин с трубным бесплодием (группа сравнения), не являющихся абсолютно здоровыми. Уровень провоспалительного IFN γ был немного выше, чем в группе сравнения, но в целом находился в пределах нормы. Самым важным, на наш взгляд, являлся выявленный дефицит локальной секреции ЛФ и IL-8. Поскольку ЛФ является не только защитным фактором при различных видах инфекции, но и модулирует пролиферативные процессы [6, 22], его локальный дефицит, в сочетании с недостатком хемоаттрактанта IL-8, стимулирующего его синтез, может играть ключевую роль в развитии бесплодия при эндометриозе. Вероятнее всего, дефицит локальной секреции ЛФ и хемоаттрактантов является основным звеном в активации патологических процессов, а выявляемое при тяжелых формах наружного генитального эндометриоза повышение ЛФ в сыворотке крови [1] и IL-8 в перитонеальной жидкости [14] вторично и связано с присоединением воспалительной реакции. Дефицит ЛФ был ранее выявлен нами и в перитонеальной жидкости при данной патологии [2].

При трубном бесплодии, ассоциированном с хроническим эндометритом, статистически достоверных отличий в содержании цитокинов и белков от группы сравнения выявить не удалось. Однако при положительном результате ЭКО в группах женщин с хроническим эндометритом отмечались самые низкие значения противовоспалительного IFN γ (достоверные отличия от других групп при развитии беременности)

и самые высокие — провоспалительного TNF α (у женщин с отрицательным результатом ЭКО различия недостаточно значимы статистически). Средние уровни иммунорегуляторных белков также демонстрировали недостоверную тенденцию к снижению в случае α 2-МГ и повышению в случае ЛФ. Учитывая, что данные белки являются позитивным и негативным реактантами воспалительной реакции, можно предполагать наличие латентного воспаления в данной группе. Особенно показательна в этом плане тенденция к повышению уровня ЛФ в фолликулярной жидкости при негативном исходе программы ЭКО — причиной увеличения количества молекул ЛФ, вероятнее всего, является не активация синтеза, а высвобождение резервного пула данного белка, депонированного в гранулах нейтрофилов, при воспалительной реакции [6, 22]. Сопутствующие локальные реакции «кислородного взрыва» способны повреждать (окислять) белки, регулирующие жизнедеятельность клеток и взаимодействующие с цитокинами [25], влияя на процессы оплодотворения и имплантации. При этом некоторый недостаток IFN γ благоприятен, поскольку одна из причин активации его синтеза — носительство герпетической инфекции, препятствующей имплантации. Таким образом, у женщин с трубным фактором бесплодия, ассоциированным с хроническим эндометритом, подготовленных к вступлению в программу, воспалительные проявления слабо выражены и локализованы преимущественно в полости матки, что не позволяет выявить значимые различия с группой сравнения. Возможно, наличие в анамнезе у женщин с «чистым» трубным фактором бесплодия (группа сравнения) воспалительных заболеваний гениталий дополнительно маскирует статистическую значимость изменений.

Синдром поликистозных яичников многие авторы относят к аутоиммунной патологии [15]. Согласно полученным результатам, при данном заболевании действительно наблюдался дисбаланс белкового и цитокинового профиля, не соответствующий ни классическим воспалительным проявлениям, ни иммунодефицитным состояниям. В частности, при отрицательном результате ЭКО выявлен низкий уровень TNF α , а также IL-8 и незначимая тенденция к дефициту ЛФ в фолликулярной жидкости. Эти данные частично противоречат результатам других исследователей [13], что объясняется различным методическим подходом — в программы ЭКО заведомо не включают пациенток с активными и тяжелыми формами заболевания.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ И ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ В СЫВОРОТКЕ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ ПРИ БЕСПЛОДИИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА В ПРОГРАММАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ (ЭКО)

TABLE 2. THE CONTENT OF CYTOKINES AND IMMUNOREGULATORY PROTEINS IN THE VENOUS BLOOD IN INFERTILITY OF VARIOUS GENESIS AT *IN VITRO* FERTILIZATION (IVF) PROGRAMS.

Показатели Parameters	Результат ЭКО IVF results	Группа сравнения (трубный фактор бесплодия) Comparison group	Виды бесплодия Triggering factors of infertility			
			Наружный генитальный эндометриоз External genital endometriosis	Хронический эндометрит Chronic endometritis	Синдром поликистозных яичников Polycystic ovary syndrome	Аденомиоз Adenomyosis
TNF α , пкг/мл TNF α , pkg/ml	бер.(+) pregnant	1,7 \pm 0,3 (n = 18)	1,0 \pm 0,4 (n = 10)	1,2 \pm 0,2 (n = 18)	0,8 \pm 0,3 (n = 16) p = 0,0400 p ₃ = 0,0236	1,7 \pm 0,1 (n = 11)
	небер. (-) non-pregnant	1,3 \pm 0,3 (n = 19)	0,9 \pm 0,2 (n = 18) p ₂ = 0,0012 p ₃ = 0,0210	2,2 \pm 0,3 (n = 20) p = 0,0300 p ₁ = 0,008	0,5 \pm 0,2 (n = 15) p = 0,0470 p ₂ = 0,0001 p ₃ = 0,0006	1,6 \pm 0,2 (n = 14)
IL-6, пкг/мл IL-6, pkg/ml	бер. (+) pregnant	1,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,1 p = 0,0030 p ₂ = 0,0165 p ₃ = 0,0068	1,8 \pm 0,4	1,7 \pm 0,6	1,1 \pm 0,2
	небер. (-) non-pregnant	2,0 \pm 0,4	1,0 \pm 0,2 p = 0,0347	1,3 \pm 0,1	1,1 \pm 0,3	1,0 \pm 0,2 p = 0,0499
IL-8, пкг/мл IL-8, pkg/ml	бер. (+) pregnant	4,1 \pm 0,5	3,6 \pm 0,3	3,1 \pm 1,1	2,7 \pm 0,7	3,6 \pm 0,4
	небер. (-) non-pregnant	4,4 \pm 0,9	3,6 \pm 0,4	4,7 \pm 1,4	2,9 \pm 0,6	4,0 \pm 0,6
IFN γ , пкг/мл IFN γ , pkg/ml	бер. (+) pregnant	5,5 \pm 0,6	6,5 \pm 0,3	5,6 \pm 0,4	7,3 \pm 0,2 p = 0,0080 p ₂ = 0,0009 p ₃ = 0,0001	5,8 \pm 0,2
	небер. (-) non-pregnant	5,5 \pm 0,6	6,4 \pm 0,4	5,9 \pm 0,6	7,3 \pm 0,3 p = 0,010 p ₃ = 0,0002	5,7 \pm 0,2
α 2МГ, г/л α 2-macroglobulin, g/l	бер. (+) pregnant	2,44 \pm 0,14 (n = 24)	3,11 \pm 0,27 (n = 13) p = 0,0197 p ₂ = 0,0153	2,57 \pm 0,08 (n = 30)	3,11 \pm 0,18 (n = 17) p = 0,0046 p ₂ = 0,0029	2,75 \pm 0,20 (n = 12)
	небер. (-) non-pregnant	2,47 \pm 0,11 (n = 34)	2,96 \pm 0,18 (n = 18) p = 0,0177 p ₂ = 0,0097 p ₃ = 0,0018	2,45 \pm 0,10 (n = 35)	2,67 \pm 0,18 (n = 16)	2,17 \pm 0,15 (n = 19) p ₁ = 0,0257
ЛФ, мг/л Lactoferrin, mg/l	бер. (+) pregnant	0,85 \pm 0,09	0,89 \pm 0,12	1,12 \pm 0,09 p = 0,0470	0,86 \pm 0,11	1,02 \pm 0,16
	небер. (-) non-pregnant	0,82 \pm 0,07	0,80 \pm 0,08 p ₂ = 0,0031	1,23 \pm 0,09 p = 0,0006 p ₃ = 0,0021	1,01 \pm 0,13	0,78 \pm 0,09

Примечание. p – статистическая достоверность отличий от группы сравнения, p₁ – различия между группами беременных и небеременных в рамках одной патологии, p₂ – отличие от подгруппы с хроническим эндометритом при сходном результате программы, p₃ – отличие от подгруппы с аденомиозом при сходном результате программы. Количество обследованных (n) одинаково для всех цитокинов и совпадает для белков, поэтому указано по первому цитокину и белку соответственно.

Note. p, statistical significance of differences from the comparison group; p₁, differences between groups of pregnant and non-pregnant patients within the same disorder; p₂, difference from the subgroup with chronic endometritis, with similar IVF result; p₃, difference from subgroup with adenomyosis with similar program result. The number of examined (n) is the same for all cytokines, being also equal for the proteins, so it is mentioned for TNF and α 2-macroglobulin, respectively.

При аденомиозе выявлены наименьшие изменения уровней изученных цитокинов и иммуномодуляторных белков в фолликулярной жидкости. Содержание пары лактоферрин – IL-8, а также TNF α оставалось практически неизменным вне зависимости от результата программы ЭКО и не отличалось от группы сравнения. Повышение IL-6 в группе женщин с отрицательным результатом ЭКО было недостоверно, связано с высокой индивидуальной вариабельностью показателей и не влияло на содержание α 2-МГ. Повышенное, вне зависимости от результата ЭКО, содержание IFN γ в фолликулярной жидкости совпадало с результатами исследований других авторов [26]. Возможно, оно косвенно подтверждает теорию о том, что вирусы являются триггерными факторами при патологической пролиферации тканей, и стимулированная ими гиперсекреция данного цитокина может быть задействована в патогенезе. По крайней мере, известно, что рецепторы для IFN γ активно экспрессируют не только лейкоциты, но и эндотелиальные, эпителиальные клетки [5], что позволяет предполагать участие нарушений синтеза данного цитокина в патогенезе аденомиоза.

В группе женщин с трубным фактором бесплодия (группа сравнения) содержание изученных цитокинов и иммунорегуляторных белков не зависело от результата программы экстракорпорального оплодотворения.

Сыворотка крови (табл. 2)

Для уточнения вопроса о том, насколько локализованы изменения цитокинов и иммунорегуляторных белков, выявленные в фолликулярной жидкости, мы проанализировали содержание данных показателей в сыворотке венозной крови.

Установлено, что в группе сравнения, как и при анализе фолликулярной жидкости, отсутствует достоверная зависимость от результата программы ЭКО. Необходимо подчеркнуть, что при изучении содержания цитокинов в крови их уровни были минимальны во всех группах обследованных участниц ЭКО-программ и не выходили за рамки максимальных значений «нормы», указанных производителем тест-систем.

Тем не менее при наружном генитальном эндометриозе уровень провоспалительных цитокинов в крови был минимальным. Обращает на себя внимание низкое содержание иммуномодуляторного IL-6, при том что содержание α 2-МГ, зависящее от его уровня, было достоверно повышено, вне зависимости от результата программы. Кро-

ме того, при данной патологии обнаруживались самые низкие уровни лактоферрина в крови, особенно при негативном результате ЭКО. Это подтверждает важную роль дефекта синтеза лактоферрина в патогенезе наружного генитального эндометриоза. Очевидно, что системный дефицит иммуномодуляторного ЛФ негативно влияет на цитокиновый профиль, способствуя возникновению и прогрессии патологической пролиферации. Ситуация усугубляется при неадекватном функционировании и парадоксальном накоплении в циркуляции другого иммуномодулятора – α 2-МГ, вероятно, вследствие окисления и изменения сродства к рецепторам [11, 25].

При трубном бесплодии, ассоциированном с хроническим эндометритом, напротив, отмечались самые высокие уровни TNF α и ЛФ среди подгрупп незабеременевших пациенток. Учитывая, что другие авторы наблюдали значительное увеличение концентраций провоспалительных цитокинов на фоне острого эндометрита [17], это подтверждает высказанные ранее предположения о наличии остаточных проявлений воспаления даже после лечения и подготовки к программе ЭКО.

При синдроме поликистозных яичников в сыворотке крови, как и в фолликулярной жидкости, наблюдались самые низкие уровни TNF α и самые высокие – IFN γ . Известно, что IFN γ , способен активно стимулировать дифференцировку В-клеток и усиливать выработку антител [5], а также воздействовать на макрофаги, провоцируя формирование активных форм кислорода и образование NO-радикалов. Они, в числе прочего, способны повреждать регуляторно-транспортные белки, включая α 2-МГ [11, 25]. О наличии подобного эффекта можно судить по парадоксальному накоплению α 2-МГ в сыворотке крови при данной патологии, а также по более широкому разбросу индивидуальных показателей IL-6, модулирующего синтез α 2-МГ, и по сниженному количеству TNF α – известно, что окисление α 2-МГ приводит к изменению его сродства к TNF α , а также к снижению эффективности регуляции синтеза и транспорта цитокинов, осуществляемых данным белком [25]. Нельзя исключать и влияние вирусносительства на патогенез СПКЯ – известно, что некоторые вирусы (к примеру, *Herpes simplex*) стимулируют синтез IFN γ . Проявления жизнедеятельности вирусов, не приводящие к развитию воспалительного ответа, но влияющие в конечном итоге на геном, вполне способны привести к развитию аутоиммунной патологии. К примеру, избыток

IFN γ способен стимулировать гиперсинтез аутоантител В-клетками.

У женщин с аденомиозом, участвующих в программах ЭКО, в сыворотке крови не наблюдались даже те минимальные изменения, что выявлялись при анализе фолликулярной жидкости. Это отчасти подтверждает теорию о том, что в патогенезе данного заболевания ведущая роль отводится нарушению ангиогенеза и локальному гиперсинтезу ростовых факторов [18], а не классических про- и противовоспалительных цитокинов. Обращает на себя внимание тот факт, что в группе незабеременевших женщин с аденомиозом была самая маленькая средняя концентрация $\alpha 2\text{MG}$ в крови – известно, что синтез данного иммуномодулятора подавляется избытком TGF- α [10].

Обобщая вышперечисленное, можно заключить, что в патогенезе бесплодия различного генеза задействованы различные механизмы, помимо классической воспалительной реакции – от иммунодефицитных состояний и нарушения регуляторно-транспортных взаимосвязей до аутоиммунных проявлений. Подобные изменения зачастую не сопровождаются ни выраженными клиническими проявлениями, ни высокодостоверными различиями концентраций цитокинов и иммуномодуляторных белков в образцах непосредственно из микроокружения развивающихся ооцитов и тем более из общей циркуляции крови. Тем не менее даже такие ничтожно малые изменения могут оказывать негативное влияние на развитие ооцитов, формирование

и развитие эмбрионов, а также на их способность к имплантации в программах экстракорпорального оплодотворения. Необходимы дальнейшие исследования особенностей иммунных реакций при хроническом бесплодии различного генеза, в целях повышения эффективности программам ЭКО, а также совершенствования подходов к предгравидарной подготовке.

Выводы

При проведении программ экстракорпорального оплодотворения дисбаланс в системе «цитокиновая сеть – регуляторно-транспортные белки» как в составе фолликулярной жидкости, так и в общей циркуляции крови свидетельствует о сниженной вероятности наступления беременности, в том числе:

1) низкая концентрация IL-8 и лактоферрина в фолликулярной жидкости и крови при наружном генитальном эндометриозе;

2) повышенная концентрация TNF α и лактоферрина в крови при трубном бесплодии, ассоциированном с хроническим эндометритом;

3) сниженная концентрация TNF α в фолликулярной жидкости и крови на фоне повышенного содержания IFN γ при синдроме поликистозных яичников;

4) повышенный уровень IFN γ в фолликулярной жидкости и сниженное содержание $\alpha 2$ -макроглобулина в крови при аденомиозе.

Список литературы / References

1. Зорина Р.М., Маркина Л.А., Зорина В.Н., Баженова Л.Г., Чирикова Т.С., Зорин Н.А. Некоторые острофазовые белки и цитокины в сыворотке крови у женщин с бесплодием воспалительного генеза при проведении программ экстракорпорального оплодотворения // Российский вестник акушера-гинеколога, 2010. Т. 10, № 4. С. 13-16. [Zorina R.M., Markina L.A., Zorina V.N., Bazhenova L.G., Chirikova T.S., Zorin N.A. Some acute-phase proteins and cytokines in the serum of women with infertility of inflammatory genesis in the implementation of *in vitro* fertilization programs. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin of the Obstetrician-Gynecologist*, 2010, Vol. 10, no. 4, pp. 13-16. (In Russ.)]
2. Зорина В.Н., Третьякова Т.В., Зорина Р.М., Баженова Л.Г., Рябичева Т.Г., Зорин Н.А. Сравнительное содержание регуляторно-транспортных белков, цитокинов и специфических иммунных комплексов в крови, перитонеальной жидкости и кистозном содержимом у женщин при наружном эндометриозе // Акушерство и гинекология, 2012. № 6. С. 28-35. [Zorina V.N., Tretyakova T.V., Zorina R.M., Bazhenova L.G., Ryabicheva T.G., Zorin N.A. The comparative levels of regulatory transport proteins, cytokines, and specific immune complexes in the blood, peritoneal fluid, and cystic contents of women with external endometriosis. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2012, no. 6, pp. 28-35. (In Russ.)]
3. Назаренко Т.А. Стимуляция функции яичников. М: МЕДпресс-информ, 2015. 288 с. [Nazarenko T.A. Stimulation of the function of the ovaries]. Moscow: MEDpress-inform, 2015. 288 p.
4. Овчарук Э.А., Хадарцева К.А., Овчарук В.Л. Хронические аутоиммунные эндометриты диагностика и лечение // Вестник новых медицинских технологий, 2013. №. 1. С. 10-13. [Ovcharuk E.A., Khadartseva K.A.,

Ovcharuk V.L. Autoimmune chronic endometritis diagnostics and treatment. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*, 2013, no. 1, pp. 10-13. (In Russ.)

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

6. Actor J.K., Hwang S.A., Kruzel M.L. Lactoferrin as a Natural Immune Modulator. *Curr. Pharm. Des.*, 2009, Vol. 15, no. 17, pp. 1956-1973.

7. Altun T., Jindal S., Greenesid K., Shu J., Pal L. Low follicular fluid IL-6 levels in IVF patients are associated with increased likelihood of clinical pregnancy. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2011, Vol. 28, no. 3, pp. 245-251.

8. Bahamondes L., Makuch M.Y. Infertility care and the introduction of new reproductive technologies in poor resource settings. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2014, no. 12, p. 87.

9. Birkenmeier G. Targetting the proteinase inhibitor and immune modulatory function of human alpha-2-macroglobulin. *Modern. Asp. Immunobiol.*, 2001, Vol. 3, pp. 32-36.

10. Bode J.G., Fischer R., Haussinger D., Graeve L., Heinrich P.C., Schaper F. The inhibitory effect of IL-1 beta on IL-6-induced alpha 2-macroglobulin expression in due activation NF-kappa B. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 3, pp. 1469-1481.

11. Chiabrando G.A., Vides M.A., Sanchez M.C. Differential binding properties of human pregnancy zone protein- and alpha2-macroglobulin-proteinase complexes to low-density lipoprotein receptor-related protein. *J. Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, Vol. 398, no. 1, pp. 73-78.

12. Guo R., Zheng Y., Yang J., Zheng N. Association of TNF-alpha, IL-6 and IL-1beta gene polymorphisms with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *BMC Genet.*, 2015, no. 16, p. 5.

13. Huddleston H., Irwin J.C., Giudice L.C. Mesenchymal stem/progenitors and other endometrial cell types from women with polycystic ovary syndrome (PCOS) display inflammatory and oncogenic potential. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2013, Vol. 98, no. 9, pp. 3765-3775.

14. Jørgensen H., Hill A.S., Beste M.T., Kumar M.P., Chiswick E., Fedorcsak P., Isaacson K.B., Lauffenburger D.A., Griffith L.G., Qvigstad E. Peritoneal fluid cytokines related to endometriosis in patients evaluated for infertility. *Fertil. Steril.*, 2017, Vol. 107, no. 5, pp. 1191-1199.

15. Kushnir V.A., Solouki S., Sarig-Meth T., Vega M.G., Albertini D.F., Darmon S.K. Systemic Inflammation and autoimmunity in women with chronic endometritis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 75, no. 6, pp. 672-677.

16. Minici F., Tiberi F., Tropea A., Orlando M., Gangale M.F., Romani F., Campo S., Bompiani A., Lanzzone A., Apa R. Endometriosis and human infertility: a new investigation into the role of eutopic endometrium. *Hum. Reprod.*, 2008, Vol. 23, no. 3, pp. 530-537.

17. Mount S., Mead P., Cooper K. Chlamydia trachomatis in the endometrium: can surgical pathologists identify plasma cell. *Adv. Anat. Pathol.*, 2001, Vol. 8, no. 6, pp. 327-329.

18. Mu Y., Hu X., He J., Liu H., Zhang L., Liu H., Hao Z. Serum levels of vascular endothelial growth factor and cancer antigen 125 are related to the prognosis of adenomyosis patients after interventional therapy. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, Vol. 8, no. 6, pp. 9549-9554.

19. Petersen C.M. Alpha 2-macroglobulin and pregnancy zone protein. Serum levels, alpha 2-macroglobulin receptors, cellular synthesis and aspects of function in relation to immunology. *Dan. Med. Bull.*, 1993, Vol. 40, no. 4, pp. 409-446.

20. Rahiminejad M.E., Moaddab A., Ebrahimi M., Rabiee S., Zamani A., Ezzati M., Abdollah Shamshirsaz A. The relationship between some endometrial secretion cytokines and *in vitro* fertilization. *Iran J. Reprod. Med.*, 2015, Vol. 13, no. 9, pp. 557-562.

21. Singh M., Chaudhry P., Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J. Endocrinol.*, 2011, Vol. 210, no. 1, pp. 5-14.

22. Siqueiros-Cendón T., Arévalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B.F., García-Montoya I.A., Salazar-Martínez J., Rascón-Cruz Q. Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2014, no. 35, pp. 557-566.

23. Tortorella C., Piazzolla G., Matteo M., Pinto V., Tinelli R., Sabbà C., Fanelli M., Cicinelli E. Interleukin-6, interleukin-1β, and tumor necrosis factor α in menstrual effluents as biomarkers of chronic endometritis. *Fertil. Steril.*, 2014, Vol. 101, no. 1, pp. 242-247.

24. Ulukus M., Ulukus E.C., Seval Y., Cinar O., Zheng W., Arici A. Expression of interleukin-8 receptors in patients with adenomyosis. *Fertil. Steril.*, 2006, Vol. 85, no. 3, pp. 714-720.

25. Wu S.M., Patel D.D., Pizzo S.V. Oxidized alpha2-macroglobulin (alpha 2M) differentially regulates receptor binding by cytokines/growth factors: implications for tissue injury and repair mechanisms in inflammation. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, no. 8, pp. 4356-4365.

26. Zhihong N., Yun F., Pinggui Z., Sulian Z., Zhang A. Cytokine profiling in the eutopic endometrium of adenomyosis during the implantation window after ovarian stimulation. *Reprod Sci.*, 2016, Vol. 23, no. 1, pp. 124-133.

Авторы:

Зорина В.Н. — д.б.н., главный научный сотрудник НИЛ иммунологии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Лихачева В.В. — к.м.н., ассистент кафедры акушерства и гинекологии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Зорина Р.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник НИЛ иммунологии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Баженова Л.Г. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Третьякова Т.В. — к.м.н., ассистент кафедры акушерства и гинекологии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Архипова С.В. — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Authors:

Zorina V.N., PhD, MD (Biology), Main Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education, a Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Likhacheva V.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education, a Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Zorina R.M., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education, a Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Bazhenova L.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Obstetrics and Gynecology, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education, a Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Tretyakova T.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education, a Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Arkhipova S.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education, a Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Ренге Л.В. — д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Renge L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education, a Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Зорин Н.А. — д.б.н., профессор, заведующий НИЛ иммунологии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Zorin N.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education, a Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Поступила 23.06.2017
Принята к печати 13.07.2017

Received 23.06.2017
Accepted 13.07.2017

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ

Савченко А.А.^{1,2}, 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 «НИИ 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 ФГАУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

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

Резюме. Целью исследования явилось изучение особенностей фенотипа дендритных клеток (ДК), дифференцированных из моноцитов периферической крови, у больных раком почки (РП). Обследовано 28 больных РП (Т3N0M0, светлоклеточный тип) в возрасте 40–55 лет до хирургического лечения и 31 практически здоровый человек аналогичного возрастного диапазона. Незрелые ДК (нДК) генерировали из моноцитов крови путем культивирования в течение 5 суток с GM-CSF и IFN α . Активацию ДК (аДК) индуцировали внесением в среду инкубации лизата опухолевых клеток и TNF α с последующей инкубацией в течение 48 часов. Фенотипирование ДК различной степени зрелости проводили методом проточной цитометрии. Обнаружено, что при дифференцировке моноцитов в нДК у больных РП формируется клеточный пул с высоким уровнем костимуляторной активности за счет увеличения количества клеток с высоким уровнем экспрессии рецепторов CD80 и CD86. При этом в клеточной культуре остается значительное количество недифференцированных моноцитов и клеток с промежуточным фенотипом (CD14⁺CD83⁺). У больных РП в клеточной культуре формируется повышенное (по сравнению с контрольными значениями) количество нДК с фенотипом CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺. Однако уровень экспрессии HLA-DR-рецептора на CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} нДК у больных РП снижен. Следовательно, данный тип ДК обладает высокой костимуляторной и слабой антигенпрезентирующей активностью. При созревании (активации) ДК у больных РП сохраняется значительное количество недифференцированных моноцитов в клеточной культуре, но при снижении содержания клеток с фенотипом CD14⁺CD83⁺. Предположительно часть клеток с фенотипом CD14⁺CD83⁺ при дополнительной антигенной и цитокиновой нагрузке созрела до уровня аДК. Зрелые ДК у больных РП характеризуются слабой костимуляторной и антигенпрезентирующей активностью за счет снижения экспрессии маркеров CD83 и CD86. При созревании количество ДК с различным уровнем экспрессии CD80 в культуре клеток у здоро-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.
Scientific 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, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев,
И.И. Гвоздев, А.В. Мошев «Особенности фенотипа
дендритных клеток, дифференцированных
из моноцитов крови, у больных раком почки»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2.
С. 215–226. doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-215-226
© Савченко А.А. и соавт., 2018

For citation:

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, I.V. Kudryavtsev, I.I. Gvozdev,
A.V. Moshev "Phenotypic peculiarities of dendritic cells
differentiated from blood monocytes in patients with kidney
cancer", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 215–226.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-215-226
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-215-226

вых людей и больных РП выравнивается, но при РП меньше формируется аДК с высокоактивным фенотипом (CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} и CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺). Более того, при онкологии аДК с фенотипом CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} слабее экспрессируют рецепторы для проявления костимуляторной и антигенпрезентирующей активности. Различия в фенотипе нДК и аДК у здоровых людей и больных РП могут определяться различиями в фенотипе и функциональной активности моноцитов крови и иммунодепрессивными факторами, синтезируемые опухолью.

Ключевые слова: дендритные клетки, моноциты, рак почки, фенотип, костимулирующие молекулы, презентация антигена

PHENOTYPIC PECULIARITIES OF DENDRITIC CELLS DIFFERENTIATED FROM BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH KIDNEY CANCER

Savchenko A.A.^{a, b}, Borisov A.G.^{a, b}, Kudryavtsev I.V.^{c, d, e}, Gvozdev I.I.^a,
Moshev A.V.^a

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

^b *Krasnoyarsk V.F. Voino-Yasenetsky State Medical University, Krasnoyarsk, Russia*

^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, Department of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. The aim of the study was to investigate the phenotypic features of dendritic cell (DCs) differentiated from peripheral blood monocytes in patients with kidney cancer (KC). The study involved 28 patients with KC (T3N0M0, clear cell type) before surgical treatment at the age of 40-55 years and 31 healthy age-matched people. Immature DCs (IDCs) were generated from blood monocytes by culturing for 5 days with GM-CSF and IFN α . Activation of the DCs (MDCs) was induced by incubation with tumor cell lysate and TNF α followed by incubation for 48 hours. Phenotyping of DCs at different maturity degrees was carried out by the method of flow cytometry. It was found that the monocytes differentiated into IDCs formed a cellular pool with a high level of costimulatory activity in patients with KC, by increasing number of cells with a high level of CD80 and CD86 receptor expression. In this case, a significant amount of undifferentiated monocytes and cells with an intermediate phenotype (CD14⁺CD83⁺) remained in the cell culture. In KC patients, the cell culture formed an increased number of IDCs with the CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺ phenotype (in comparison with the control values). However, expression level of the HLA-DR receptor on CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}-IDCs in patients with KC was reduced. Therefore, this type of DCs has a high costimulatory and weak antigen-presenting activity. Maturation (activation) of DCs from patients with KC was accompanied by retained amounts of undifferentiated monocytes in cell culture associated with decreased contents of cells with CD14⁺CD83⁺ phenotype. Presumably, a part of cells with the CD14⁺CD83⁺ phenotype and additional antigenic and cytokine load matured to the level of MDCs. Mature DCs in patients with KC are characterized by weak costimulatory and antigen presenting activity, due to decreased expression of CD83 and CD86 markers. Upon maturation, the amount of DCs with different levels of CD80 expression in cell culture in healthy people and in patients with RP is equalized, but the MDCs with a highly active phenotype (CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} и CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺) are formed with KC cells to lesser degree. Moreover, MDCs with CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} phenotype in tumor patients show weaker expression of receptors providing costimulatory and antigen-presenting activity. The differences in the IDCs and MDCs phenotype between healthy people and KC patients may be determined by different features of phenotype and functional activity in blood monocyte populations as well as immunosuppressive factors synthesized by the tumor.

Keywords: dendritic cells, monocytes, kidney cancer, phenotype, costimulatory molecules, antigen presentation

Введение

Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками, играющими центральную роль в осуществлении противоопухолевого иммунитета [1, 24, 29]. Благодаря высокой экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II класса, ко-стимуляторных молекул (CD80 и CD86) и продукции широкого спектра цитокинов и хемокинов, ДК обладают способностью активировать «наивные» Т-лимфоциты и индуцировать антиген-специфический иммунный ответ. Данный механизм позволил, на основе разработанных технологий дифференцировки моноцитов периферической крови в ДК, получать дендритноклеточные вакцины, используемые для лечения различных онкологических и инфекционных заболеваний [18, 22, 26].

Функциональная активность ДК, дифференцированных из моноцитов периферической крови, может во многом зависеть от функционального состояния самих моноцитов и от эффекторных и регуляторных процессов в иммунной системе, которые формируются в процессе развития иммуноопосредованных заболеваний. Доказано, что развитие опухоли в организме обуславливает ингибирование противоопухолевого иммунитета, которое реализуется через нарушение соотношения эффекторных и регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов, синтеза супрессирующих цитокинов и снижение активности эффекторных реакций [1, 20, 32]. Ранее нами установлено, что у больных раком почки (РП) в периферической крови повышается количество CD14^{low}CD16⁺ моноцитов, выявляется дисбаланс в экспрессии активационных маркеров и снижается интенсивность респираторного взрыва [4]. Все это указывает на изменение внутриклеточного гомеостаза моноцитов и их функциональных возможностей.

Таким образом, **целью исследования** явилось изучение особенностей фенотипа дендритных клеток, дифференцированных из моноцитов периферической крови, у больных РП.

Материалы и методы

На базе КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» обследованы больные РП (Т3N0M0, светлоклеточный тип) в возрасте 40-55 лет до хирургического лечения (n = 28). Диагноз «РП» у всех больных верифицирован гистологически. В качестве контрольной группы был обследован 31 практически здоровый человек аналогичного возрастного диапазона.

Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, США) (ρ = 1,077). Моноциты выделяли на чашках Петри (ЗАО «Олданс», Россия) путем прилипания к пластику в среде RPMI-1640 в присутствии 10% аутологичной сыворотки. Дифференцировка моноцитов в незрелые ДК (нДК) осуществлялась в течение 5 суток при 37 °С в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) во флаконах для культивирования (Greiner Bio One, Германия), в среде RPMI-1640, содержащей 10% аутологичной сыворотки и 100 мкг/мл гентамицина, в присутствии GM-CSF (50 нг/мл, Sigma-Aldrich, США) и IFNα (100 Ед/мл, Sigma-Aldrich, США). Активацию (созревание) ДК (аДК) индуцировали внесением в среду инкубации лизата опухолевых клеток (100 мкг/мл) и TNFα (25 нг/мл, Sigma-Aldrich, США) с последующей инкубацией в течение 48 часов.

Для приготовления лизата опухолевых клеток использовали фрагмент опухоли (1 см³), который механически гомогенизировали в забуференном физиологическом растворе и трижды центрифугировали при +4 °С и 400 g в течение 2 минут (Eppendorf Centrifuge 5804R, Германия) для удаления конгломератов ткани. Супернатант замораживался при температуре -80 °С без криопротекторов и проводился через 3 цикла быстрого замораживания-оттаивания. Полученный гомогенат центрифугировали при 2000 g 15 минут. В супернатанте по методу Брэдфорда измеряли концентрацию белка и замораживали для дальнейшего использования при -80 °С. В культуральную среду для активации ДК у больных РП вносился аутологичный лизат опухолевых клеток, у лиц контрольной группы – сливной лизат опухолевых клеток.

Фенотипирование ДК различной степени зрелости проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-TexasRed-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующей панели: CD80-FITC/CD86-PE/HLA-DR-ECD/CD83-PC5/CD14-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [2]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [19]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, США) [17]. В каждой пробе анализировали не менее 50000 ДК. Определяли

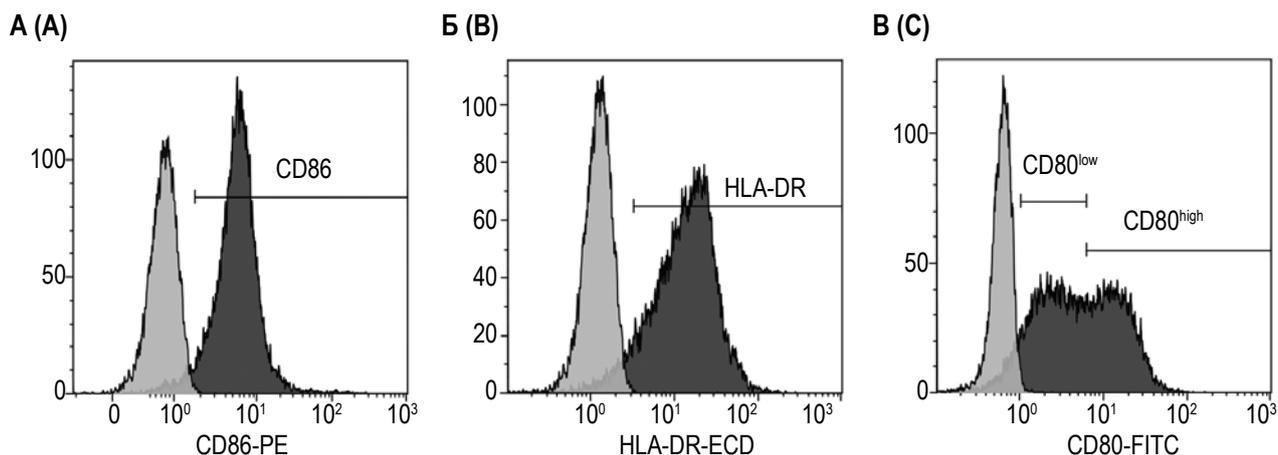


Рисунок 1. Фенотипирование дендритных клеток после инкубации и дифференцировки в условиях *in vitro*

Примечание. Гистограммы А-В: по оси абсцисс – экспрессия CD86, HLA-DR и CD80 (черным) соответственно; по оси ординат – количество проанализированных клеток. Серым – интенсивность флуоресценции антител изотипического контроля, конъюгированных с PE, ECD и FITC соответственно. Гистограмма В – пример выявления дендритных клеток с низкой (CD83⁺CD80^{low}) и высокой (CD83⁺CD80^{high}) экспрессией CD80.

Figure 1. Immune phenotyping of *in vitro* differentiated dendritic cells

Note. Histograms A-C: X-axis, Log fluorescence intensity for CD86, HLA-DR and CD80 antibodies, respectively; Y-axis, relative number of cells.

Grey and black lines indicate the immunofluorescence intensity of CD14^{neg}CD83^{pos} cells stained with an isotypic control (stained with PE, ECD and FITC, respectively) and test antibodies (A-C – cells were stained with anti-human CD86, HLA-DR and CD80 antibodies, respectively). Histogram B shows a representative example of low (CD83⁺CD80^{low}) and high (CD83⁺CD80^{high}) expression of CD80 by *in vitro* differentiated dendritic cells.

ДК с фенотипом CD14⁻CD83⁺. Дальнейшее гейтирование и подсчет клеток проходили относительно данного фенотипа. По средней интенсивности флуоресценции (MFI – Mean Fluorescence Intensity) оценивались уровни экспрессии поверхностных рецепторов.

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 2000 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 независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test). Достоверность различий в динамике лечения определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

Выход нДК с фенотипом CD14⁻CD83⁺ у больных РП составил 17,9% (12,0% – 37,0%), у лиц контрольной группы – 14,2% (8,3% – 21,6%).

У больных РП в клеточной культуре 0,35% (0,08% – 0,99%) клеток оставалось с фенотипом CD14⁺CD83⁻, что значительно выше (p = 0,034), чем у лиц контрольной группы (0,07% [0,04% – 0,16]). Кроме того, через 5 суток инкубации в клеточной культуре у больных РП обнаружено 16,4% (10,5% – 23,0%) клеток с фенотипом CD14⁺CD83⁺, что также значительно превышает (p = 0,009) количество клеток с данным фенотипом у лиц контрольной группы (5,0% [3,8% – 7,2%]).

При исследовании фенотипа нДК обнаружено, что в обеих группах обследуемых наблюдается высокий выход нДК, экспрессирующих молекулы CD80 и CD86 (табл. 1). Однако, если CD86 и HLA-DR экспрессируются на ДК в виде единого пика (рис.1 А, Б соответственно), то экспрессия молекулы CD80 на ДК у лиц контрольной группы и больных РП распределяется на два пика (рис. 1В). В дальнейшем это наблюдение позволило выделить ДК с низкой (CD83⁺CD80^{low}) и высокой (CD83⁺CD80^{high}) экспрессией CD80 (рис. 1В, области «CD80^{low}» и «CD80^{high}» соответственно). Обнаружено, что в культуре нДК при РП снижено относительно контрольных значений количество CD83⁺CD80^{low} клеток и повышено содержание CD83⁺CD80^{high} клеток. Также у больных РП повышен уровень CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} нДК.

Подобные же особенности выявляются при определении содержания CD83⁺CD80^{low} и CD83⁺CD80^{high} нДК, экспрессирующих HLA-DR-

ТАБЛИЦА 1. ФЕНОТИП НЕЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК (В %), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. PHENOTYPE OF IMMATURE DENDRITIC CELLS (IN %) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП KC Patients n = 28	p
CD83 ⁺ CD80 ⁺	95,3 (93,8-98,2)	97,3 (92,8-98,4)	
CD83 ⁺ CD80 ^{low}	73,2 (62,2-76,7)	25,1 (16,9-47,2)	< 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high}	20,0 (13,1-22,1)	52,2 (39,1-56,3)	0,004
CD83 ⁺ CD86 ⁺	99,6 (98,5-99,9)	100,0 (99,9-100,0)	
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ^{high}	6,8 (5,8-10,1)	17,6 (13,8-27,4)	< 0,001
CD83 ⁺ HLA-DR ⁺	99,5 (99,4-99,9)	99,8 (99,5-99,9)	
CD83 ⁺ CD80 ^{low} HLA-DR ⁺	72,9 (61,8-76,7)	25,0 (16,9-47,2)	< 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} HLA-DR ⁺	17,1 (13,1-22,1)	51,2 (38,9-53,9)	0,003
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ^{high} HLA-DR ⁺	6,8 (5,8-10,1)	17,6 (13,8-27,4)	< 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{low} CD86 ⁺	73,0 (62,2-76,2)	25,0 (16,9-47,2)	< 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ⁺	20,0 (13,1-22,1)	52,2 (39,1-56,3)	0,004

и CD86-рецепторы (см. табл. 1). Установлено, что у больных РП количество CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ клеток снижено относительно контрольных значений, тогда как уровни CD83⁺CD80^{high}HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{high}CD86⁺ клеток повышены. Также при РП в 2,6 раза увеличивается содержание CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺ нДК.

При исследовании уровней экспрессии антигенов (по MFI) на поверхности нДК обнаружено, что у больных РП на CD83⁺ клетках интенсивней по сравнению с контролем экспрессирован маркер CD80 (табл. 2). В 2,0 раза повышена экспрессия HLA-DR-рецептора на поверхности CD83⁺CD80^{low} нДК при РП. CD83⁺CD80^{high} нДК у больных РП интенсивнее экспрессируют CD80-, CD86- и HLA-DR-рецепторы. В то же время CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} клетки у больных РП слабее экспрессируют рецептор HLA-DR.

Выход аДК с фенотипом CD14⁻CD83⁺ у больных РП составил 28,6% (16,0% – 57,0%), у лиц контрольной группы – 22,1% (19,2% – 41,0%). При этом выход ДК при РП в культуре при активации повышается (p = 0,017). В клеточной культуре при активации ДК у больных РП относительно контрольных значений повышается количество клеток с фенотипом CD14⁻CD83⁺ (p = 0,004) по сравнению с контрольными значениями (0,05% [0,01% – 0,10%]). На данном этапе культивирования в обследуемых группах отсутствуют различия по содержанию клеток с фенотипом CD14⁺CD83⁺: у больных РП – 5,5% (4,7% – 10,9%), у лиц контрольной группы – 7,4% (4,6% – 13,2%). Однако при активации ДК

у больных РП количество клеток с данным фенотипом снижается (p = 0,041).

При исследовании особенностей фенотипа аДК обнаружено, что при РП снижено содержание в клеточной культуре CD83⁺CD80⁺, CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} и CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺ клеток (табл. 3). При этом у лиц контрольной группы в процессе созревания ДК в 2,3 раза снижается содержание CD83⁺CD80^{low} клеток (p = 0,043) и в 2,3 раза увеличивается уровень CD83⁺CD80^{high} ДК (p = 0,042). У лиц данной группы при созревании повышается содержание ДК с фенотипом CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺ (p = 0,037). Выявляется снижение уровней содержания CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{high}HLA-DR⁺ клеток (p = 0,043 и p = 0,039 соответственно). Также у лиц контрольной группы при созревании ДК понижается уровень CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ клеток и повышается количество CD83⁺CD80^{high}CD86⁺ ДК. У больных РП в процессе созревания в культуре ДК в культуре снижается количество CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} (p = 0,012) и CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺ клеток (p = 0,012).

Изучение уровней экспрессии исследуемых маркеров на аДК позволило установить, что у больных РП по сравнению с контрольными значениями на CD83⁺ клетках слабее экспрессированы рецепторы CD83 и CD86 (табл. 4). При РП на CD80^{low} аДК повышается экспрессия CD80, тогда как на CD80^{high} и CD80^{high}CD86^{high} клетках понижается экспрессия HLA-DR-маркера.

В процессе созревания ДК также меняется экспрессия исследуемых маркеров. Так, у лиц

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ НА НЕЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ (в о.е.), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. THE LEVELS OF ANTIGEN EXPRESSIONS ON IMMATURE DENDRITIC CELLS (in r.u.) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП KC patients n = 28	p
на CD83⁺ клетках on CD83⁺ cells			
CD80	4,26 (2,22-4,56)	5,57 (4,85-6,86)	0,008
CD83	8,64 (6,94-10,60)	9,84 (8,05-10,80)	
CD86	17,90 (15,80-19,90)	16,50 (15,30-17,90)	
HLA-DR	21,00 (14,20-22,40)	29,20 (26,30-36,20)	
на CD80^{low} клетках on CD80^{low} cells			
CD80	1,54 (1,20-2,23)	1,92 (1,87-1,97)	
CD83	5,71 (4,65-9,21)	8,42 (6,99-9,49)	
CD86	6,58 (3,75-9,96)	7,73 (6,70-9,66)	
HLA-DR	13,30 (7,68-15,50)	26,80 (20,50-30,00)	0,007
на CD80^{high} клетках on CD80^{high} cells			
CD80	4,75 (3,80-6,60)	6,80 (5,67-7,75)	0,049
CD83	6,44 (5,01-10,30)	7,41 (6,35-8,43)	
CD86	6,04 (4,78-7,38)	8,40 (7,82-12,60)	0,007
HLA-DR	9,79 (5,23-14,50)	21,80 (16,00-23,40)	0,017
на CD80^{high}CD86^{high} клетках on CD80^{high}CD86^{high} cells			
CD80	7,62 (3,34-8,29)	7,71 (7,00-9,80)	
CD83	78,40 (70,20-115,00)	60,60 (46,60-79,80)	
CD86	12,10 (5,55-19,50)	11,20 (9,17-11,90)	
HLA-DR	126,00 (125,00-221,00)	44,20 (35,20-70,90)	< 0,001

контрольной группы на CD83⁺ клетках в 1,4 раза увеличивается экспрессия CD80-рецептора (p = 0,044), на поверхности CD80^{high} клеток в 4,5 раза повышается экспрессия HLA-DR-рецептора (p < 0,001), тогда как на CD80^{high}CD86^{high} клетках в 1,7 раза понижается уровень экспрессии CD83- (p = 0,040) и в 1,2 раза – HLA-DR-маркера (p = 0,042).

У больных РП обнаружено, что в процессе созревания ДК в культуре снижается экспрессия CD83- (p = 0,003) и HLA-DR-рецептора (p = 0,008) на поверхности CD83⁺ клеток. У лиц данной группы на CD80^{low} клетках слабее экспрессированы молекулы CD83 (p = 0,037), CD86 (p = 0,012) и HLA-DR (p = 0,017). Кроме того, при РП на CD80^{high} клетках также слабее экспрессированы рецепторы CD83 (p = 0,036), CD86 (p = 0,012) и HLA-DR (p = 0,043).

Обсуждение

Особенность состояния иммунной системы при развитии опухоли в организме определяется различными процессами. Во-первых, это формирование, активация и перераспределение (миграция) в организме всех клеток иммунной системы, участвующих в инициации и развитии противоопухолевого иммунитета [5, 7, 28]. И, во-вторых, развитие «защитной» реакции со стороны опухоли, реализующейся в изменении антигенной структуры малигнизированных клеток, синтезом различных цитокинов и других биологически активных веществ, что приводит к ингибированию противоопухолевого иммунитета на различных этапах развития иммунной реакции [1, 20, 33]. Ключевую роль в иммунной системе осуществляют ДК, являющиеся профессиональными анти-

ТАБЛИЦА 3. ФЕНОТИП ЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК (В %), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. PHENOTYPE OF MATURE DENDRITIC CELLS (IN %) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП KC patients n = 28	p
CD83 ⁺ CD80 ⁺	99,5 (98,7-99,7)	96,9 (91,3-99,2)	0,013
CD83 ⁺ CD80 ^{low}	31,8 (16,3-40,7)	47,4 (10,6-60,4)	
CD83 ⁺ CD80 ^{high}	45,3 (26,5-55,9)	37,4 (30,5-73,7)	
CD83 ⁺ CD86 ⁺	99,9 (99,7-100,0)	99,8 (99,3-99,9)	
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ^{high}	13,8 (6,6-35,0)	7,3 (5,2-9,7)	0,044
CD83 ⁺ HLA-DR ⁺	99,8 (99,2-99,9)	99,7 (98,8-99,7)	
CD83 ⁺ CD80 ^{low} HLA-DR ⁺	31,6 (16,2-40,3)	47,3 (10,5-60,3)	
CD83 ⁺ CD80 ^{high} HLA-DR ⁺	46,4 (35,2-67,9)	36,9 (30,4-70,8)	
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ^{high} HLA-DR ⁺	13,8 (6,6-35,0)	7,3 (5,2-9,7)	0,025
CD83 ⁺ CD80 ^{low} CD86 ⁺	31,7 (14,9-40,6)	47,0 (10,6-60,4)	
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ⁺	44,9 (26,5-55,9)	37,3 (30,5-73,7)	

ТАБЛИЦА 4. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ НА ЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ (в о.е.), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 4. THE LEVELS OF ANTIGEN EXPRESSIONS ON MATURE DENDRITIC CELLS (in r.u.) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП KC patients n = 28	p
на CD83⁺ клетках on CD83⁺ cells			
CD80	5,77 (4,94-7,29)	4,57 (3,93-7,15)	
CD83	8,00 (6,95-10,65)	5,24 (4,12-7,09)	0,021
CD86	20,65 (13,70-41,80)	8,95 (8,59-12,40)	0,001
HLA-DR	15,15 (9,67-22,80)	14,35 (9,62-21,50)	
на CD80^{low} клетках on CD80^{low} cells			
CD80	1,52 (1,41-1,87)	1,90 (1,79-2,43)	0,043
CD83	5,71 (4,87-6,33)	4,65 (3,23-6,22)	
CD86	5,71 (3,97-6,77)	4,01 (3,30-5,12)	
HLA-DR	10,50 (7,61-11,90)	13,55 (7,99-18,40)	
на CD80^{high} клетках on CD80^{high} cells			
CD80	5,35 (4,89-8,81)	6,11 (5,09-7,11)	
CD83	6,41 (5,36-7,15)	4,93 (3,99-6,53)	
CD86	6,44 (5,22-8,10)	6,54 (5,78-6,77)	
HLA-DR	44,47 (25,07-55,33)	12,40 (8,25-15,10)	0,027
на CD80^{high}CD86^{high} клетках on CD80^{high}CD86^{high} cells			
CD80	6,25 (4,63-8,42)	7,00 (6,76-7,87)	
CD83	46,85 (30,05-59,15)	37,95 (26,30-85,20)	
CD86	14,35 (9,19-19,25)	11,80 (9,92-14,80)	
HLA-DR	101,80 (76,40-116,50)	47,60 (34,10-88,00)	0,041

генпрезентирующими клетками, инициирующими развитие реакций адаптивного иммунитета на различные антигены, в том числе и противоопухолевые [3, 11, 27]. Однако в ряде работ отмечается, что генерация ДК из моноцитов периферической крови осуществляется недостаточно эффективно: формируются ДК со сниженными функциональными свойствами. Доказано ингибирующее влияние VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) на созревание ДК и экспрессию активационных молекул на их поверхности [1, 21]. В исследовании Liu W.H. и соавт. (2013) показано, что рецепция интерлейкина-10 ДК приводила к снижению уровня экспрессии таких молекул, как CD80, CD86, OX62, MHC-II и CD11b [16]. В предыдущем исследовании нами установлено, что у больных РП в периферической крови изменяется соотношение субпопуляций моноцитов, а также снижается количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR-антиген, и повышается число клеток с экспрессией CD64 [13]. Соответственно, можно предположить, что изменение фенотипа моноцитов крови у больных РП повлияет на особенность фенотипа ДК.

CD83 является основным маркером ДК, по которому осуществлялась их идентификация. CD83 (HB15) представляет собой одноцепочечный гликопротеин типа I с массой 43 кД, член суперсемейства иммуноглобулинов [23, 25]. Данный рецептор ДК принимает участие в антигенпрезентации и, соответственно, инициации иммунного ответа. Выход нДК в клеточной культуре при дифференцировке моноцитов крови у больных РП соответствовал контрольным значениям. Однако при РП в 5 раз больше в культуре клеток остается недифференцированных моноцитов (CD14⁺CD83⁻). Подобный феномен также продемонстрирован в работе Grange C. и соавт. (2015), где отмечается, что клеточные везикулы, выделяемые РП, ингибируют дифференцировку моноцитов в ДК [12]. Кроме того, в клеточной культуре у больных РП также значительно выше содержание клеток с промежуточным фенотипом – CD14⁺CD83⁺. Клетки с данным фенотипом описаны в ряде работ, хотя характеристика их функциональной активности и неоднозначна. Так, в исследовании Prechtel A.T., Steinkasserer A. (2007) клетки с фенотипом CD14⁺CD83⁺ характеризуются нДК [25]. В то же время в исследовании Di Ruschio T. и соавт. (2003) отмечено, что в кратковременной культуре дифференцировки моноцитов повышен выход клеток с коэкспрессией CD14- и CD83-рецепторов, которые способны осуществлять процессинг антигенов и инициировать реакции адаптивного иммунитета [10].

Фенотип ДК также был охарактеризован определением экспрессии еще 3-х маркеров: CD80, CD86 и HLA-DR. CD80 (B7-1, B7 и BB1) и CD86 (B7-2, B70 и Ly-58) представляют собой гликопротеины, принадлежащие к суперсемейству иммуноглобулинов, с массой, соответственно, 60 и 80 кДа. Доказано, что взаимодействие CD80 и CD86 на ДК с CD28 обеспечивает мощный костимуляторный сигнал для активации Т-лимфоцитов, тогда как их взаимодействие с CTLA-4 обеспечивает ингибирующий сигнал для Т-клеток [9, 31]. HLA-DR (антиген главного комплекса гистосовместимости II класса) является гетеродимерным гликопротеином, который экспрессируется на многих типах клеток иммунной системы, для ДК является критическим для осуществления эффективной антигенпрезентации [6, 8]. Содержание нДК с экспрессией CD80-, CD86- и HLA-DR-рецепторов в клеточных культурах у лиц контрольной группы и больных РП не различалось и приближалось к 100%. Однако при РП у нДК выявлялся более высокий уровень экспрессии CD80, чем в контроле.

В то же время при анализе количества нДК с низким и высоким уровнем экспрессии CD80 обнаружено, что у больных РП в клеточной культуре повышено количество нДК с высокой экспрессией CD80 и снижен уровень CD83⁺CD80^{low} клеток. Соответственно данному соотношению клеток с низким и высоким уровнем экспрессии CD80 у больных РП наблюдается повышение количества нДК с фенотипами CD83⁺CD80^{high}HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{high}CD86⁺ относительно контрольных значений, но при снижении процентного содержания CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ клеток. Также при РП в культуре клеток повышается относительное содержание нДК с фенотипами CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} и CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺. При этом установлено, что у больных РП нДК с фенотипом CD80⁺CD80^{low} с большей активностью экспрессируют HLA-DR-рецептор, тогда как на поверхности CD83⁺CD80^{high} нДК наблюдается повышенный уровень экспрессии CD80-, CD86- и HLA-DR-молекул. В то же время при РП на поверхности нДК с фенотипом CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} относительно контрольных значений снижен уровень экспрессии HLA-DR-рецептора.

В целом можно заключить, что при индукции дифференцировки моноцитов периферической крови больных РП формируется пул нДК с более высоким уровнем функциональной активности. Данная особенность реализуется в повышении относительного количества клеток с высоким уровнем экспрессии костимулирующих молекул

и увеличении уровня экспрессии на поверхности нДК костимулирующих рецепторов. В то же время при РП $CD83^+CD80^{high}CD86^{high}$ нДК значительно слабее экспрессируют HLA-DR-маркер. Следовательно, на фоне опухолевого роста дифференцированные из моноцитов крови нДК с наиболее высоким уровнем костимуляторной активности обладают низкой антигенпрезентирующей активностью. Кроме того, имеется ряд исследований, в которых доказывается, что нДК обладают выраженной толерогенной активностью [15, 30, 33].

В клеточной культуре при активации ДК у больных РП остается повышенное количество недифференцированных моноцитов ($CD14^+CD83^+$), но при снижении относительного содержания клеток с промежуточным фенотипом ($CD14^+CD83^+$). У лиц контрольной группы при дифференцировке моноцитов в ДК наблюдается равный выход нДК и аДК, тогда как при РП выход аДК значительно выше, чем нДК. По-видимому, часть клеток с фенотипом $CD14^+CD83^+$ при дополнительной антигенной и цитокиновой нагрузке созревала до уровня аДК. Однако аДК у больных РП слабее экспрессируют CD83- и CD86-маркеры, что определяет более слабый костимуляторный и антигенпрезентирующий сигнал. Необходимо отметить, что сниженный уровень экспрессии костимуляторных молекул на поверхности аДК связывают с повышением вероятности развития метастазов при онкологических заболеваниях [14].

При созревании ДК у лиц контрольной группы в клеточной культуре снижается относительное содержание клеток с фенотипом $CD83^+CD80^{low}$ и повышается с фенотипом $CD83^+CD80^{high}$. Соответственно, меняется относительное количество клеток с фенотипами $CD83^+CD80^{low}CD86^+$ и $CD83^+CD80^{high}CD86^+$. В то же время у больных РП в клеточной культуре при созревании ДК относительное содержание $CD83^+CD80^{low}$, $CD83^+CD80^{high}$, $CD83^+CD80^{low}CD86^+$ и $CD83^+CD80^{high}CD86^+$ практически не меняется, что приводит к выравниванию количества аДК в культурах у здоровых людей и больных РП. При этом в клеточной культуре у больных РП снижается процентное количество аДК, экспрессирующих CD80. Особенностью аДК у больных РП также является более высокий уровень экспрессии CD80 на $CD83^+CD80^{low}$ клетках и сниженный уровень экспрессии HLA-DR на $CD83^+CD80^{high}$ клетках. Более того, у больных РП в процессе созревания на поверхности аДК с фенотипами $CD83^+CD80^{low}$ и $CD83^+CD80^{high}$ снижаются уровни экспрессии таких молекул, как CD83, CD86 и HLA-DR. У лиц контрольной группы в процес-

се созревания ДК уровень экспрессии HLA-DR-рецептора на $CD83^+CD80^{high}$ аДК повышается.

В клеточной культуре у больных РП снижается процентное содержание высокоактивных фракций аДК с фенотипами $CD83^+CD80^{high}CD86^{high}$ и $CD83^+CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR^+$. $CD83^+CD80^{high}CD86^{high}$ клетки у больных также слабее экспрессируют HLA-DR-маркер. В целом, несмотря на то, что у лиц контрольной группы $CD83^+CD80^{high}CD86^{high}$ аДК при созревании стали слабее экспрессировать молекулы CD83 и HLA-DR, у больных РП аДК обладают значительно более слабой костимуляторной и антигенпрезентирующей активностью.

Таким образом, при дифференцировке моноцитов в нДК у больных РП формируется клеточный пул с высоким уровнем костимуляторной активности за счет увеличения количества клеток с высоким уровнем экспрессии рецепторов CD80 и CD86. При этом в клеточной культуре остается значительное количество недифференцированных моноцитов и клеток с промежуточным фенотипом ($CD14^+CD83^+$). У больных РП в клеточной культуре формируется повышенное (по сравнению с контрольными значениями) количество нДК с фенотипом $CD83^+CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR^+$. Однако уровень экспрессии HLA-DR-рецептора на $CD83^+CD80^{high}CD86^{high}$ нДК у больных РП снижен. Следовательно, данный тип ДК обладает высокой костимуляторной и слабой антигенпрезентирующей активностью. При созревании (активации) ДК у больных РП сохраняется значительное количество недифференцированных моноцитов в клеточной культуре, но при снижении содержания клеток с фенотипом $CD14^+CD83^+$. Предположительно часть клеток с фенотипом $CD14^+CD83^+$ при дополнительной антигенной и цитокиновой нагрузке созрела до уровня аДК. Зрелые ДК у больных РП характеризуются слабой костимуляторной и антигенпрезентирующей активностью за счет снижения экспрессии маркеров CD83 и CD86. При созревании количество ДК с различным уровнем экспрессии CD80 в культуре клеток у здоровых людей и больных РП выравнивается, но при РП меньше формируется аДК с высокоактивным фенотипом ($CD83^+CD80^{high}CD86^{high}$ и $CD83^+CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR^+$). Более того, при онкологии аДК с фенотипом $CD83^+CD80^{high}CD86^{high}$ слабее экспрессируют рецепторы для проявления костимуляторной и антигенпрезентирующей активности. Различия в фенотипе нДК и аДК у здоровых людей и больных РП могут определяться различиями в фенотипе и функциональной активности моноцитов крови и иммунодепрессивными факторами, синтезируемые опухолью.

Список литературы / References

1. Кескинов А.А., Щурин М.Р., Бухман В.М., Шпрах З.С. Влияние секретируемых опухолью веществ на дендритные клетки при раке // Российский биотерапевтический журнал, 2017. Т. 16, № 1. С. 12-23. [Keskinov A.A., Shhurin M.R., Buhman V.M., Shprah Z.S. Impact of tumor-derived factors on dendritic cells in cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2017, Vol. 16, no. 1, pp. 12-23. (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. Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Алямкина Е.А., Богачев С.С., Останин А.А., Черных Е.Р. Функциональная активность $IFN\alpha$ - и IL-4-индуцированных дендритных клеток человека: сравнительное исследование // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 43-52. [Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Alyamkina E.A., Bogachev S.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Functional activity of $IFN\alpha$ - and IL-4-induced human dendritic cells: a comparative study. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 43-52. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-43-52.
4. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Мошев А.В., Кудрявцев И.В., Тоначева О.Г., Кошчев В.Н. Фенотипический состав и хемилюминесцентная активность моноцитов у больных почечноклеточным раком // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 2. С. 141-150. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Moshev A.V., Kudryavtsev I.V., Tonacheva O.G., Koshcheev V.N. Monocytes subpopulations and chemiluminescent activity in patients with renal cell carcinoma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 141-150. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2015-2-141-150.
5. Савченко А.А., Модестов А.А., Мошев А.В., Тоначева О.Г., Борисов А.Г. Цитометрический анализ НК- и NKT-клеток у больных почечноклеточным раком // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 1012-1018. [Savchenko A.A., Modestov A.A., Moshev A.V., Tonacheva O.G., Borisov A.G. Cytometric analysis of NK- and NKT-cells in patients with renal cell carcinoma. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Immunological Journal*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 1012-1018. (In Russ.)]
6. Bari R., Hartford C., Chan W.K., Vong Q., Li Y., Gan K., Zhou Y., Cheng C., Kang G., Shurtleff S., Turner V., Pui C.H., Downing J.R., Leung W. Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis revealed SUFU suppression of acute graft-versus-host disease through downregulation of HLA-DR expression in recipient dendritic cells. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, p. 11098.
7. Battaglia S., Muhitch J.B. Unmasking targets of antitumor immunity via high-throughput antigen profiling. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2016, Vol. 42, pp. 92-97.
8. Ciudad M.T., Sorvillo N., van Alphen F.P., Catalán D., Meijer A.B., Voorberg J., Jaraquemada D. Analysis of the HLA-DR peptidome from human dendritic cells reveals high affinity repertoires and nonconventional pathways of peptide generation. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, Vol. 101, no. 1, pp. 15-27.
9. da Cunha A., Antoniazzi Michelin M., Cândido Murta E.F. Phenotypic profile of dendritic and T cells in the lymph node of Balb/C mice with breast cancer submitted to dendritic cells immunotherapy. *Immunol. Lett.*, 2016, Vol. 177, pp. 25-37.
10. Di Pucchio T., Lapenta C., Santini S.M., Logozzi M., Parlato S., Belardelli F. $CD2^+/CD14^+$ monocytes rapidly differentiate into $CD83^+$ dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 2003, Vol. 33, no. 2, pp. 358-367.
11. Gardner A., Ruffell B. Dendritic cells and cancer immunity. *Trends Immunol.*, 2016, Vol. 37, no. 12, pp. 855-865.
12. Grange C., Tapparo M., Tritta S., Deregibus M.C., Battaglia A., Gontero P., Frea B., Camussi G. Role of HLA-G and extracellular vesicles in renal cancer stem cell-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *BMC Cancer*, 2015, Vol. 15, p. 1009.
13. Jakubzick C.V., Randolph G.J., Henson P.M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 6, pp. 349-362.
14. Jia J., Wang Z., Li X., Wang Z., Wang X. Morphological characteristics and co-stimulatory molecule (CD80, CD86, CD40) expression in tumor infiltrating dendritic cells in human endometrioid adenocarcinoma. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2012, Vol. 160, no. 2, pp. 223-227.
15. Wang Y. Immune tolerance of mice allogenic tooth transplantation induced by immature dendritic cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, Vol. 8, no. 4, pp. 5254-5262.
16. Liu W.H., Liu J.J., Wu J., Zhang L.L., Liu F., Yin L., Zhang M.M., Yu B. Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 1, e55487. doi: 10.1371/journal.pone.0055487.
17. 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.
18. Macri C., Dumont C., Johnston A.P., Mintern J.D. Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. *Clin. Transl. Immunology*, 2016, Vol. 5, no. 3, p. e66.

19. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.
20. Maglioco A., Machuca D.G., Badano M.N., Nannini P., Camerano G.V., Costa H., Meiss R., Ruggiero R.A., Giordano M., Dran G.I. B cells inhibit the antitumor immunity against an established murine fibrosarcoma. *Oncol. Lett.*, 2017, Vol. 13, no. 5, pp. 3225-3232.
21. Ni Y.H., Wang Z.Y., Huang X.F., Shi P.H., Han W., Hou Y.Y., Hua Z.C., Hu A.Q. Effect of siRNA-mediated downregulation of VEGF in Tca8113 cells on the activity of monocyte-derived dendritic cells. *Oncol. Lett.*, 2012, Vol. 3, no. 4, pp. 885-892.
22. Okamoto M., Kobayashi M., Yonemitsu Y., Koido S., Homma S. Dendritic cell-based vaccine for pancreatic cancer in Japan. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, 2016, Vol. 7, no. 1, pp. 133-138.
23. Oreshkova N., Wichgers Schreur P.J., Spel L., Vloet R.P., Moormann R.J., Boes M., Kortekaas J. Nonspreading rift valley fever virus infection of human dendritic cells results in downregulation of CD83 and full maturation of bystander cells. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 11, e0142670. doi: 10.1371/journal.pone.0142670.
24. Pfirschke C., Siwicki M., Liao H.W., Pittet M.J. Tumor microenvironment: no effector T cells without dendritic cells. *Cancer Cell*, 2017, Vol. 31, no. 5, pp. 614-615.
25. Prechtel A.T., Steinkasserer A. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch. Dermatol. Res.*, 2007, Vol. 299, no. 2, pp. 59-69.
26. Reardon D.A., Mitchell D.A. The development of dendritic cell vaccine-based immunotherapies for glioblastoma. *Semin. Immunopathol.*, 2017, Vol. 39, no. 2, pp. 225-239.
27. Seyfizadeh N., Muthuswamy R., Mitchell D.A., Nierkens S., Seyfizadeh N. Migration of dendritic cells to the lymph nodes and its enhancement to drive anti-tumor responses. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2016, Vol. 107, pp. 100-110.
28. Tan P., He L., Han G., Zhou Y. Optogenetic immunomodulation: shedding light on antitumor immunity. *Trends Biotechnol.*, 2017, Vol. 35, no. 3, pp. 215-226.
29. Veglia F., Gabrilovich D.I. Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr. Opin. Immunol.*, 2017, Vol. 45, pp. 43-51.
30. Xie J., Lin Y.K., Wang K., Che B., Li J.Q., Xu X., Han F., Liang D.H. Induced immune tolerance of autoantigen loaded immature dendritic cells in homogenic lupus mice. *Genet. Mol. Res.*, 2014, Vol. 13, no. 1, pp. 1251-1262.
31. Yan F., Cai L., Hui Y., Chen S., Meng H., Huang Z. Tolerogenic dendritic cells suppress murine corneal allograft rejection by modulating CD28/CTLA-4 expression on regulatory T cells. *Cell. Biol. Int.*, 2014, Vol. 38, no. 7, pp. 835-848.
32. Zhang H., Xie Y., Li W., Chibbar R., Xiong S., Xiang J. CD4(+) T cell-released exosomes inhibit CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumor immunity. *Cell. Mol. Immunol.*, 2011, Vol. 8, no. 1, pp. 23-30.
33. Zhang L., Xia C.Q. PD-1/PD-L1 Interaction maintains allogeneic immune tolerance induced by administration of ultraviolet B-irradiated immature dendritic cells. *J. Immunol. Res.*, 2016, 2419621. doi: 10.1155/2016/2419621.

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 «НИИ медицинских проблем Севера»; заведующий кафедрой физиологии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

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 «НИИ медицинских проблем Севера»; доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Authors:

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

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

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

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

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

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

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

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

Поступила 05.07.2017
Принята к печати 22.09.2017

Received 05.07.2017
Accepted 22.09.2017

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ: РЕГУЛЯТОРНЫЕ И ЭФФЕКТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ

**Кудрявцев И.В.^{1,2}, Борисов А.Г.^{3,4}, Васильева Е.В.⁵, Кробинцев И.И.⁶,
Савченко А.А.^{3,4}, Серебрякова М.К.¹, Тотолян Арег А.^{2,5}**

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

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр“ Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

⁵ ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

⁶ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD8⁺ играют ведущую роль в защите от внутриклеточных патогенов и собственных измененных клеток. Все CD3⁺CD8⁺ лимфоциты периферической крови на основании экспрессии CD45RA и CD62L были разделены на «наивные» клетки центральной (СМ) и эффекторной (ЕМ) памяти, а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные клетки (TEMRA). С использованием многоцветного анализа на указанных субпопуляциях проведен анализ коэкспрессии эффекторных (перфорин, гранзим В и CD57) и регуляторных (CD27, CD28, CD244 [2B4], CD279 [PD-1] и KLRG1) молекул. CD57 был выявлен на поверхности 2,39±0,31% «наивных» клеток и 5,45±0,91% клеток центральной памяти, тогда как среди CD45RA⁺CD62L⁻ Тцит и TEMRA Тцит уже 26,53±2,20% и 51,43±2,55% клеток, соответственно, экспрессировали данный антиген. Среди «наивных» Тцит гранзим В и перфорин были обнаружены в составе цитоплазматических гранул у 4,22±0,36% и 5,30±0,43% клеток соответственно. Для СМ Тцит эти значения составили 10,09±1,17% и 24,90±3,10% клеток соответственно. Существенное увеличение экспрессии гранзима В и перфорина также было отмечено в линии «клетки эффекторной памяти → клетки TEMRA», когда эти величины достигли значений в 41,05±2,63% и 66,73±3,29%, а также 59,33±4,26% и 75,08±3,12% клеток соответственно. Для регуляторных молекул CD244 и KLRG1 также отмечена сходная тенденция к увеличению экспрессии по мере перехода клеток в эффекторные фазы созревания, тогда как костимуляционные молекулы CD27 и CD28 снижались в линии N → СМ → ЕМ → TEMRA. Максимальный уровень CD279 был отмечен в рамках

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Кудрявцев, А.Г. Борисов, Е.В. Васильева, И.И. Кробинцев, А.А. Савченко, М.К. Серебрякова, Арег А. Тотолян «Фенотипическая характеристика цитотоксических Т-лимфоцитов: регуляторные и эффекторные молекулы» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 227-240.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-227-240
© Кудрявцев И.В. и соавт., 2018

For citation:

I.V. Kudryavtsev, A.G. Borisov, E.V. Vasilyeva, I.I. Krobinets, A.A. Savchenko, M.K. Serebriakova, Areg A. Totolian "Phenotypic characterisation of peripheral blood cytotoxic T lymphocytes: regulatory and effector molecules", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 227-240.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-227-240
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-227-240

клеток EM. Показано, что CD57-позитивные клетки обычно содержат перфорин и гранзим В в составе своих цитоплазматических гранул и не экспрессируют CD28 на своей поверхности, что позволяет использовать CD57 в качестве маркера зрелых эффекторных клеток для проведения многоцветного иммунофенотипирования. Полученные нами результаты по коэкспрессии указанных выше молекул позволяют предполагать, что на роль зрелых эффекторных цитотоксических Т-клеток периферической крови могут претендовать CD45RA⁺CD62L⁻ лимфоциты, позитивные по CD244 и CD57, но не экспрессирующие костимуляционных молекул CD27 и CD28, а также не несущие на своей поверхности ингибиторных рецепторов CD279 и KLRG1.

Ключевые слова: проточная цитофлуориметрия, многоцветный анализ, цитотоксические Т-лимфоциты, дифференцировка, маркеры эффекторных клеток, ингибиторные рецепторы

PHENOTYPIC CHARACTERISATION OF PERIPHERAL BLOOD CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES: REGULATORY AND EFFECTOR MOLECULES

Kudryavtsev I.V.^{a, b}, Borisov A.G.^{c, d}, Vasilyeva E.V.^e, Krobinets I.I.^f, Savchenko A.A.^{c, d}, Serebriakova M.K.^a, Totolian Areg A.^{b, e}

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

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

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

^d Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

^e St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^f Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Cytotoxic T lymphocytes (CD3⁺CD8⁺, Tcyt) play a major role in protective immunity against intracellular pathogens and can eradicate malignant cells. As based on CD45RA and CD62L expression, the peripheral CD3⁺CD8⁺ blood lymphocytes were divided into "naïve" (N) cells, central memory (CM) and effector memory (EM), as well as "terminally-differentiated" CD45RA-positive effector cells (TEMRA). Using multicolor flow cytometry, a co-expression of effector (perforin, granzyme B and CD57) and regulatory (CD27, CD28, CD244 (2B4), CD279 (PD-1) and KLRG1) molecules was studied on all these subsets. CD57 was expressed in 2.39±0.31% "naïve" and 5.45±0.91% of central memory Tcyt. Meanwhile, within EM and TEMRA Tcyt subset, its expression was identified on the cell membranes of 26.53±2.20% and 51.43±2.55% of cells, respectively. Cytolytic effector molecules (granzyme B and perforin) were detected in cytoplasmic granules of 4.22±0.36% and 5.30±0.43% of naïve Tcyt, respectively. For CM cells, these values were 10.09±1.17% and 24.90±3.10%, respectively. Dramatic increases of granzyme B and perforin expression were observed in the "EM → TEMRA" cell lineage, when the relative number of granzyme B-positive cells increased to 41.05±2.63% and 66.73±3.29%, respectively, while perforin was detected in 59.33±4.26% and 75.08±3.12% of cells, respectively. For regulatory molecules, CD244 and KLRG1, the similar dynamics were observed, their expression increased from "naïve" to late maturation stages, while the expression of two main costimulatory molecules – CD27 and CD28, decreased in the lineage N → CM → EM → TEMRA cells. The highest level of CD279 was observed in EM cells. It was shown that CD57-positive cells contain perforin and granzyme B in their cytoplasmic granules and lack CD28 expression. Furthermore, CD57 can be used as a surrogate marker for multicolor immunophenotyping to identify most mature effector cells containing cytolytic enzymes. Our results on the co-expression of all the beforementioned molecules suggest that the most mature CD45RA⁺CD62L⁻ effector peripheral blood cytotoxic T cells express CD244 and CD57, lack costimulation molecules CD27 and of CD28, as well as inhibitory receptors KLRG1 and CD279.

Keywords: flow cytometry, multicolor immunophenotyping, cytotoxic T cell subsets, CD3⁺CD8⁺ maturation, effector molecules, inhibitory receptors

Введение

Цитотоксические Т-лимфоциты (Тцит) с фенотипом CD3⁺CD8⁺ играют ведущую роль в защите от внутриклеточных патогенов и собственных измененных клеток, что позволяет рассматривать данную популяцию клеток периферической крови в качестве основной мишени для терапевтических воздействий при широком круге патологических состояний. Вместе с тем вопросы о дифференцировке антиген-специфических клеток данной популяции, равно как и механизмы, приводящие к появлению у этих лимфоцитов эффекторных свойств, остаются слабо исследованными. Так, в настоящее время в литературе активно обсуждаются как минимум четыре модели, описывающие возникновение эффекторных клеток и клеток памяти [18]. При этом даже клетки памяти периферической крови являются весьма гетерогенной популяцией, в составе которой выявляют как минимум клетки центральной и эффекторной памяти [27], клетки памяти, обладающие некоторыми свойствами стволовых клеток [16], не говоря уже о том, что многочисленные работы свидетельствуют о существовании тканевых резидентных клеток памяти, заселяющих периферические органы и ткани [32]. С другой стороны, уже не подвергается сомнению наличие многочисленных переходных форм между всеми указанными выше субпопуляциями CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов как в циркуляции, так и в лимфоидных органах и периферических тканях [35]. Что же касается зрелых эффекторных клеток, сформировавшихся в результате клональной экспансии, то основное внимание уделяется анализу экспрессии ими эффекторных молекул, к числу которых относятся перфорин и гранзимы [31], секретируемые клетками цитокины и хемокины [9] и, наконец, различного рода поверхностные молекулы, обладающие регуляторными свойствами и способные ингибировать сигнал, поступающий от Т-клеточного рецептора [22]. Поэтому **целью данного исследования** стал анализ экспрессии поверхностных и внутриклеточных антигенов CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, позволяющих охарактеризовать эффекторный потенциал данной популяции клеток периферической крови.

Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь условно здоровых доноров, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием K₃ЭДТА. Все исследования проводились в день взятия крови. В рамках данного исследования было обследовано в общей сложности 82 практически здоровых человека (43 мужчины и 39 женщин)

в возрасте 21–60 лет. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными Хайдуковым С.В. и соавт. [7]. Лимфоциты выявляли при помощи антител против пан-лейкоцитарного маркера CD45 (клон J33). Для выявления цитотоксических Т-клеток (Тцит) с фенотипом CD3⁺CD8⁺ использовали антитела против CD3 (клон UCST1), CD4 (клон 13B8.2) и CD8 (клон B9.11). Для разделения CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов на отдельные субпопуляции применяли антитела против CD45RA (клон 2H4LDH11LDB9 [2H4]) и CD62L (клон DREG56) с использованием описанной ранее «тактики гейтирования» основных субпопуляций [4, 5]. Субпопуляция «наивных» (N) Тцит обладала фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, клетки с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁻ соответствовали Т-лимфоцитам центральной (CM) и эффекторной (EM) памяти соответственно, тогда как «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные Т-клетки (TEMRA) определялись как CD45RA⁺CD62L⁻ (рис. 1).

На всех указанных выше субпопуляциях Тцит, находившихся на разных стадиях дифференцировки, анализировали уровень экспрессии следующих поверхностных антигенов. В рамках отдельного исследования на указанных выше субпопуляциях клеток оценивали уровень поверхностных CD27 (клон 1A4CD27, конъюгированные с PC7, кат. № A54823), CD28 (клон CD28.2, конъюгированные с PC5.5, кат. № B24027) и CD57 (клон NC1, конъюгированные с FITC, кат. № IM0455U). При оценке уровня накопления перфорина (клон B-D48, конъюгированные с фикоэритрином, кат. № 353303) и гранзима В (клон GB11, конъюгированные с Pacific Blue, кат. № 515407) на фоне изменения экспрессии CD57 цитотоксическими Т-клетками различного уровня дифференцировки использовали набор реагентов IntraPrep™ Permeabilization Reagent (кат. № A07803, Beckman Coulter, США). В дальнейшем на цитотоксических Т-клетках различных субпопуляций был проведен анализ поверхностных CD279 (клон EH12.2H7, конъюгированные с PE/Dazzle™ 594, кат. № 329940), CD28 (клон CD28.2, конъюгированные с Brilliant Violet 510™, кат. № 302935), KLRG1 (клон SA231A2, конъюгированные с фикоэритрином, кат. № 367711), CD244 (клон C1.7, конъюгированный с PC5.5, кат. № B21171), а также CD57 (клон NC1, конъюгированные с Pacific Blue, кат. № A74779). Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (кат. № A09777, Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли

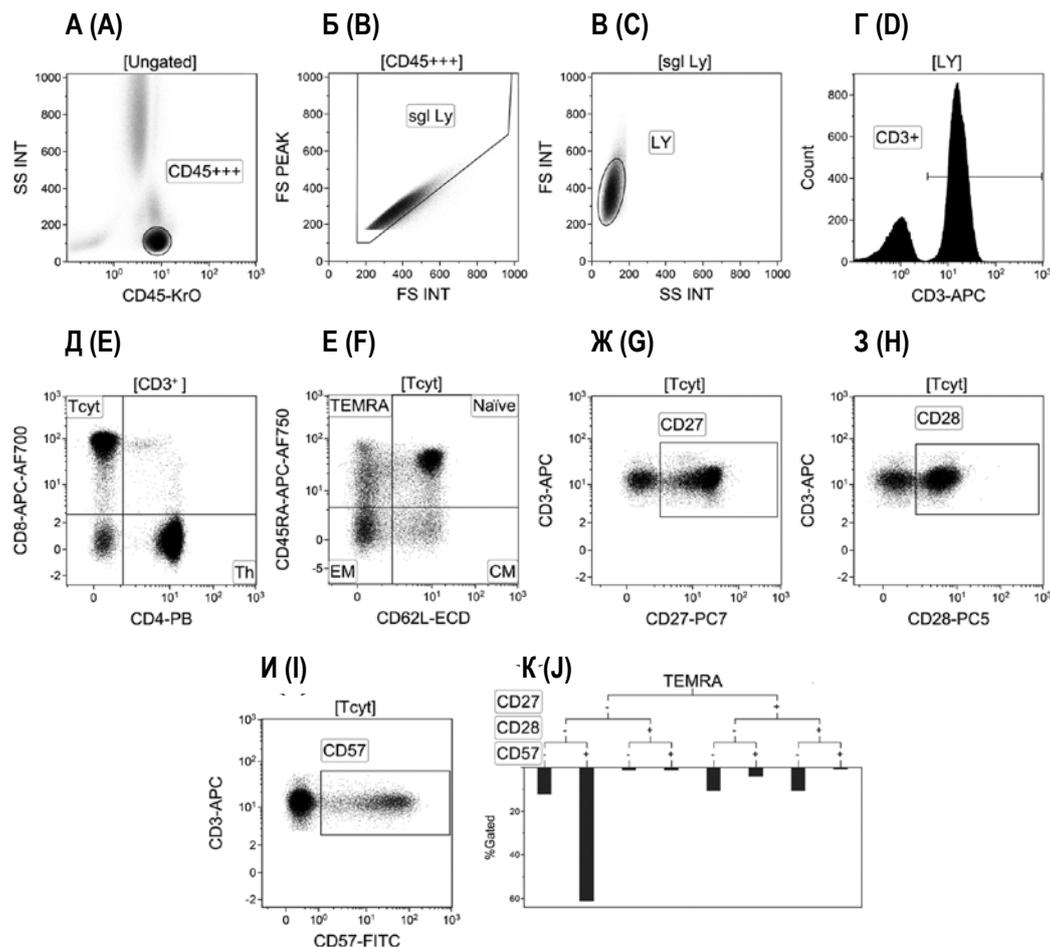


Рисунок 1. Алгоритм пошагового выявления (тактика «гейтирования») различных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов

Примечание. Гистограмма А – выделение популяции лимфоцитов периферической крови на основании экспрессии «пан-лейкоцитарного» маркера CD45 и структуры (боковое светорассеяние, SS) клеток. Гистограмма Б – удаление из зоны анализа слипшихся клеток на основании анализа интегрального и пикового сигналов малоуглового светорассеяния (относительный размер клеток, FS). Гистограмма В – удаление из зоны анализа разрушенных клеток и моноцитов на основании параметров малоуглового (FS) и бокового (SS) светорассеяния. Гистограмма Г – выявление популяции Т-лимфоцитов на основании экспрессии CD3. Гистограмма Д – разделение лимфоцитов (из области CD3⁺ гистограммы Г) на Т-хелперы, экспрессирующие CD4 (область «Th»), и цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD8 (область «Tcyt»). Гистограмма Е – разделение цитотоксических Т-лимфоцитов, выделенных при помощи области «Tcyt» гистограммы Д, на «наивные» клетки (область «Naive»), клетки центральной (CM) и эффектоной памяти (EM), а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные клетки (TEMRA). Гистограммы Ж-И – пример оценки уровня экспрессии CD27, CD28 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами (в областях «CD27», «CD28» и «CD57» расположены клетки, экспрессирующие данные поверхностные антигены, границы областей поставлены на основании оценки неспецифического связывания антител соответствующих изотипических контролей) для построения иерархических дендрограмм. Гистограмма К – пример иерархической дендрограммы, использованной для анализа коэкспрессии CD27, CD28 и CD57 клетками субпопуляции TEMRA (аналогичные дендрограммы применялись для анализа коэкспрессии всех исследованных поверхностных и внутриклеточных антигенов субпопуляциями Тцит, выявленных на основании CD45RA и CD62L).

Figure 1. Flow cytometric gating strategy used to identify main peripheral blood cytotoxic T cells (Tcyt) differentiation stages
Note. Gating strategy for Tcyt cell analysis. (A) Lymphocytes were selected on the side scatter/CD45 expression plot with a gate "CD45⁺⁺⁺"; (B) Singlet gating based on FS PEAK versus FS INT (the region is set to discriminate cell doublets, single cells were located in the gate "sgl Ly"); (C) All lymphocytes were gated on the side scatter/forward scatter plot with a gate "LY"; (D) T cells were identified based on CD3 expression (gate "CD3⁺"); (E) Tcyt were purified within T cell subset as CD4 negative and CD8 positive subset (gate "Tcyt"); (F) then total Tcyt subset was separated in differentiation subsets using CD45RA and CD62L expression (naïve Tcyt were CD45RA⁺CD62L⁺; central memory Tcyt were CD45RA⁻CD62L⁺; effector memory Tcyt were CD45RA⁻CD62L⁻ and "terminally differentiated CD45RA-positive" Tcyt cells were CD45RA⁺CD62L⁻). Dot plots (G), (H) and (I) – expression of CD27, CD28 and CD57, respectively, by total Tcyt cell population, regions "CD27", "CD28" and "CD57" were used as branches for hierarchical tree histograms. Hierarchical tree histogram – histogram (J) – was gated on TEMRA Tcyt as an example. The frequency histograms below the trees indicates the relative proportion of cells in each subset that express CD27, CD28 and CD57 within TEMRA Tcyt as an example.

25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800, Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 330 г в течение 7 минут, после чего надосады удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с рН 7,2-7,4, содержащем 2% параформальдегида (кат. № HT5011, Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм.

Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v. 1.2 и Kaluza™ v. 1.2 (Beckman Coulter, США). Для анализа коэкспрессии различных антигенов на поверхности цитотоксических Т-клеток различного уровня дифференцировки использовали иерархические дендрограммы [24]. Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона – хи-квадрат. Результаты выражали в виде % позитивных клеток от искомой популяции, приводили в виде среднего и ошибки среднего. Сравнение уровней экспрессии основных рецепторов цитотоксическими Т-клетками различных стадий дифференцировки проводили при помощи t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Среди цитотоксических Т-клеток субпопуляции TEMRA CD57 был выявлен примерно на половине клеток (51,43±2,55% клеток, рис. 2А). На CD3⁺CD8⁺ клетках, не обладавших выраженными эффекторными свойствами (клетки с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁺), данный антиген был представлен на поверхности 2,39±0,31% и 5,45±0,91% лимфоцитов соответственно. Тогда как среди CD45RA⁻CD62L⁻ Тцит уже более 20% (26,53±2,20%) клеток экспрессировали эту молекулу. Полученные значения согласуются как с собственными предварительными результатами [2], так и с данными литературы, когда было показано, что среди цитотоксических Т-клеток различного уровня дифференцировки высокая экспрессия CD57 была обнаружена у клеток с фенотипом CD27⁻CD45R0⁻ [12]. В рамках другого исследования было показано, что по мере перехода CD3⁺CD8⁺ клеток от популяции CD27^{high}CD45R0^{low}, состоящей из «наивных» клеток, недавно покинувших тимус, к популяциям CD27^{high}CD45R0^{high} → CD27^{low}CD45R0^{high} → CD27^{low}CD45R0^{dim} → CD27^{low}CD45R0^{low} уровень

экспрессии CD57 возрастал, достигая своего максимума в последней [25].

Гранзим В и перфорин рассматриваются в качестве основных эффекторных молекул цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров периферической крови [10]. Основной функцией гранзима В является индукция апоптоза при помощи каспаза-зависимых и каспаза-независимых механизмов, тогда как перфорин способствует более эффективному проникновению различных гранзимов в цитоплазму клеток за счет формирования поры в поверхностной мембране клетки-мишени. Среди «наивных» цитотоксических Т-клеток с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ гранзим В и перфорин были обнаружены у 4,22±0,36% и 5,30±0,43% клеток соответственно (рис. 2Б и В соответственно). Среди Тцит центральной памяти, уже прошедших антиген-зависимую дифференцировку в периферических лимфоидных органах, эти цитолитические молекулы содержались в цитоплазме уже 10,09±1,17% и 24,90±3,10% клеток соответственно. Существенное увеличение экспрессии гранзима В и перфорина также было отмечено в линии «клетки эффекторной памяти → клетки TEMRA», когда эти величины достигли значений в 41,05±2,63% и 66,73±3,29%, а также 59,33±4,26% и 75,08±3,12% клеток соответственно.

Накопление перфорина и гранзима В цитотоксическими Т-клетками происходит по мере их перехода от популяции «наивных» клеток к «терминально-дифференцированным» CD45RA-позитивным эффекторным клеткам, причем параллельно увеличивается плотность экспрессии CD57 на их поверхности. Было отмечено постепенное снижение относительного числа клеток, негативных по указанным выше антигенам, с 93,45±0,45% и 66,28±3,17% среди CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁺ соответственно, до значений в 25,46±2,35% среди клеток эффекторной памяти с достижением минимальных показателей (16,08±1,98%) в популяции TEMRA. Параллельно наблюдалось увеличение уровня клеток, несущих на своей поверхности или в составе цитоплазматического компартмента все три эффекторные молекулы (рис. 3А). Среди «наивных» клеток и клеток центральной памяти объем данной субпопуляции находился в пределах 2-3% (2,02±0,27% и 3,56±0,69% соответственно), тогда как переход клеток в EM сопровождался почти восьмикратным ее увеличением (до 27,49±2,86%), а среди TEMRA относительное содержание лимфоцитов данного фенотипа достигало уже 48,23±3,69%. Также отмечено, что цитотоксические Т-клетки, не экспрессировавшие CD57, но уже накопившие перфорин

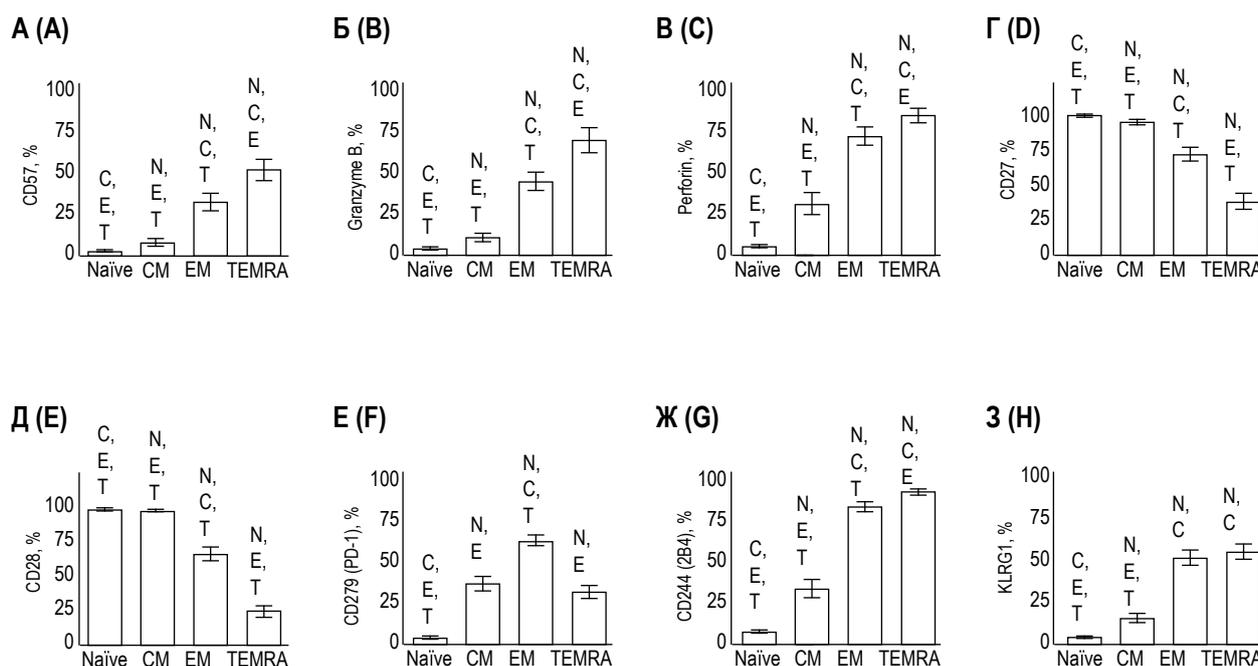


Рисунок 2. Результаты исследования экспрессии поверхностных и внутриклеточных антигенов цитотоксическими Т-лимфоцитами периферической крови

Примечание. Гистограммы А-Г – относительное содержание клеток, экспрессирующих CD57, гранзим В, перфорин, CD27, CD28, CD279 (PD-1), CD244 (2B4) и KLRG1 соответственно.

Здесь и далее на рисунках 3-5: «Naive» – «наивные» цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, «CM» – клетки центральной памяти с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, «EM» – клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻, «TEMRA» – «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные цитотоксические Т-клетки. «N», «C», «E» и «T» – различия с популяциями «наивных» клеток, CM, EM и TEMRA достоверны при $p < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента.

Figure 2. Expression of main cell surface and intracellular antigens by peripheral blood naïve, central memory, effector memory and TEMRA Tcyt subsets

Note. Histograms A-H – frequency of naïve, central memory, effector memory and TEMRA Tcyt cells expressing CD57, granzyme B, perforin, CD27, CD28, CD279 (PD-1), CD244 (2B4) and KLRG1, respectively. The mean percentage and SD of each population are shown.

Here and below on Figures 3-5: “Naive” – “naïve” CD45RA⁺CD62L⁺ Tcyt, “CM” – central memory CD45RA⁺CD62L⁺ Tcyt, “EM” – effector memory CD45RA⁺CD62L⁻ Tcyt, “TEMRA” – terminally differentiated CD45RA-positive effector memory Tcyt. “N”, “C”, “E” and “T” – statistically significant differences as compared with “naive”, central memory, effector memory or TEMRA Tcyt subset were identified (p value was less than 0.05) according to the two-tailed Student t test.

и гранзим В в составе своих цитоплазматических гранул, составляли $18,71 \pm 1,71\%$ от субпопуляции TEMRA (рис. 3Б), что было существенно выше значений, полученных для EM, CM и «наивных» клеток ($13,73 \pm 1,12\%$, $5,97 \pm 0,80\%$ и $1,46 \pm 0,19\%$ соответственно). Что касается CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, экспрессирующих только одну из исследованных молекул, то наиболее выраженная динамика была отмечена только для перфорина (рис. 3В). Так, относительное содержание клеток, накопивших исключительно перфорин в составе цитоплазматических гранул, повышалось в линии «наивные» клетки ($2,04 \pm 0,25\%$) → клетки центральной памяти ($18,65 \pm 2,10\%$) → клетки эффекторной памяти ($25,99 \pm 2,22\%$), тогда как в рамках субпопуляции TEMRA перфорин-позитивные лимфоциты составляли

лишь $12,72 \pm 2,11\%$. Цитотоксические Т-клетки, экспрессировавшие исключительно перфорин или CD57 в отсутствие остальных цитолитических молекул, практически не встречались во всех указанных субпопуляциях. Также следует отметить и тот факт, что CD3⁺CD8⁺ лимфоциты, несущие CD57 и перфорин (рис. 3Г), практически не обнаруживались среди «наивных» клеток, а в рамках остальных исследованных субпопуляций их относительное содержание находилось в пределах 2-3% клеток. Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что CD57 может рассматриваться в качестве поверхностного антигена, свойственного наиболее зрелым цитотоксическим Т-лимфоцитам, которые уже накопили в составе своих цитоплазматических гранул такие цитолитические молекулы, как перфорин

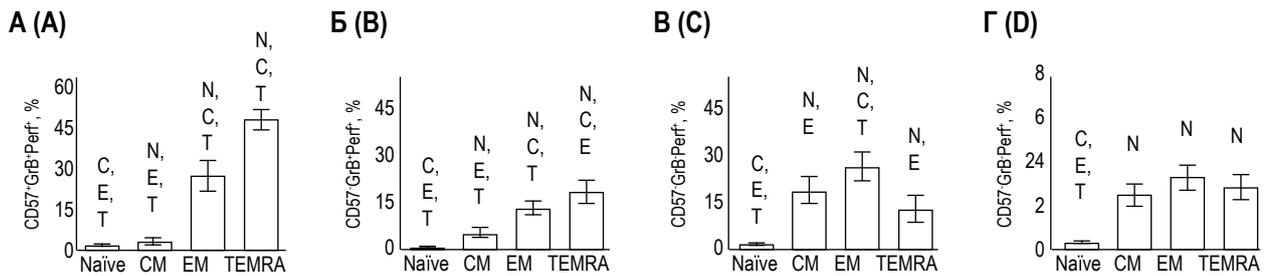


Рисунок 3. Анализ коэкспрессии CD57, гранзима В и перфорины цитотоксическими Т-клетками различных субпопуляций

Примечание. Гистограммы А-Г – относительное содержание клеток с фенотипами CD57⁺гранзим В⁺перфорин⁺, CD57⁺гранзим В⁺перфорин⁺, CD57⁺гранзим В⁻перфорин⁺ и CD57⁺гранзим В⁻перфорин⁺ в рамках субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови, выявленных на основании экспрессии CD45RA и CD62L соответственно. См. примечание к рисунку 2.

Figure 3. Coexpression of CD57, granzyme B and perforin by Tcyt of differentiation states

Note. Histograms A-D – frequency of naive, central memory, effector memory and TEMRA Tcyt cells with CD57⁺granzyme B⁺perforin⁺, CD57⁺granzyme B⁺perforin⁺, CD57⁺granzyme B⁻perforin⁺ and CD57⁺granzyme B⁻perforin⁺ phenotypes, respectively. See note to Figure 2.

и гранзим В. Отдельных дальнейших исследований заслуживает факт обнаружения субпопуляции CD3⁺CD8⁺ клеток, негативных по CD57, но экспрессировавших обе цитолитические молекулы. Более того, синтез и накопление перфорины предшествовало появлению гранзима В в цитоплазме клеток и CD57 на их поверхности.

Поверхностные CD27 и CD28 Т-лимфоцитов традиционно рассматриваются в качестве «костимуляционных» молекул [23]. CD27 принадлежит в семейству рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR), и его основной функцией служит защита активированных «наивных» Т-клеток и Т-клеток памяти от апоптоза за счет усиления экспрессии антиапоптотических белков. Вследствие чего данный антиген считается маркером «неэффекторных» клеток, которым для активации и формирования клона антиген-специфических клеток необходим CD70 [9]. В свою очередь, CD28 принадлежит к иммуноглобулиновому суперсемейству и является трансмембранным гомодимерным гликопротеином, основным лигандом которого являются белки семейства B7. Результатом взаимодействия этой пары молекул является формирование «второго» активационного сигнала, в результате запускается пролиферация Т-клеток, продукция цитокинов (в первую очередь IL-2), а также увеличивается выживаемость Т-клеток за счет экспрессии антиапоптотических белков [30].

Именно поэтому подавляющее большинство «наивных» Т-клеток и Т-клеток центральной памяти, единственным ответом которых на активацию Т-клеточного рецептора антигеном, презентруемым АПК, экспрессируют на своей

поверхности CD27 и CD28 (рис. 2Г и Д соответственно). Анализ экспрессии CD27 показал, что почти 99% «наивных» цитотоксических Т-клеток (98,80±0,41%) несут данный антиген на своей поверхности (рис. 2Г). Несколько меньшие значения – 94,06±0,89% – были отмечены для CM CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, тогда как на лимфоцитах субпопуляций EM и TEMRA имело место постепенное снижение уровня CD27 до 71,14±2,42% и 37,70±2,82% соответственно. Аналогичная тенденция наблюдалась при анализе относительного содержания CD28-позитивных клеток в указанных субпопуляциях цитотоксических Т-лимфоцитов (рис. 2Д). Так, около 95% клеток с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁺ экспрессировали CD28 (95,41±0,56% и 94,72±0,48% соответственно). Уровень данной молекулы снижался на клетках эффекторной памяти до 63,78±2,49% позитивных клеток, достигая своего минимума в рамках Тцит субпопуляции TEMRA (23,18±1,96%). С другой стороны, именно данная пара костимуляционных молекул, а не CD45RA и CD62L, рассматривается в качестве ключевых маркеров для разделения как Т-хелперов, так и цитотоксических Т-клеток на отдельные субпопуляции [3]. Более того, на основании экспрессии CD27 и CD28 клетки эффекторной памяти и TEMRA принято разделять на отдельные субпопуляции, которые различаются по своему пролиферативному и эффекторному потенциалу, спектру синтезируемых цитокинов и т.д. (более подробно [1, 6]).

Доминирующим фенотипом «наивных» цитотоксических Т-клеток был CD27⁺CD28⁺CD57⁻ (94,65±0,65%), а по мере дифференцировки

наблюдалось снижение относительного содержания этих клеток до $87,35 \pm 0,87\%$ среди клеток центральной памяти, до $54,74 \pm 2,34\%$ и $19,80 \pm 1,77\%$ среди клеток эффекторной памяти и TEMRA соответственно (рис. 4А). Параллельно имело место увеличение клеток, негативных по этим трем поверхностным антигенам, чей фенотип может рассматриваться в качестве переходного между неэффекторными и эффекторными клетками. Так, $CD27^-CD28^-CD57^-$ лимфоциты составляли менее 1% среди первых двух субпопуляций, в рамках ЕМ их доля возрастала до $3,86 \pm 0,42\%$, тогда как среди «терминально-дифференцированных» клеток они уже достигали значений в $13,93 \pm 1,24\%$. Экспрессия только одной из ко-стимуляционных молекул – CD27 – была свойственна примерно для 3% $CD3^+CD8^+$ «наивных» и СМ лимфоцитов, тогда как относительное содержание этих клеток возрастало до $8,06 \pm 0,49\%$ и $11,27 \pm 0,95\%$ в рамках ЕМ и TEMRA соответственно (рис. 4Б). Фенотип $CD27^-CD28^+CD57^-$ был характерен для 4-5% клеток центральной и эффекторной памяти, а в оставшихся двух субпопуляциях эти лимфоциты составляли не более 1% клеток. Цитотоксические клетки, коэкспрессировавшие CD28 и CD57, во всех исследованных субпопуляциях не превышали значений в 1%. Наличие CD27 и CD57 на поверхностной мембране было характерно для субпопуляций ЕМ и TEMRA ($5,02 \pm 0,47\%$ и $5,95 \pm 0,68\%$ соответственно), тогда как в рамках оставшихся двух субпопуляций они составляли менее 1% от общего числа проанализированных лимфоцитов (рис. 4В). Наибольший интерес представляет динамика клеток с фенотипом $CD27^-CD28^-CD57^+$, который можно рассматривать в качестве фенотипа самых зрелых эффекторных клеток. Для «наивных» цитотоксических Т-лимфоцитов и клеток центральной памяти данный фенотип был не характерен. Переход в состояние ЕМ сопровождался резким увеличением относительного содержания этих клеток до $19,28 \pm 2,29\%$, а дальнейшая дифференцировка приводила к тому, что в рамках TEMRA $CD57^-$ -позитивные лимфоциты составляли уже $45,67 \pm 2,69\%$ (рис. 4Г).

Таким образом, снижение уровня экспрессии CD27 и CD28 на фоне накопления перфорина и гранзима В в цитолитических гранулах параллельно с увеличением поверхностного CD57 может рассматриваться в качестве главных факторов, свидетельствующих о переходе цитотоксического Т-лимфоцита в эффекторную фазу своего развития. Однако для проявления функциональной активности по отношению к клетки-мишени, распознанной Т-клеточным рецептором, $CD3^+CD8^+$ клетка не должна получать сигнал от широкого спектра ингибиторных рецепторов, весь спектр которых до настоящего

времени еще не изучен [23]. Поэтому в рамках отдельной серии экспериментов нами были исследованы уровни экспрессии трех регуляторных рецепторов – CD279 (PD-1), CD244 (2B4) и KLRG1 – цитотоксическими Т-клетками, экспрессирующими CD57, но уже не несущими на своей поверхности CD28.

Так, на «наивных» $CD3^+CD8^+$ клетках CD279 практически отсутствовал ($4,51 \pm 0,41\%$), тогда как в СМ, и в первую очередь ЕМ PD-1, был представлен на поверхности $36,53 \pm 2,25\%$ и $60,88 \pm 1,72\%$ клеток соответственно (рис. 2Е). Однако при переходе к популяции TEMRA отмечалось резкое снижение клеток, экспрессирующих данный антиген, до $30,87 \pm 2,11\%$. При анализе уровня экспрессии PD-1 цитотоксическими Т-клетками периферической крови условно здоровых доноров данный рецептор был обнаружен на примерно 40-80% клеток памяти ([15], по другим оценкам – 15-35% [36], тогда как на «наивных» клетках он отсутствовал, что в целом совпадает с полученными в ходе проведенного исследования результатами. Среди зрелых цитотоксических Т-клеток PD-1 обнаруживался на 60% клеток эффекторной памяти с фенотипом $CD45RA^-CCR7^-$, тогда как процент позитивных по этому маркеру клеток TEMRA на превышал одной трети от общего числа клеток, а для клеток центральной памяти эта величина составляла в среднем 25% [36].

Уровень экспрессии CD244 возрастал по мере дифференцировки $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов (рис. 2Ж). Так, лишь $7,60 \pm 0,53\%$ «наивных» клеток были позитивны по данному маркеру, тогда как после прохождения антиген-зависимой дифференцировки и формирования клеток центральной памяти уровень экспрессии CD244 возрастал более чем в четыре раза и достигал значений $32,89 \pm 2,62\%$. Подавляющее большинство T_{cyt} с фенотипами $CD45RA^-CD62L^-$ и $CD45RA^+CD62L^-$ несли на своей поверхности данную молекулу ($81,20 \pm 1,51\%$ и $89,91 \pm 0,85\%$ соответственно). Данные литературы также свидетельствуют об увеличении относительного содержания CD244-позитивных клеток среди субпопуляций клеток эффекторной памяти и эффекторных $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов, выявленных на основании наличия CD27, CD28 и CD45RA [11]. Причем среди «терминально-дифференцированных» Тцит клетки данного фенотипа могут достигать значений почти в 100% от популяции как у условно здоровых доноров, так и больных, инфицированных ВИЧ [34]. Вместе с тем большинство современных представлений о роли этого рецептора получены либо на мышинных моделях [13], либо на результатах исследования образцов клеток от больных с хроническими вирусными инфекциями, такими

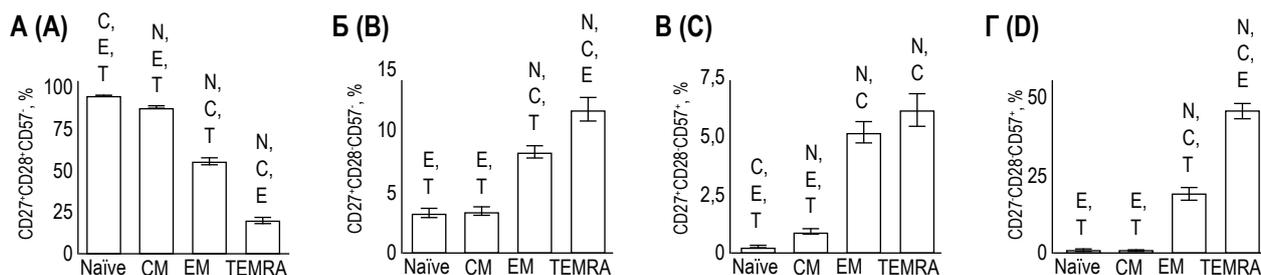


Рисунок 4. Анализ коэкспрессии CD27, CD28 и CD57 цитотоксическими Т-клетками различных субпопуляций

Примечание. Гистограммы А-Г – относительное содержание клеток с фенотипами CD27⁺CD28⁺CD57⁺, CD27⁺CD28⁻CD57⁺, CD27⁻CD28⁺CD57⁺ и CD27⁻CD28⁻CD57⁺ в рамках субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови, выявленных на основании экспрессии CD45RA и CD62L соответственно.

См. примечание к рисунку 2.

Figure 4. Coexpression of CD27, CD28 and CD57 by TcT of differentiation states

Note. Histograms A-D – frequency of naïve, central memory, effector memory and TEMRA TcT cells with CD27⁺CD28⁺CD57⁺, CD27⁺CD28⁻CD57⁺, CD27⁻CD28⁺CD57⁺ and CD27⁻CD28⁻CD57⁺ phenotypes, respectively.

See note to Figure 2.

как ВИЧ [43] или хронический вирусный гепатит С [11]. Однако даже в подобного рода исследованиях CD244 часто рассматривается в качестве рецептора, способного формировать как активирующий, так и ингибиторный сигнал [28].

KLRG1 используется в качестве маркера зрелых лимфоцитов человека и мыши достаточно длительное время, однако, несмотря на его детальную структурную и функциональную характеристику при помощи молекулярно-биологических методов, его роль *in vivo* у человека до сих пор практически не исследована [32]. В ходе собственного исследования было показано, что уровень экспрессии KLRG1 возрастал по мере дифференцировки клеток (рис. 23). Так, среди CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ данный антиген был представлен на 4,51±0,38%. Прохождение антиген-зависимой дифференцировки сопровождалось почти трехкратным увеличением относительного содержания KLRG1⁺ лимфоцитов в рамках субпопуляции клеток центральной памяти (15,83±1,38%), а среди клеток с фенотипами CD45RA⁻CD62L⁻ и CD45RA⁺CD62L⁻ KLRG1-позитивные лимфоциты составляли более половины от исследованных субпопуляций (51,22±2,29% и 54,72±2,31% соответственно). Следует отметить, что на мышинной модели было показано, что взаимодействия KLRG1 с его лигандом – E-кадгеринном – приводит к снижению функциональной активности как натуральных киллеров, так и цитотоксических Т-лимфоцитов [14]. С другой стороны, активация KLRG1 сопровождается снижением пролиферативной активности лимфоцитов [33], что может являться, по мнению авторов, одним из механизмов блокады клональной экспансии лимфоцитов.

В рамках другого исследования было высказано предположение о том, что ингибиторный сигнал от KLRG1 эффективен лишь в случае, когда антиген в ассоциации с МНС, активирующий Т-клеточный рецептор лимфоцита, и лиганды для данного рецептора представлены на одной клетке-мишени [26].

На основании коэкспрессии CD28, CD57, CD244, CD279 и KLRG1 цитотоксические Т-клетки четырех основных стадий дифференцировки были разделены на 32 субпопуляции, лишь половина из которых несли на своей поверхности CD57. Более того, только 4 субпопуляции (с фенотипами CD28⁻CD244⁺CD279⁻CD57⁺KLRG1⁻, CD28⁻CD244⁺CD279⁻CD57⁺KLRG1⁺, CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻ и CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺) из этих 16 были представлены на достаточно значимом уровне, тогда как относительное содержание остальных типов клеток находилось в пределах от нескольких тысячных до нескольких десятых процента. Присутствие CD279 на поверхности клетки свидетельствует о том, что активация, опосредованная распознаванием комплекса МНС-антиген антиген-специфическим рецептором, может не сопровождаться активацией Т-лимфоцита из-за наличия специфических лигандов для CD279 – PD-L1 и PD-L2 [19]. Более того, низкоаффинное взаимодействие Т-клеточного рецептора комплексом антиген-МНС практически полностью нивелируется эффектами от взаимодействия PD-1 со своими лигандами на поверхности антигенпрезентирующей клетки. Блокада сигнальных путей PD-1 сопровождается увеличением пролиферативной активности лимфоцитов мыши и человека в условиях *in vitro* и увеличением уровня фосфорили-

рования Акт по остатку серина в положении 473 у высокодифференцированных цитотоксических Т-клеток человека [8]. В ходе собственных экспериментов среди CD57⁺ цитотоксических Т-клеток нами были выявлены две субпопуляции (CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻ и CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺), несущие CD279 на своей поверхности. Клетки обоих указанных выше фенотипов практически полностью отсутствовали среди CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁺ лимфоцитов (0,06±0,01% и 0,16±0,05%, а также 0,15±0,03% и 0,75±0,21% соответственно). Вместе с тем дифференцировка в сторону клеток эффекторной памяти сопровождалась увеличением относительного содержания CD244⁺CD279⁺CD57⁺ до 3,12±0,57% (рис. 5А), а среди субпопуляции TEMRA они составляли уже 4,83±0,62%, хотя достоверных различий между EM и TEMRA отмечено не было (p = 0,077). Цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺ (рис. 5Б) среди данных субпопуляций составляли 7,86±1,07% и 7,67±0,96% (p = 0,891) соответственно. Наличие CD279, равно как и отсутствие достоверных различий по относительному содержанию этих клеток между субпопуляциями эффекторной памяти и TEMRA CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, позволяют рассматривать CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻ и CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺ в качестве незрелых эффекторных клеток. Для детальной характеристики этих клеток требуются дальнейшие исследования. Косвенным подтверждением тому являются результаты применения антител, блокирующих взаимодействие PD-1 с его лиганда-

ми, на опухоль-инфильтрирующих цитотоксических Т-клетках, что приводило к увеличению уровня продукции цитокинов, но не сопровождалось усилением цитолитической активности этих клеток [29].

Как показано на рисунке (рис. 5В), цитотоксические Т-клетки, экспрессирующие CD244 и CD57, практически не встречаются среди «наивных» клеток и клеток центральной памяти (0,78±0,19% и 0,15±0,06% соответственно). При переходе CD3⁺CD8⁺ в клетки эффекторной памяти относительное содержание лимфоцитов данного фенотипа несколько возрастает (2,08±0,40%). В ходе дальнейшей дифференцировки отмечено увеличение уровня CD244⁺CD57⁺ клеток почти в семь раз (p < 0,001) до 14,70±1,56%. Клетки данного фенотипа можно рассматривать в качестве зрелых эффекторов, обладающих как полным набором цитолитических факторов, о чем свидетельствует наличие на их поверхности CD57, так и отсутствием основных ингибиторных молекул, в качестве которых выступают CD279 и KLRG1, способных подавлять активирующий сигнал от Т-клеточного рецептора. Взаимодействие же CD244 со своим лигандом, в качестве которого выступает CD48, может усиливать эффекторные свойства CD3⁺CD8⁺, в том числе способность к продукции эффекторных цитокинов, высвобождению цитолитических гранул и пролиферации [20]. Отсутствие CD244 на поверхности CD3⁺CD8⁺ сопровождается уменьшением цитотоксических способностей этих клеток по сравнению с CD244⁺ лимфоцитами данной популяции [21].

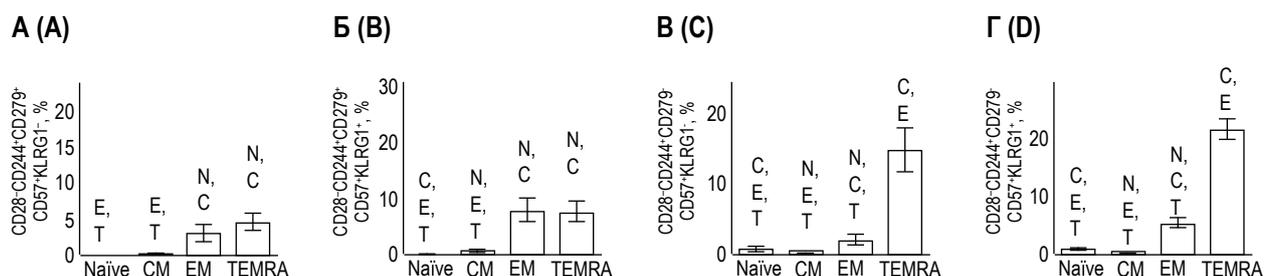


Рисунок 5. Анализ коэкспрессии регуляторных молекул CD244, CD279 и KLRG1 CD28⁻CD57⁺ цитотоксическими Т-клетками различных субпопуляций

Примечание. Гистограммы А-Г – относительное содержание клеток с фенотипами CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻, CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺, CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻ и CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺ в рамках субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови, выявленных на основании экспрессии CD45RA и CD62L соответственно.

См. примечание к рисунку 2.

Figure 5. Coexpression of CD244, CD279 and KLRG1 by CD28⁻CD57⁺ Tcyt of differentiation states

Note. Histograms A-D – frequency of naïve, central memory, effector memory and TEMRA Tcyt cells with CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻, CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺, CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻ and CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺ phenotypes, respectively. See note to Figure 2.

С другой стороны, на роль предшественников эффекторных клеток могут претендовать CD3⁺CD8⁺ лимфоциты, несущие на своей поверхности не только CD244 и CD57, но и KLRG1, при отсутствии CD28 и CD279 (рис. 5Г). Так, лимфоциты этого фенотипа практически не встречались среди «наивных» клеток и клеток центральной памяти (0,96±0,15% и 0,51±0,13% соответственно). Накопление CD244⁺KLRG1⁺CD57⁺ клеток отмечено в рамках субпопуляции с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻, где их относительное содержание достигало 5,54±0,93%, тогда как максимальное их число было показано для CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов субпопуляции TEMRA – 1,44±1,69%. Следует отметить, что наличие KLRG1 на поверхности цитотоксической Т-клетки рассматривается как маркер зрелости и, в частности, как один из признаков отсутствия пролиферативной активности [33]. С другой стороны, результаты некоторых исследований свидетельствуют об увеличении уровня экспрессии Ki-67 KLRG1-позитивными антиген-специфическими CD3⁺CD8⁺ лимфоцитами в ответ на антигенную стимуляцию [17]. Так, в случае хронического

инфицирования цитомегаловирусом и вирусом Эпштейна–Барр подавляющее большинство вирус-специфических зрелых эффекторных клеток экспрессировали данный антиген на своей поверхности, тогда как среди зрелых цитотоксических Т-лимфоцитов, способных к распознаванию вируса гриппа, данный маркер был представлен существенно реже.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют предполагать, что на роль зрелых эффекторных цитотоксических Т-клеток периферической крови могут претендовать CD45RA⁺CD62L⁻ лимфоциты, позитивные по CD244 и CD57, но не экспрессирующие ко-стимуляционные молекулы CD27 и CD28, а также не несущие на своей поверхности ингибиторных рецепторов CD279 и KLRG1. Многоцветная проточная цитометрия позволяет детально исследовать фенотип эффекторных клеток, но роль большинства ингибиторных молекул CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов человека остается слабо исследованной в связи с отсутствием адекватных модельных систем для оценки функциональных свойств антиген-специфических эффекторных клеток как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*.

Список литературы / References

1. 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. Memory 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.)].
2. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Волков А.Е., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки // Тихоокеанский медицинский журнал, 2015. № 2. С. 47-52. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Volkov A.E., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Polevshchikov A.V. CD56 and CD57 expression by distinct populations of human cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2015, no. 2, pp. 30-35. (In Russ.)].
3. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии. Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 525-538. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T cell subsets. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 525-538. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2015-6-525-538.
4. Кудрявцев И.В., Елезов Д.С. Анализ основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови на основании уровня экспрессии CD27, CD28, CD45R0 и CD62L // Российский иммунологический журнал, 2013. Т. 7 (16), № 2-3 (1). С. 57-61. [Kudryavtsev I.V., Elezov D.S. Analysis of the main populations of cytotoxic T lymphocytes of peripheral blood on the basis level or the expression of CD27, CD28, CD45R0 and CD62L. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (16), no. 2-3 (1), pp. 57-61. (In Russ.)].
5. Кудрявцев И.В., Савицкий В.П. Многоцветный анализ основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии // Российский иммунологический журнал, 2012. Т. 6, №3 (1) (14). С. 94-97. [Kudryavtsev I.V., Savitskiy V.P. Multicolor flow cytometric analysis of the main subpopulations of T-helpers and cytotoxic T-cells from peripheral blood. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2012, Vol. 6, no. 3 (1) (14), pp. 94-99. (In Russ.)].
6. Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Шуплетова В.В., Литвинова Л.С. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти // Цитология, 2015. Т. 57, № 5. С. 311-318. [Sokhonevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Phenotypic characterization and functional features of memory T- and B-cells. *Tsitologiya = Cytology*, 2015, Vol. 57, no. 5, pp. 311-318. (In Russ.)].

7. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (Проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology "Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers" (Draft). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)]. doi:10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.
8. Akbar A.N., Henson S.M. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 4, pp. 289-295.
9. Appay V., van Lier R.A., Sallusto F., Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*, 2008, Vol. 73, no. 11, pp. 975-983.
10. Barry M., Bleackley R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 2, no. 6, pp. 401-409.
11. Bengsch B., Seigel B., Ruhl M., Timm J., Kuntz M., Blum H.E., Pircher H., Thimme R. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8⁺ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog.*, 2010, Vol. 6, no. 6, e1000947. doi: 10.1371/journal.ppat.1000947.
12. Chattopadhyay P.K., Betts M.R., Price D.A., Gostick E., Horton H., Roederer M., De Rosa S.C. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, Vol. 85, no. 1, pp. 88-97.
13. Chlewicki L.K., Velikovskiy C.A., Balakrishnan V., Mariuzza R.A., Kumar V. Molecular basis of the dual functions of 2B4 (CD244). *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 12, pp. 8159-8167.
14. Colonna M. Cytolytic responses: cadherins put out the fire. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, no. 2, pp. 261-264.
15. Duraiswamy J., Ibegbu C.C., Masopust D., Miller J.D., Araki K., Doho G.H., Tata P., Gupta S., Zilliox M.J., Nakaya H.I., Pulendran B., Haining W.N., Freeman G.J., Ahmed R. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 7, pp. 4200-4212.
16. Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M.F., Almeida J.R., Gostick E., Yu Z., Carpenito C., Wang E., Douek D.C., Price D.A., June C.H., Marincola F.M., Roederer M., Restifo N.P. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, pp. 1290-1297.
17. Ibegbu C.C., Xu Y.X., Harris W., Maggio D., Miller J.D., Kourtis A.P. Expression of killer cell lectin-like receptor G1 on antigen-specific human CD8⁺ T lymphocytes during active, latent, and resolved infection and its relation with CD57. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 10, pp. 6088-6094.
18. Kaech S.M., Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 11, pp. 749-761.
19. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Ann. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 26, pp. 677-704.
20. Kim J.S., Cho B.A., Sim J.H., Shah K., Woo C.M., Lee E.B., Lee D.S., Kang J.S., Lee W.J., Park C.G., Craft J., Kang I., Kim H.R. IL-7R α low memory CD8⁺ T cells are significantly elevated in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, Vol. 51, no. 9, pp. 1587-1594.
21. Kis-Toth K., Comte D., Karampetsou M.P., Kyttaris V.C., Kannan L., Terhorst C., Tsokos G.C. Selective loss of signaling lymphocytic activation molecule family member 4-positive CD8⁺ T cells contributes to the decreased cytotoxic cell activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.*, 2016, Vol. 68, no. 1, pp. 164-173.
22. Kuchroo V.K., Anderson A.C., Petrovas C. Coinhibitory receptors and CD8 T cell exhaustion in chronic infections. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 2014, Vol. 9, no. 5, pp. 439-445.
23. 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.
24. Perfetto S.P., Chattopadhyay P.K., Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, no. 8, pp. 648-655.
25. Petrovas C., Chaon B., Ambrozak D.R., Price D.A., Melenhorst J.J., Hill B.J., Geldmacher C., Casazza J.P., Chattopadhyay P.K., Roederer M., Douek D.C., Mueller Y.M., Jacobson J.M., Kulkarni V., Felber B.K., Pavlakis G.N., Katsikis P.D., Koup R.A. Differential association of programmed death-1 and CD57 with ex vivo survival of CD8⁺ T cells in HIV infection. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 2, pp. 1120-1132.
26. Rosshart S., Hofmann M., Schweier O., Pfaff A.K., Yoshimoto K., Takeuchi T., Molnar E., Schamel W.W., Pircher H. Interaction of KLRG1 with E-cadherin: new functional and structural insights. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, no. 12, pp. 3354-3364.
27. Sallusto F., Lenig D., Forster R., Lipp M., Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, Vol. 401, no. 6754, pp. 708-712.
28. Schlaphoff V., Lunemann S., Suneetha P.V., Jaroszewicz J., Grabowski J., Dietz J., Helfritz F., Bektas H., Sarrazin C., Manns M.P., Cornberg M., Wedemeyer H. Dual function of the NK cell receptor 2B4 (CD244) in the regulation of HCV-specific CD8⁺ T cells. *PLoS Pathog.*, 2011, Vol. 7, no. 5, e1002045. doi: 10.1371/journal.ppat.1002045.
29. Schreiner J., Thommen D.S., Herzig P., Bacac M., Klein C., Roller A., Belousov A., Levitsky V., Savic S., Moersig W., Uhlenbrock F., Heinzelmann-Schwarz V.A., Umana P., Pisa P., Lardinois D., Müller P., Karanikas V., Zippelius A. Expression of inhibitory receptors on intratumoral T cells modulates the activity

of a T cell-bispecific antibody targeting folate receptor. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 5, no. 2, e1062969. doi: 10.1080/2162402X.2015.1062969.

30. Sperling A.I., Auger J.A., Ehst B.D., Rulifson I.C., Thompson C.B., Bluestone J.A. CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. *J. Immunol.*, 1996, Vol. 157, no. 9, pp. 3909-3917.

31. Takata H., Takiguchi M. Three memory subsets of human CD8⁺ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 7, pp. 4330-4340.

32. van Aalderen M.C., Remmerswaal E.B., Verstegen N.J., Hombrink P., ten Brinke A., Pircher H., Kootstra N.A., ten Berge I.J., van Lier R.A. Infection history determines the differentiation state of human CD8⁺ T cells. *J. Virol.*, 2015, Vol. 89, no. 9, pp. 5110-5123.

33. Voehringer D., Koschella M., Pircher H. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). *Blood*, 2002, Vol. 100, no. 10, pp. 3698-3702.

34. Yamamoto T., Price D.A., Casazza J.P., Ferrari G., Nason M., Chattopadhyay P.K., Roederer M., Gostick E., Katsikis P.D., Douek D.C., Haubrich R., Petrovas C., Koup R.A. Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8⁺ T-cell exhaustion in HIV infection. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 18, pp. 4805-4815.

35. Yamanaka Y.J., Gierahn T.M., Love J.C. The dynamic lives of T cells: new approaches and themes. *Trends Immunol.*, 2013, Vol. 34, no. 2, pp. 59-66.

36. Zhang J.Y., Zhang Z., Wang X., Fu J.L., Yao J., Jiao Y., Chen L., Zhang H., Wei J., Jin L., Shi M., Gao G.F., Wu H., Wang F.S. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8⁺ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood*, 2007, Vol. 109, no. 11, pp. 4671-4678.

Авторы:

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

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 имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Васильева Е.В. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Кробинец И.И. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изосерологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

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

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

Vasilyeva E.V., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Biopreparations, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Krobinets I.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Iso-serology, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

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 имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Серебрякова М.К. — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБНУ «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

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

Serebriakova M.K., Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, St. Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 27.07.2017
Принята к печати 22.09.2017

Received 27.07.2017
Accepted 22.09.2017

ОЦЕНКА УРОВНЯ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ЧУМЫ ЛИЦ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИКАСПИЙСКОГО ПЕСЧАНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА

Клюева С.Н.¹, Бугоркова С.А.¹, Щуковская Т.Н.¹, Санджиев Д.Н.²,
Конушева С.В.², Савченко С.П.², Хасыкова Б.А.², Щербакова С.А.¹

¹ ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“», г. Саратов, Россия

² Управление Роспотребнадзора по Республике Калмыкия, г. Элиста, Россия

Резюме. На фоне возрастания потенциальной эпидемической опасности территорий ряда природных очагов чумы и проведения мероприятий по обеспечению специфической профилактики этой инфекции возникает необходимость тщательного мониторинга состояния иммунитета у вакцинированных (ревакцинированных) лиц. Цель исследования – оценить уровень гуморального и клеточного иммунитета после неоднократной противочумной ревакцинации. Оценку показателей иммунного ответа на ревакцинацию против чумы проводили по результатам клинического исследования образцов крови от 20 человек в возрасте от 24 до 53 лет, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы. Определяли титры специфических антител к F1 чумного микроба (тест-система «ИФА-АТ-Ф1 YERSINIA PESTIS», ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия), а также спонтанную и индуцированную конканавалином А продукцию цитокинов IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10 (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), IL-17A (Bender Medsystems, Австрия). Исследования проводили до ревакцинации и через 1, 6, 12 месяцев после ее проведения.

Полученные результаты указывают на то, что после ревакцинации живой чумной вакциной в большинстве случаев иммунологическая перестройка происходила по смешанному Th1/Th2-типу. Обнаружение антител к F1 чумного микроба до и через 1 месяц после ревакцинации (65 и 85% соответственно) свидетельствовало о формировании гуморального иммунного ответа. Выявлены наиболее информативные цитокины-маркеры (IFN γ и TNF α) для оценки противочумного клеточного иммунитета. Установленное до ревакцинации трехкратное повышение индуцированной продукции IFN γ свидетельствовало об исходной иммунологической компетентности всех обследованных лиц. Определена высокая степень корреляционных связей TNF α с остальными учитываемыми цитокинами. Факт обнаружения высокой силы корреляционной связи для изученных цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-10) указывал на синхронность реакции иммунокомпетентных клеток (Т-хелперов). По изменению уровня спонтанной и индуцированной продукции цитокинов можно косвенно судить о степени выраженности противочумного клеточного иммунитета у людей.

Ключевые слова: гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет, цитокины, антитела, иммуноглобулины, циркулирующие иммунные комплексы

Адрес для переписки:

Клюева Светлана Николаевна
ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“»
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46.
Тел.: 8 (452) 26-21-31.
Факс: 8 (452) 51-52-12.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Address for correspondence:

Klyueva Svetlana N.
Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46.
Phone: 7 (452) 26-21-31.
Fax: 7 (452) 51-52-12.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Образец цитирования:

С.Н. Клюева, С.А. Бугоркова, Т.Н. Щуковская, Д.Н. Санджиев, С.В. Конушева, С.П. Савченко, Б.А. Хасыкова, С.А. Щербакова «Оценка уровня гуморального и клеточного иммунитета после ревакцинации против чумы лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 241-250. doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-241-250
© Клюева С.Н. и соавт., 2018

For citation:

S.N. Klyueva, S.A. Bugorkova, T.N. Shchukovskaya, D.N. Sandzhiev, S.V. Konusheva, S.P. Savchenko, B.A. Khasykova, S.A. Shcherbakova “Evaluation of humoral and cellular immunity level among persons living in the Caspian natural sandy focus territory after anti-plague revaccination”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 241-250. doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-241-250
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-241-250

EVALUATION OF HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY LEVEL AMONG PERSONS LIVING IN THE CASPIAN NATURAL SANDY FOCUS TERRITORY AFTER ANTI-PLAGUE REVACCINATION

Klyueva S.N.^a, Bugorkova S.A.^a, Shchukovskaya T.N.^a, Sandzhiev D.N.^b, Konusheva S.V.^b, Savchenko S.P.^b, Khasyikova B.A.^b, Shcherbakova S.A.^a

^a Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

^b Rospotrebnadzor Administration for the Republic of Kalmykia, Elista, Russian Federation

Abstract. In view of increasing epidemic danger potential of some natural plague foci and performing measures to provide specific prevention of this infection, it becomes necessary to carefully monitor the state of immunity in vaccinated (revaccinated) individuals. The aim of the study was to assess humoral and cellular immunity levels in the persons after repeated anti-plague revaccination performed for appropriate epidemiological indications. Evaluation of immune responses to anti-plague revaccination was carried out according to studies of blood samples from 20 people aged 24 to 53 years living in the Caspian sandy natural plague focus located at the territory in Kalmykia Republic. Specific antibody titers to the F1 antigen of plague microbe were assessed in blood serum by immunoassay testing using an "ELISA-AT-F1 YERSINIA PESTIS" test system (Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Russia), along with spontaneous and concanavalin A-induced production of different cytokines, i.e., IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10 (Vector-Best, Russia), IL-17A (Bender Medsystems, Austria). The studies were performed before vaccination, and 1, 6, 12 month after the booster vaccination.

The results of the study indicate that immunological reconstitution after revaccination with live plague vaccine occurs mostly according to mixed Th1/Th2 type. Detection of antibodies to the F1 specific plague microbe antigen before and 1 month after revaccination (65 and 85%, respectively) was indicative of development of humoral response. The most informative cytokine markers (IFN γ and TNF α) for evaluation of an anti-plague cellular immune response have been identified. The threefold increase in IFN γ induced production before revaccination indicates to initial immunological competence of all the examined individuals. A high correlation between TNF α and other cytokine levels was determined. The fact of high correlation for the studied cytokines (TNF α , IFN γ , IL-10) indicated to a synchronism in the immunocompetent T helper cell reaction. By measuring the levels of spontaneous and induced cytokine production levels, one may indirectly judge on degree of anti-plague cell immunity in humans.

Keywords: humoral immunity, cellular immunity, cytokines, antibodies, immunoglobulins, circulating immune complexes

Введение

Центральная приморская часть Прикаспийского песчаного очага чумы на протяжении длительного периода времени остается одним из наиболее устойчивых участков чумной энзоотии. Активизация эпизоотий чумы произошла в 2013-2015 гг. на территории Астраханской области, Республики Дагестан, Лаганского и Черноземельского районов Республики Калмыкия. На эпизоотической территории очага проживает около 20 тыс. человек, что свидетельствует о высоком уровне риска заболевания людей чумой. На фоне возрастания потенциальной эпидемиче-

ской опасности территорий ряда природных очагов чумы [1] и проведения мероприятий по обеспечению специфической профилактики этой инфекции возникает необходимость тщательного мониторинга состояния иммунитета у вакцинированных (ревакцинированных) лиц. Ежегодная ревакцинация по эпидемическим показаниям обуславливает высокий уровень антигенной нагрузки на организм, что может приводить к различным осложнениям.

Формирование иммунологической перестройки после вакцинации против чумы у людей протекает с образованием антител, специфичных к капсульному антигену F1 чумного

микроба [11], но учитывая, что в формировании противочумного иммунитета ведущая роль принадлежит клеточным факторам защиты [5, 9], оценка эффективности вакцинации на основании характеристики только уровня специфических антител к F1 чумного микроба носит косвенный характер [2, 15].

Эффективность иммунного ответа на антигены вакцин и способность иммунной системы формировать длительную иммунную память, находятся в зависимости от обмена сигналами между клетками иммунной системы, осуществляемого с помощью низкомолекулярных белков — цитокинов. Поэтому не менее важным показателем формирования протективного иммунитета является оценка Т-клеточного звена по спонтанной и индуцированной продукции иммунорегуляторных цитокинов [13]. Ключевыми цитокинами-маркерами, определяющими тип Т-хелперов, участвующих в формировании противочумного клеточного иммунитета, являются Th1-цитокينات ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$), Th2 (IL-4), IL-17, продуцируемый Т-хелперами 17 типа (Th17) [3, 12].

Цель исследования — оценить уровень гуморального и клеточного иммунитета после неоднократной ревакцинации против чумы по эпидемическим показаниям лиц, проживающих на энзоотичной по чуме территории.

Материалы и методы

В период с марта 2016 г. по март 2017 г. на территории Лаганского и Черноземельского районов Республики Калмыкия было проведено клиническое исследование 20 человек в возрасте от 24 до 53 лет по оценке ряда показателей иммунного ответа на ревакцинацию против чумы. Право на проведение обследования юридически закреплялось информированным письменным согласием каждого обследуемого.

Ревакцинацию проводили отечественной коммерческой живой чумной вакциной (ЖЧВ) производства ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора в соответствии с Календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям (Приказ от 21 марта 2014 г. № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям»).

Кровь для исследования забирали из локтевой вены в объеме 9 мл до ревакцинации и через 1, 6,

12 месяцев после ее проведения. В работе были использованы пробирки, содержащие K_3EDTA и активатор свертывания.

Сыворотку получали из венозной крови, инкубированной в пробирках с Clot Activator “VACUTEST” при 37 °С в течение 1 ч. После центрифугирования при 400 g сыворотку крови отбирали в отдельные микропробирки, замораживали и хранили до использования при -20 °С.

Антитела к F1 *Yersinia pestis* определяли в сыворотках крови непрямой вариант ИФА с помощью иммуноферментной тест-системы «ИФА-АТ-Ф1 YERSINIA PESTIS» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия) в соответствии с инструкцией по применению.

Для определения продукции цитокинов венозную кровь с K_3EDTA разводили в соотношении 1:4 средой RPMI 1640, содержащей 100 мкг/мл гентамицина. В качестве индуктора продукции цитокинов использовали стандартный Т-клеточный митоген конканавалин А (ПанЭко, Россия) в концентрации 15 мкг/мл. Контролем служили клетки крови, культивируемые только в среде RPMI-1640. Опытные и контрольные образцы инкубировали в течение 24 часов при температуре 37 °С. Затем клеточную суспензию осаждали центрифугированием при 400 g в течение 15 мин, полученные образцы замораживали и хранили до использования при -20 °С.

Спонтанную и индуцированную конканавалином А продукцию цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) с помощью коммерческих наборов для определения $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-4, IL-10 (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), IL-17A (Bender Medsystems, Австрия). Учет результатов выполняли с использованием программы расчета концентраций по многоточечной калибровке на микропланшетном фотометре Stat Fax-3200 (Awareness Technology, США) при длине волны 450 нм.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2010. Взаимосвязь между переменными определяли с помощью рангового корреляционного анализа по Спирмену. Корреляционные связи считали сильными (тесными) при коэффициенте корреляции $r = 0,7-1,0$, умеренной (средней) силы — при $r = 0,3-0,7$, слабыми — при $r = 0-0,3$, r с положительным знаком — прямая связь, r с отрицательным — обратная. Достоверность уровня различия сравниваемых величин оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Полученные

данные представляли в виде $M \pm m$, где M – среднее значение анализируемого показателя, m – средняя квадратическая ошибка средней арифметической. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Иммуноферментный анализ сывороток обследованных лиц показал, что средние значения обратных титров антител к F1 чумного микроба после ревакцинации достоверно не отличались от данного показателя до ревакцинации (табл. 1). Во все сроки исследования были выявлены серопозитивные лица, у которых зарегистрированы титры специфических антител выше диагностического титра (1:80). Количество серопозитивных лиц среди обследованных составило 65% до ревакцинации и 85% через 1 месяц после ревакцинации. Доля лиц, у которых было зарегистрировано 4-кратное по сравнению с исходным уровнем повышение титра специфических антител к F1 (сероконверсия) после ревакцинации, составила 20%. В этом случае титры антител после ревакцинации соответствовали 1:320-1:1280 против 1:40 до ревакцинации.

Оценку клеточного звена иммунитета проводили по изменению показателей иммунорегуляторных цитокинов. Если результаты исследования спонтанной продукции цитокинов *ex vivo* позволяют оценить активацию клеток крови в организме обследуемого пациента, то индуцированная неспецифическим Т-клеточным митогеном конканавалином А продукция отражает их потенциальную способность к секреции цитоки-

нов и характеризует иммунологическую реактивность организма.

Установлена неравнозначная интенсивность продукции Th1-, Th2-, Th17-цитокинов (табл. 2). Стандартный митоген конканавалин А активно стимулировал выработку цитокинов клетками периферической крови до и в различные сроки после ревакцинации, что свидетельствует о высоких резервных возможностях клеток.

Митогенная стимуляция вызывала статистически достоверное повышение индуцированной продукции $IFN\gamma$ до ревакцинации и через 1 год после ревакцинации, $IL-17$ – до ревакцинации, через 1 месяц и 1 год после ревакцинации, $IL-10$ – через 6 месяцев и 1 год после ревакцинации, $TNF\alpha$ – через 1 год после ревакцинации относительно аналогичных показателей при спонтанной продукции (табл. 2).

Анализ спонтанной продукции цитокинов показал, что через 1 и 6 месяцев статистически достоверно увеличивается уровень $IL-4$ относительно аналогичного показателя до ревакцинации. Через 6 месяцев снижаются концентрации $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-10$ относительно аналогичных показателей до ревакцинации. Через год уровни спонтанной продукции данных цитокинов у всех обследованных соответствовали норме.

Анализ индуцированной продукции цитокинов показал, что через 1 месяц снижается уровень $IL-17$, через 6 месяцев – снижаются концентрации $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-10$, $IL-17$ и повышается концентрация $IL-4$ относительно аналогичных показателей до ревакцинации. Через 1 год уровни индуцированной продукции данных цитокинов, оставаясь на высоком уровне, в основном не пре-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ТИТРОВ АНТИТЕЛ К КАПСУЛЬНОМУ АНТИГЕНУ ЧУМНОГО МИКРОБА (F1) У РЕВАКЦИНИРОВАННЫХ ЛИЦ

TABLE 1. ANTIBODY TITERS TO THE CAPSULAR ANTIGEN *YERSINIA PESTIS* (F1) IN REVACCINATED PERSONS

Срок проведения анализа Time of analysis	Обратные титры антител к F1 антигену Reverse antibody titers to F1 antigen $M \pm m$
До ревакцинации Before revaccination	1198 \pm 228,0
Через 1 месяц после ревакцинации 1 month after the revaccination	1398 \pm 255,93
Через 6 месяцев после ревакцинации 6 months after revaccination	737 \pm 109,62
Через 12 месяцев после ревакцинации 12 months after revaccination	1282 \pm 285,68
Норма (согласно инструкции к тест-набору) Normal titers (according to the instructions for the test kit)	$\leq 1/80$ (у не вакцинированных) $\geq 1/80$ (у вакцинированных) $\leq 1/80$ (in non-vaccinated) $\geq 1/80$ (in vaccinated)

ТАБЛИЦА 2. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ EX VIVO КЛЕТКАМИ КРОВИ РЕВАКЦИНИРОВАННЫХ ЛИЦ
TABLE 2. PRODUCTION OF CYTOKINES BY EX VIVO TAKEN BLOOD CELLS FROM REVACCINATED PERSONS

Цитокин Cytokine	Спонтанная продукция (M±m), пг/мл Spontaneous production (M±m), pg/ml				Митоген-индуцированная продукция (M±m), пг/мл Mitogen-induced production (M±m), pg/ml			
	1	2	3	4	1	2	3	4
IFN γ	189,48±23,52	265,41±48,53	5,83±0,96*	2,75±0,89*	645,39±63,27**	339,22±43,82	6,33±1,09*	299,13±60,93***
TNF α	176,76±17,76	177,13±22,65	5,55±1,36*	40,42±11,34*	294,31±11,55	187,78±26,57	6,08±0,74*	153,2±23,53***
IL-17A	6,65±2,56	4,29±2,77	3,34±0,89	4,92±0,84	230,02±39,88**	27,8 ±4,56***	3,85±1,55*	189,6±26,13*
IL-4	2,77±0,51	8,35±1,68*	90,83±13,41*	1,79±0,49	4,79±0,89	9,28±1,69	89,9±9,96*	2,81±0,45
IL-10	108,93±11,04	199,08±36,8	3,84±1,33*	12,56±1,92*	252,99±26,95	216,81±39,86	11,95±4,6***	33,45±3,55***
IFN γ /IL-4	103,57±20,09	67,1±15,3	0,06±0,004*	3,36±1,34	236,0±51,8	108,25±42,07	0,07±0,005*	131,23±29,08
TNF α /IL-10	1,72±0,16	1,14±0,09*	4,94±0,9*	3,1±0,48	2,33±0,08	1,01±0,06*	4,92±0,88*	4,73±0,66
IFN γ + TNF α / IL-4 + IL-10	3,61±0,31	3,29±0,48	0,1±0,006*	2,94±0,44	7,43±1,68	3,31±0,51	0,13±0,012*	12,57±2,14

Примечание. * – достоверность по сравнению с аналогичным показателем до ревакцинации; ** – достоверность по сравнению с аналогичным показателем при спонтанной продукции; 1 – до ревакцинации; 2 – через 1 месяц после ревакцинации; 3 – через 6 месяцев после ревакцинации; 4 – через 1 год после ревакцинации.

Note. *, reliability in comparison with the same index before revaccination; ** – reliability in comparison with the same indicator for spontaneous production; 1, before revaccination; 2, 1 month after the revaccination; 3, 6 months after the revaccination; 4, 1 year after revaccination.

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ МАТРИЦА, ОТРАЖАЮЩАЯ СИЛУ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПРОЦЕССАМИ ИЗМЕНЕНИЯ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ДО И ЧЕРЕЗ 1 МЕСЯЦ ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ

TABLE 3. CORRELATION MATRIX, REFLECTING THE BETWEEN THE PROCESSES OF CHANGING SPONTANEOUS AND INDUCED PRODUCTS OF CYTOKINES BEFORE AND FIX THROUGH 1 MONTH AFTER REVACCINATION

Цитокин Cytokine	IFN γ (до) (before)	IFN γ (1 месяц) (1 month)	TNF α (до) (before)	TNF α (1 месяц) (1 month)	IL-4 (до) (before)	IL-4 (1 месяц) (1 month)	IL-10 (до) (before)	IL-10 (1 месяц) (1 month)	IL-17 (до) (before)	IL-17 (1 месяц) (1 month)
IFN γ (до) / IFN γ (before)	1,000	–	0,038	–	-0,122	–	0,103	–	0,332	–
IFN γ (1 месяц) / IFN γ (1 month)	–	1,000	–	-0,452*	–	–	-0,312	–	–	-0,359
TNF α (до) / TNF α (before)	0,597*	–	1,000	–	-0,217	–	0,522*	–	0,025	–
TNF α (1 месяц) / TNF α (1 month)	–	0,334	–	1,000	–	–	0,848*	–	–	0,610*
IL-4 (до) / IL-4 (before)	-0,166	–	0,440	–	1,000	–	0,254	–	0,462*	–
IL-4 (1 месяц) / IL-4 (1 month)	–	-0,083	–	-0,736*	–	–	–	-0,608*	–	-0,433
IL-10 (до) / IL-10 (before)	0,008	–	-0,019	–	0,147	–	1,000	–	0,406	–
IL-10 (1 месяц) / IL-10 (1 month)	–	0,331	–	0,865*	–	–	–	1,000	–	0,523*
IL-17 (до) / IL-17 (before)	0,605*	–	0,749*	–	0,147	–	0,008	–	1,000	–
IL-17 (1 месяц) / IL-17 (1 month)	–	0,162	–	0,810*	–	–	–	0,750*	–	1,000

Примечание. * – зависимость признаков статистически достоверна (p < 0,05); обычным шрифтом отмечены значения коэффициента корреляции Спирмена (r) при спонтанной продукции цитокинов; жирным шрифтом отмечены значения r при индуцированной продукции цитокинов.

Note. *, dependence of signs is statistically significant (p < 0.05); in normal type, the values of the Spearman correlation coefficient (r) for spontaneous production of cytokines are noted; the values of r in induced production of cytokines are indicated in bold type.

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ МАТРИЦА, ОТРАЖАЮЩАЯ СИЛУ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПРОЦЕССАМИ ИЗМЕНЕНИЯ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ЧЕРЕЗ 6 И 12 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ

TABLE 4. CORRELATION MATRIX, REFLECTING CORRELATIONS BETWEEN THE PROCESSES OF CHANGING THE SPONTANEOUS AND INDUCED CYTOKINE PRODUCTION OVER 6 AND 12 MONTHS AFTER REVACCINATION

Цитокин Cytokine	IFN γ (до) (before)	IFN γ (1 месяц) (1 month)	TNF α (до) (before)	TNF α (1 месяц) (1 month)	IL-4 (до) (before)	IL-4 (1 месяц) (1 month)	IL-10 (до) (before)	IL-10 (1 месяц) (1 month)	IL-17 (до) (before)	IL-17 (1 месяц) (1 month)
IFN γ (до) / IFN γ (before)	1,000	–	0,506*	–	0,528*	–	0,621*	–	-0,002	–
IFN γ (1 месяц) / IFN γ (1 month)	–	1,000	–	0,207	–	0,353	–	-0,151	–	0,046
TNF α (до) / TNF α (before)	0,344	–	1,000	–	0,602*	–	0,456*	–	-0,305	–
TNF α (1 месяц) / TNF α (1 month)	–	0,904*	–	1,000	–	0,155	–	0,573	–	-0,046
IL-4 (до) / IL-4 (before)	0,439	–	0,711*	–	1,000	–	0,239	–	-0,123	–
IL-4 (1 месяц) / IL-4 (1 month)	–	0,409	–	0,523*	–	1,000	–	0,203	–	0,221
IL-10 (до) / IL-10 (before)	0,465*	–	0,067	–	0,315	–	1,000	–	0,017	–
IL-10 (1 месяц) / IL-10 (1 month)	–	0,444	–	0,538*	–	0,227	–	1,000	–	0,133
IL-17 (до) / IL-17 (before)	-0,183	–	-0,018	–	0,266	–	0,024	–	1,000	–
IL-17 (1 месяц) / IL-17 (1 month)	–	0,666*	–	0,716*	–	0,228	–	0,668*	–	1,000

Примечание. * – зависимость признаков статистически достоверна ($p < 0,05$); обычным шрифтом отмечены значения коэффициента корреляции Спирмена (r) при спонтанной продукции цитокинов; жирным шрифтом отмечены значения r при индуцированной продукции цитокинов.

Note. * dependence of signs is statistically significant ($p < 0,05$); in normal font, we noted the values of Spearman correlation coefficient (r) for spontaneous production of cytokines; the r values for induced production of cytokines are indicated in bold type.

вышали максимальных показателей референсных значений.

По изменению соотношения цитокинов-маркеров можно оценить, в какую сторону идет дифференцировка Т-клеток. Для характеристики сдвигов баланса Th1/Th2 использовали соотношения концентраций IFN γ /IL-4, TNF α /IL-10, IFN γ + TNF α /IL-4 + IL-10.

Анализ соотношения концентраций IFN γ + TNF α /IL-4 + IL-10 показал, что до ревакцинации и через 1 месяц после ревакцинации дифференцировка хелперов происходит в сторону Th1-ответа с преимуществом синтеза IFN γ и TNF α , но через 6 месяцев зарегистрировано его снижение в 36 раз ($p < 0,05$), что свидетельствует о переключении Th1-иммунного ответа на Th2. Через 1 год после ревакцинации происходило обратное смещение дифференцировки Т-хелперов в сторону Th1-ответа.

Далее была проведена оценка взаимосвязей между различными цитокинами. До ревакцинации (табл. 3) выявлена тесная положительная корреляционная связь между индуцированной продукцией TNF α и IL-17 ($p < 0,05$). Спустя 1 месяц после ревакцинации (табл. 3) сильная положительная корреляция обнаружена при спонтанной продукции TNF α и IL-10 ($p < 0,001$). При митогенной стимуляции выявлены тесные положительные корреляционные связи между TNF α и IL-10, TNF α и IL-17, IL-10 и IL-17 ($p < 0,001$), отрицательные сильные корреляционные связи между TNF α и IL-4, IL-4 и IL-10, IL-4 и IL-17 ($p < 0,001$). Через 6 месяцев (табл. 4) после ревакцинации тесная положительная корреляционная связь установлена между индуцированной продукцией TNF α и IL-4 ($p < 0,001$), а через 1 год (табл. 4) – между индуцированной продукцией TNF α и IFN γ , TNF α и IL-17 ($p < 0,001$).

Наиболее высокую степень тесноты связей с остальными цитокинами во все сроки исследования продемонстрировал TNF α .

При сопоставлении показателей клеточного и гуморального иммунитета до ревакцинации наблюдали отрицательную корреляцию умеренной силы между отношением концентраций TNF α /IL-10 при спонтанной продукции и показателями титров специфических антител к F1 антигену чумного микроба ($r = -0,539$, $p < 0,05$). Через 1 месяц после ревакцинации отмечали положительную

корреляцию умеренной силы между отношением концентраций $IFN\gamma/IL-4$ при спонтанной продукции и показателями титров специфических антител к F1 ($r = 0,450$, $p < 0,05$).

Обсуждение

Индукция специфических антител считается основным показателем формирования протективного иммунитета для большинства вакцин [10]. Косвенную оценку эффективности вакцинации проводят путем определения поствакцинальных титров специфических антител к антигенам чумного микроба (F1 и V) [14].

Выявление 65% серопозитивных лиц до ревакцинации, вероятно, является следствием предыдущей вакцинации. Последующая ревакцинация привела к усилению образования титров специфических антител в сыворотке крови (85% серопозитивных лиц), что подтверждает данные других исследователей о детекции у вакцинированных против чумы людей антител к F1 в период от 6 до 12 месяцев после вакцинации [2]. Доля ревакцинированных лиц, у которых зарегистрирована сероконверсия, составила 20%, что согласуется с данными, представленными ранее в литературе об отсутствии 100% сероконверсии у вакцинированных ЖЧВ, а процент положительной сероконверсии варьирует в пределах 35-80% [8].

Серологическая оценка иммунологической эффективности не отражает в полной мере истинный уровень иммунобиологической перестройки в организме вакцинированного против чумы, а ее результаты не коррелируют с функциональной активностью клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Установленный факт корреляции между уровнем антител к F1 и V антигенам чумного микроба у мышей и протективностью противочумного иммунитета, обусловленный участием специфических антител в активации иммунного ответа по Th1-типу, не имеет подтверждения у людей.

Установлено, что в формировании противочумного иммунитета ведущая роль принадлежит клеточным факторам [5, 9], а наличие специфических антител не всегда коррелирует с защитой организма от чумной инфекции [13]. Важным показателем формирования протективного иммунитета является оценка Т-клеточного звена по продукции иммунорегуляторных цитокинов. Продукентами цитокинов являются лимфоциты, макрофаги, гранулоциты, ретикулярные фибро-

бласты, эндотелиальные клетки и другие типы клеток.

В результате презентации антигенов дендритной клеткой «наивным» Т-лимфоцитам в региональных лимфоузлах образуются различные субпопуляции антиген-специфичных Т-лимфоцитов, такие как Th1, Th2, Th17, Treg (регуляторные Т-клетки) и Tfh (фолликулярные хелперные Т-клетки). Дифференцировка Т-лимфоцитов на клетки Th1- и Th2-типов проявляется, в частности, в виде специализации этих клеток относительно выработки определенного набора цитокинов. Система цитокинов действует по принципу сетей, поэтому необходимо одновременно определять несколько ключевых цитокинов, позволяющих охватить изучаемый процесс с разных сторон [4].

Показана ключевая роль двух провоспалительных медиаторов $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ в развитии противочумного иммунного ответа. Активация митоген-индуцированной продукции цитокина $IFN\gamma$ до ревакцинации доказывает то, что исходно исследуемые лица были иммунологически компетентны. Известно, что $IFN\gamma$ играет важную роль в осуществлении врожденного и приобретенного иммунитета против вирусных и внутриклеточных бактериальных инфекций, а также обладает иммуностимулирующим и иммуномодулирующим действием. $IFN\gamma$ регулирует дифференцировку и функции многих типов иммунных клеток и тесно вовлечен в процесс, связанный с формированием Th1-опосредованного иммунного ответа путем регулирования дифференциации, активации и гомеостаза Т-клеток. $IFN\gamma$ ингибирует развитие Th2-пути, но способствует формированию регуляторных Т-клеток.

По изменению соотношения цитокинов-маркеров, таких как $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ (Th1-иммунный ответ) и $IL-4$, $IL-10$ (Th2-иммунный ответ), можно оценить, в какую сторону идет дифференцировка Т-клеток. Проведенный анализ свидетельствует о преобладании Th1-иммунного ответа до ревакцинации, а также через 1 месяц и 1 год после ревакцинации и Th2-иммунного ответа – через 6 месяцев после ревакцинации.

Анализ корреляционных взаимосвязей позволил нам оценить направленность и синхронность изменения уровня цитокинов в ответ на ревакцинацию ЖЧВ. Установлена особая роль $TNF\alpha$, выполняющего функцию не только эффекторного медиатора цитотоксичности, но и принимающего участие в регуляции различных физиологических и патологических процессов в организме.

Отрицательная корреляция средней силы, выявленная между отношением концентраций TNF α /IL-10 при спонтанной продукции и показателями титров антител к F1, свидетельствует о разнонаправленных процессах формирования гуморального и клеточного звеньев иммунитета до ревакцинации. Наличие положительной корреляционной связи средней силы между отношением общего количества IFN γ и IL-4 и уровнем АТ к F1 чумного микроба подтверждает развитие Th1-иммунного ответа, обеспечивающего клеточные механизмы защиты.

Выявленная активация Th1-ассоциированных цитокинов через 1 месяц после ревакцинации, вероятно, связана с происходящими со стороны иммунной системы изменениями в ответ на введение ЖЧВ, что проявляется в достоверном повышении на фоне вакцинации уровня содержания в крови Th1-лимфоцитов. А как известно, Т-хелперный 1-го типа иммунный ответ развивается под влиянием патоген-специфических Т-клеток, которые и секретируют IFN γ , TNF α [6]. Кроме того, цитокины IFN γ и TNF α обеспечивают неспецифическую активацию про-

фессиональных фагоцитов и формирование продуктивных гранул при чуме, возникающих в результате пролиферации и трансформации способных к фагоцитозу клеток.

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что после ревакцинации живой чумной вакциной происходит активация гуморального и клеточного звеньев противочумного иммунитета и отмечается смешанный Th1/Th2-иммунный ответ. Выявлены наиболее информативные цитокины-маркеры (IFN γ и TNF α) для оценки уровня противочумного клеточного иммунного ответа. Высокие показатели коэффициентов корреляции, полученные для различных цитокинов, свидетельствуют о синхронности реакции иммунокомпетентных клеток (Т-хелперов), следовательно, по изменению уровня спонтанной и индуцированной продукции цитокинов можно косвенно судить о степени выраженности противочумного клеточного иммунитета у людей.

Список литературы / References

1. Балахонov С.В., Попова А.Ю., Мищенко А.И., Михайлов Е.П., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Щучинов Л.В., Зарубин И.В., Семенова Ж.Е., Маденова Н.М., Дюсенбаев Д.К., Ярыгина М.Б., Чипанин Е.В., Косилко С.А., Носков А.К., Корзун В.М. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты // Проблемы особо опасных инфекций, 2016. № 1. С. 55-60. [Balakhonov S.V., Popova A.Yu., Mishchenko A.I., Mikhaylov E.P., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Denisov A.V., Rozhdestvenskiy E.N., Bazarova G.Kh., Shchuchinov L.V., Zarubin I.V., Semenova Zh.E., Madenova N.M., Dyusenbaev D.K., Yarygina M.B., Chipanin E.V., Kosilko S.A., Noskov A.K., Korzun V.M. A Case of human infection with plague in the Kosh-Agach region of the republic of Altai in 2015. Communication 1. Clinical-Epidemiological and Epizootiological Aspects. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2016, no. 1, pp. 55-60. (In Russ.)]
2. Фирстова В.В., Калмантаева О.В., Горбатов А.А., Кравченко Т.Б., Тюрин Е.А., Бондаренко Н.Л., Дятлов И.А., Караулов А.В. Оценка специфического гуморального и клеточного иммунитета у людей, периодически вакцинирующихся против чумы // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2015. №3. С. 62-68. [Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Gorbатов A.A., Kravchenko T.B., Tyurin E.A., Bondarenko N.L., Dyatlov I.A., Karaulov A.V. Specific humoral and cellular immunity in humans periodically vaccinated against plague. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2015, no. 3, pp. 62-68. (In Russ.)]
3. Bi Y., Zhou J., Yang H., Wang X., Zhang X., Wang Q., Wu X., Han Y., Song Y., Tan Y., Du Z., Yang H., Zhou D., Cui Y., Zhou L., Yan Y., Zhang P., Guo Z., Wang X., Liu G., Yang R. IL-17A produced by neutrophils protects against pneumonic plague through orchestrating IFN γ -activated macrophage programming. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, pp. 704-713.
4. Eriksson M., Sartono E., Martins C.L., Balé C., Garly M.L., Whittle H., Aaby P., Pedersen B.K., Yazdanbakhsh M., Erikstrup C., Benn C.S. A comparison of *ex vivo* cytokine production in venous and capillary blood. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 150, no. 3, pp. 469-476.

5. Levy Y., Flashner Y., Tidhar A., Zauberman A., Aftalion M., Lazar S., Gur D., Shafferman A., Mamroud E. T cells play an essential role in anti-F1 mediated rapid protection against bubonic plague. *Vaccine*, 2011, Vol. 29, no. 40, pp. 6866-6873.
6. Li B., Yang R. Interaction between *Yersinia pestis* and the host immune system. *Infect. Immun.*, 2008, Vol. 76, no. 5, pp. 1804-1811.
7. Li B., Zhou L., Guo J., Wang X., Ni B., Ke Y., Zhu Z., Guo Z., Yang R. High-throughput identification of new protective antigens from a *Yersinia pestis* live vaccine by enzyme-linked immunospot assay. *Infect. Immun.*, 2009, Vol. 77, no. 10, pp. 4356-4361.
8. Li B., Du C., Zhou Lei, Bi Y., Wang X., Wen L., Guo Z., Song Z., Yang R. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* infection in long-term recovered plague patients. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2012, Vol. 19, no. 2, pp. 228-234.
9. Philipovskiy A.V., Smiley S.T. Vaccination with live *Yersinia pestis* primes CD4 and CD8 T Cells that synergistically protect against lethal pulmonary *Y. pestis* infection. *Infection and Immunity*, 2007, Vol. 75, no. 2, pp. 878-885.
10. Plotkin S.A. Correlates of Protection Induced by Vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, Vol. 17, no. 7, pp. 1055-1065.
11. Rajerison M., Darteville S., Ralafiarisoa L.A., Bitam I., Tuyet Dinh Thi Ngoc, Andrianaivoarimanana V., Nato F., Rahalison L. Development and evaluation of two simple, rapid immunochromatographic tests for the detection of *Yersinia pestis* antibodies in humans and reservoirs. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2009, Vol. 3, no. 4, e421. doi: 10.1371/journal.pntd.0000421.
12. Szaba F.M., Kummer L.W., Duso D.K., Koroleva E.P., Tumanov A.V., Cooper A.M., Bliska J.B., Smiley S.T., Lin J.S. TNF α and IFN γ but Not Perforin Are Critical for CD8 T Cell-Mediated Protection against Pulmonary *Yersinia pestis* Infection. *PLoS Pathog.*, 2014. Vol. 10, no. 5, e1004142. doi:10.1371/journal.ppat.1004142.
13. Wang X., Wang Z., Guo Z., Wei B., Tian F., Yu S., Wang H., Wang H., Yang R. Serum cytokine responses in primary pneumonic plague patients. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011, Vol. 18, no. 1, pp.184-186.
14. Williamson E.D., Flick-Smith H.C., LeButt C., Rowland C.A., Jones S.M., Waters E.L., Gwyther R.J., Miller J., Packer P.J., Irving M. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens. *Infection and Immunity*, 2005, Vol. 73, no. 6, pp. 3598-3608.
15. Williamson E.D. The role of immune correlates and surrogate markers in the development of vaccines and immunotherapies for plague. *Advances in Preventive Medicine*, 2012. Article ID 365980, 7 p. doi: 10.1155/2012/365980.

Авторы:

Клюева С.Н. — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“», г. Саратов, Россия

Бугоркова С.А. — д.м.н., заведующая отделом иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“», г. Саратов, Россия

Щуковская Т.Н. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“», г. Саратов, Россия

Санджиев Д.Н. — руководитель Управления Роспотребнадзора по Республике Калмыкия, главный государственный санитарный врач по Республике Калмыкия, г. Элиста, Россия

Authors:

Klyueva S.N., PhD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Bugorkova S.A., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Shchukovskaya T.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Sandzhiev D.N., Head, Rospotrebnadzor Administration for the Republic of Kalmykia, Main State Sanitary Doctor of the Republic of Kalmykia, Elista, Russian Federation

Конушева С.В. — заместитель руководителя
Управления Роспотребнадзора по Республике Калмыкия,
заместитель главного государственного санитарного
врача по Республике Калмыкия, г. Элиста, Россия

Савченко С.П. — начальник отдела эпидемиологического
надзора Управления Роспотребнадзора по Республике
Калмыкия, г. Элиста, Россия

Хасыкова Б.А. — заместитель начальника
Территориального отдела «Северо-Восточный»
Управления Роспотребнадзора по Республике Калмыкия
в Черноземельском районе, г. Элиста, Россия

Щербакова С.А. — д.б.н., заместитель директора
по научной и экспериментальной работе ФКУЗ
«Российский научно-исследовательский противочумный
институт „Микроб“», г. Саратов, Россия

Konusheva S.V., Deputy Head, Rosпотребнадзор
Administration for the Republic of Kalmykia, Deputy Main
State Sanitary Doctor of the Republic of Kalmykia, Elista,
Russian Federation

Savchenko S.P., Head, Epidemiology Surveillance
Department, Rosпотребнадzor Administration in the Republic
of Kalmykia, Elista, Russian Federation

Khasykova B.A., Deputy Head, Territorial Department
“North-East”, Rosпотребнадzor Administration in the Republic
of Kalmykia, Elista, Russian Federation

Shcherbakova S.A., PhD, MD (Biology), Deputy Director,
Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov,
Russian Federation

Поступила 31.05.2017

Отправлена на доработку 21.06.2017

Принята к печати 22.09.2017

Received 31.05.2017

Revision received 21.06.2017

Accepted 22.09.2017

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ, ОБРАЗУЕМЫХ НК-КЛЕТКАМИ, МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Михайлова В.А.^{1,2}, Белякова К.Л.¹, Вязьмина Л.П.¹, Шевелева А.Р.¹,
Сельков С.А.¹, Соколов Д.И.^{1,2}

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

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В результате активации и/или апоптоза клетки могут образовывать микровезикулы (МВ) размером от 100 нм до 1000 нм. В настоящее время все больше внимания уделяется детекции и оценке динамики содержания МВ лейкоцитарного происхождения. В этой связи большой интерес представляет определение МВ, образуемых НК-клетками, основной функцией которых является индукция апоптоза вирус-инфицированных и опухолевых клеток. В настоящее время нет прямых свидетельств о способности НК-клеток продуцировать МВ. Целью настоящей работы явилась оценка содержания МВ НК-клеток при помощи метода высокоточной проточной цитофлуориметрии. Установлено, что с помощью метода высокоточной проточной цитофлуориметрии возможно выявление МВ размером от 200 нм до 1000 нм, образуемых НК-клетками. Показано, что инкубация НК-клеток в присутствии TNF α не влияла на относительное количество МВ, однако приводила к повышению интенсивности экспрессии CD95 на МВ. Таким образом, метод высокоточной проточной цитофлуориметрии может быть использован для определения МВ и их фенотипа.

Ключевые слова: НК-клетки, проточная цитофлуориметрия, микровезикулы, микрочастицы, клеточная культура, NK-92, поверхностные рецепторы

EVALUATION OF MICROVESICLES FORMED BY NATURAL KILLER (NK) CELLS USING FLOW CYTOMETRY

Mikhailova V.A.^{a,b}, Belyakova K.L.^a, Vyazmina L.P.^a, Sheveleva A.R.^a,
Selkov S.A.^a, Sokolov D.I.^{a,b}

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

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

Abstract. As a result of activation and/or apoptosis, the cells can form microvesicles (MV) from 100 nm up to 1000 nm in size. Nowadays, the attention is being increasingly focused on dynamic detection and evaluation of leukocyte-derived microvesicles by their contents. In this regard, determination of microvesicles formed by NK cells is of utmost interest. The main function of these population is to induce apoptosis of virus-infected

Адрес для переписки:

Соколов Дмитрий Игоревич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 328-98-50.
E-mail: falcojugger@yandex.ru

Address for correspondence:

Sokolov Dmitry I.
D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology
199034, Russian Federation, St. Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3.
Phone: 7 (812) 328-98-50.
E-mail: falcojugger@yandex.ru

Образец цитирования:

В.А. Михайлова, К.Л. Белякова, Л.П. Вязьмина, А.Р. Шевелева, С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Определение микровезикул, образуемых НК-клетками, методом проточной цитофлуориметрии» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 251-254.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-251-254

© Михайлова В.А. и соавт., 2018

For citation:

V.A. Mikhailova, K.L. Belyakova, L.P. Vyazmina, A.R. Sheveleva, S.A. Selkov, D.I. Sokolov "Evaluation of microvesicles formed by natural killer (NK) cells using flow cytometry", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 251-254.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-251-254

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-251-254

and tumor cells. At the present time, there is no direct evidence of the NK cells ability to produce microvesicles. This investigation was performed in order to estimate contents of NK cell-derived microvesicles using high-precision flow cytometric approach. It has been shown that the high-precision flow cytometry allows to detect microvesicles formed by NK cells, ranging from 200 to 1000 nm in size. It was demonstrated that incubation of NK cells in the presence of TNF α did not affect the relative value of microvesicles, however, being associated with increased intensity of CD95 expression on microvesicles. Hence, the high-precision flow cytometry can be used to detect microvesicles and to determine their phenotype.

Keywords: NK cells, flow cytometry, microvesicles, microparticles, cell culture, NK-92, cell surface receptors

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-00679 (культивирование клеток) и грантом РНФ № 17-15-01230 (оценка фенотипических характеристик линии НК-92 и их микрочастиц).

The present work was supported by the Russian Foundation for Basic Research grant No. 17-04-00679 (cell cultures) and the Russian Science Foundation grant No. 17-15-01230 (evaluation of the NK-92 cell line phenotype and their microvesicles).

Introduction

Cell communication is an integral process of cells functioning and is carried out by contact interactions between cells and by the transmission of activation or inhibitory signals due to secreted cytokines. It is assumed that microvesicles can participate in cell communication, since along with the membrane molecules expressed by a source cell, they contain cytoplasmic molecules: lipids, MHC molecules of I and II class, chemokines, cytokines, growth factors, transcription factors, microRNA [3, 4, 6, 8], and template RNA [8]. The possibility of a signal transmission from cell to cell with the help of microvesicles and thus formation of a distant cell interaction is under discussion. Microvesicles can be formed as a result of cells activation and/or apoptosis. They are present in the peripheral blood in healthy donors; the number and composition of microvesicle membrane receptors may vary under pathological conditions [10]. Nowadays, the attention is being increasingly focused on the detection and evaluation of the dynamics of the content of leukocyte-derived microvesicles. One of the leukocyte populations is the population of NK cells, the main function of which is the induction of apoptosis of virus infected and tumor cells. At present, there is no direct evidence of the ability of NK cells to produce microvesicles.

The detection of microvesicles in biological fluids is possible through several methods: transmission electron microscopy [12], detection of changes in flow resistance through micropores (TRPS – Tunable Resistive Pulse Sensing) [12, 13], atomic force microscopy [11], flow cytometry [12]. In comparison with other methods of microvesicle detection, flow cytometry is the most applicable one, since it allows to obtain data on microvesicle concentration in biological fluids, for example, in peripheral blood, as well as to determine the receptors on their surface [12, 13]. Attempts to detect leukocyte-derived microvesicles have been made using the FacsCanto II device (BD, USA) [7, 9]. However, the sensitivity of

the device allows to detect particles of only 300 nm and up in size, which leads to the undercount of microvesicle content in samples. The use of filtered solutions and calibration particles of a certain size (200 nm, 500 nm, 1000 nm) improves the accuracy of microvesicle detection [7, 9].

The Cytoflex flow cytometer (Beckman Coulter, USA) equipped with three lasers: 488 nm, 638 nm, and 405 nm, allows to detect side scatter from a 405 nm laser using a 405/10 filter and makes it possible to determine particles of 200 nm and up in size. The use of additional protocols for cleaning the flowing liquid and sample washing buffers can increase the sensitivity of the device.

The aim of this work was to estimate microvesicle content in NK cells using high-precision flow cytometry, namely the Cytoflex device.

Materials and Methods

NK cells of the NK-92 cell line (ATCC, USA) were selected as source cells for microvesicles. NK-92 cell line is a suspension culture reproducing the basic phenotypic and functional characteristics of activated NK cells. NK-92 cell line was cultured according to the manufacturer's directions (ATCC, USA) in the presence of recombinant IL-2 (500 U/ml) (Roncoleukin, Biotech LTC, Russia). TNF α (10 U/ml) (Sigma, USA) was used as an inducer.

To evaluate the phenotype of NK cells of the NK-92 cell line and the microvesicles they formed, the cells were placed into a 24-well plate in 1 ml of complete cell culture medium at a concentration of 400,000 cells/ml, cultured at 37 °C under the damp atmosphere with 5% CO $_2$ for 24 hours in the presence of an inducer. After 24 hours, the plates were centrifuged under 200 g and 22 °C for 10 minutes to settle the cells. To separate the microvesicles, we used the differential centrifugation method by M.P. Gelderman, J. Simak [5] in Hanks' solution without Ca $^{2+}$ and Mg $^{2+}$, for which the obtained supernatants had been consecutively centrifuged under 500 g 10 °C for 10 min, 15500 g 10 °C for 90 min, 20000 g 10 °C for 20 min. Thus, we obtained the NK-92 cell line and its microvesicles and processed them with monoclonal antibodies to CD95 according to the manufacturer's instructions (BD, USA). The expression of receptors by NK cells (Figure 1, see 2nd page of cover) and microvesicles (Figure 2, see 3rd page of cover) was assessed using the high-precision flow cytometry method, namely the Cytoflex flow cytometer (Beckman Coulter, USA), which allows to detect particles from 0.2 μ m in size.

TABLE 1. EXPRESSION PARAMETERS OF CD95 (Fas) SURFACE RECEPTOR OF NK CELLS AND THEIR MICROVESICLES

NK cells and microvesicle parameters				
Object	NK cells expressing CD95 (Fas)		Microvesicle expressing CD95 (Fas)	
Incubation conditions	Constitutive	In the presence of TNF α (10 U/ml)	Constitutive	In the presence of TNF α (10 U/ml)
Relative value, %	98.9 \pm 0.1	98.9 \pm 0.01	2.2 \pm 0.3	2.5 \pm 0.2
Expression intensity (MFI)	10064 \pm 277	14113 \pm 258**	82.0 \pm 8.0	147 \pm 50*

Note. Differences in CD95 expression levels by NK cells or microvesicles are significant, as compared to the constitutive expression levels: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$.

To adjust the device we used calibration particles of 0.1 μ m, 0.2 μ m, 0.5 μ m, and 1.0 μ m (Invitrogen, USA) in size in accordance with the device manufacturer's indications (Figure 2, see 3rd page of cover). To work with microvesicles, we filtered all solutions through filters with 0.2 μ m pore size [71]. The statistical analysis was performed in Statistica 10 software using Student's t-test.

Results and Discussion

CD95 (Fas) is a proapoptotic receptor inducing cell death when binding to CD95L ligand (FasL). The expression of CD95 by cells indicates their readiness for apoptosis and reflects the mechanisms controlling the functional activity of the cell population, and therefore the presence of this receptor on all cells of a body is suggested. The analysis of CD95 expression by NK cells, both with incubation without inducers and in the presence of TNF α , the proinflammatory cytokine, revealed that 99% NK cells of the NK-92 cell line expressed CD95 on their surface. The incubation of cells in the presence of TNF α did not result in a change in the number of CD95⁺NK cells. At the same time, the intensity of CD95 expression by NK cells was increased (Table 1). The increase in the intensity of CD95 proapoptotic receptor expression by NK cells as a result of TNF α action indicates the strengthening of control of NK cells population, which prevents their excessive activation.

It has been established that the high-precision flow cytometry method, namely the Cytoflex flow cytometer (Beckman Coulter, USA), allows to detect microvesicles from 200 nm to 1000 nm in size formed by NK cells. It was demonstrated that the relative value of microvesicles formed by NK cells of the NK-92 cell line expressing CD95 was significantly lower compared to the source cells. The high-precision flow cytometry method, namely the Cytoflex flow cytometer, showed that the activation of NK cells by TNF α did not affect the relative value of microvesicles. However, it increased the intensity of CD95 expression on microvesicles (Table 1).

Literature tells us about CD95L and CD95 presence in the membrane of microvesicles of various origin [1, 2]. The data obtained on CD95 presence on microparticles of NK cells are consistent with the literature data. It is assumed that the formation of CD95⁺ on microvesicles by tumor cells represents one of the mechanisms of avoiding the recognition of tumor cells by cells of the immune system [2]. The expression of CD95 microvesicles of NK cells of the NK-92 cell line in the intact state and in the presence of TNF α , revealed by us, can also be a representation of this mechanism.

Thus, Cytoflex flow cytometer (Beckman Coulter, USA) implementing the method of high-precision flow cytometry can be used to detect microvesicles of a cell origin from 200 nm to 1000 nm in size, as well as to assess their phenotypic characteristics.

Список литературы / References

1. Agouni A., Ducluzeau P. H., Benameur T., Faure S., Sladkova M., Duluc L., Leftheriotis G., Pechanova O., Delibegovic M., Martinez M.C., Andriantsitohaina R. Microparticles from patients with metabolic syndrome induce vascular hypo-reactivity via Fas/Fas-ligand pathway in mice. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 11, e27809. doi: 10.1371/journal.pone.0027809.
2. Albanese J., Meterissian S., Kontogianna M., Dubreuil C., Hand A., Sorba S., Dainiak N. Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles. *Blood*, 1998, Vol. 91, no. 10, pp. 3862-3874.
3. Camussi G., Deregibus M.C., Bruno S., Grange C., Fonsato V., Tetta C. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am. J. Cancer Res.*, 2011, Vol. 1, no. 1, pp. 98-110.
4. Diehl P., Fricke A., Sander L., Stamm J., Bassler N., Htun N., Ziemann M., Helbing T., El-Osta A., Jowett J.B., Peter K., Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc. Res.*, 2012, Vol. 93, no. 4, pp. 633-644.
5. Gelderman M.P., Simak J. Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles. *Methods Mol. Biol.*, 2008, Vol. 484, pp. 79-93.

6. Gyorgy B., Szabo T. G., Pasztoi M., Pal Z., Misjak P., Aradi B., Laszlo V., Pallinger E., Pap E., Kittel A., Nagy G., Falus A., Buzas E. I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, Vol. 68, no. 16, pp. 2667-2688.
7. Jayachandran M., Litwiller R.D., Owen W.G., Heit J.A., Behrenbeck T., Mulvagh S.L., Araoz P.A., Budoff M.J., Harman S.M., Miller V.M. Characterization of blood borne microparticles as markers of premature coronary calcification in newly menopausal women. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2008, Vol. 295, no. 3, pp. H931-H938.
8. Mause S.F., Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.*, 2010, Vol. 107, no. 9, pp. 1047-1057.
9. Mikhailova V.A., Ovchinnikova O.M., Zainulina M.S., Sokolov D.I., Selkov S.A. Detection of microparticles of leukocytic origin in the peripheral blood in normal pregnancy and preeclampsia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, Vol. 157, no. 6, pp. 721-727.
10. Roos M.A., Gennero L., Denysenko T., Reguzzi S., Cavallo G., Pescarmona G.P., Ponzetto A. Microparticles in physiological and in pathological conditions. *Cell Biochemistry and Function*, 2010, Vol. 28, no. 7, pp. 539-548.
11. Sokolov D.I., Ovchinnikova O.M., Korenkov D.A., Viknyanschuk A.N., Benken K.A., Onokhin K.V., Selkov S.A. Influence of peripheral blood microparticles of pregnant women with preeclampsia on the phenotype of monocytes. *Transl. Res.*, 2016, Vol. 170, pp. 112-123.
12. van der Pol E., Coumans F.A., Grootemaat A.E., Gardiner C., Sargent I.L., Harrison P., Sturk A., van Leeuwen T.G., Nieuwland R. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J. Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 12, no. 7, pp. 1182-1192.
13. Xu R., Greening D.W., Zhu H.J., Takahashi N., Simpson R.J. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J. Clin. Invest.*, 2016, Vol. 126, no. 4, pp. 1152-1162.

Авторы:

Михайлова В.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, кафедра иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

Белякова К.Л. — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Вязьмина Л.П. — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Шевелева А.Р. — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Сokolov Д.И. — д.б.н., заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, кафедра иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Mikhailova V.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology; First St. Petersburg I.P. Pavlov State Medical University, Department of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Vyazmina L.P., Junior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Sheveleva A.R., Laboratory Research Assistant, Laboratory of Cell Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Cell Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology; First St. Petersburg I.P. Pavlov State Medical University, Department of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 25.09.2017

Отправлена на доработку 10.10.2017

Принята к печати 12.10.2017

Received 25.09.2017

Revision received 10.10.2017

Accepted 12.10.2017

АКТИВАЦИЯ РАННЕЙ СТАДИИ АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ *IN VITRO* ПОСРЕДСТВОМ ПЕРЕНОСА КОМПОНЕНТОВ АУТОЛОГИЧНОЙ АПОПТОТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

**Абрамова Т.Я.¹, Цура В.А.², Блинова Е.А.¹, Моренкова А.Ю.¹,
Козлов В.А.¹**

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

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Известно, что дефекты программированной гибели лимфоцитов периферической крови могут быть причиной аутоотолерантности и хронической персистенции воспаления при ревматоидном артрите. По последним данным, процесс апоптоза не является автономным — избыточное скопление клеток в совокупности с обедненным составом среды приводит к скученности клеточного сообщества и влиянию уже ушедших в апоптоз клеток на окружающие клетки посредством морфогенетического повреждения в процессе воздействия механических сил. Такие эффекты называют компенсаторной пролиферацией, или апоптоз-индуцированной пролиферацией. Внеклеточные везикулы (экзосомы и апоптотические тельца) также оказывают негативное воздействие на культивируемые клетки, инициируя запуск программы апоптотической гибели. В свою очередь, апоптоз также может не автономно контролироваться соседними клетками.

Нами были проведены исследования, позволившие оптимизировать методы, направленные на инициацию апоптотической гибели клеток и изучение воздействия апоптотического окружения на аутологичные клетки, находящиеся в физиологических условиях. Подбор условий в совокупности с методом флуоресцентного маркирования лимфоцитов и последующим отдельным анализом их на проточном цитофлуориметре позволили оценить параметры раннего апоптоза субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови при ревматоидном артрите. У пациентов с ревматоидным артритом *in vitro* установлена выраженная готовность к раннему апоптозу первично (CFSE⁻) и вторично (CFSE⁺) индуцированных Т-лимфоцитов, стимулированных аCD3-антителами, как относительно исходного уровня апоптоза, так и относительно клеток, находящихся в условиях индукции апоптоза. Полученные данные свидетельствуют о том, что стимуляция Т-лимфоцитов антителами к CD3, и, как следствие, рост пролиферативного процесса клеток *in vitro* привели к увеличению уровня раннего апоптоза не только непосредственно клеток, получивших пролиферативный стимул, но и повышению влияния клеточного и гуморального компонентов аCD3-стимулированной культуры на нормально пролиферирующие лимфоциты.

Адрес для переписки:

Абрамова Татьяна Яковлевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-26-74.
Тел./факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru, niiki01@online.nsk.su

Address for correspondence:

Abramova Tatiana Ya.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-26-74.
Phone/Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru, niiki01@online.nsk.su

Образец цитирования:

Т.Я. Абрамова, В.А. Цура, Е.А. Блинова,
А.Ю. Моренкова, В.А. Козлов «Активация ранней
стадии апоптоза Т-лимфоцитов *in vitro* посредством
переноса компонентов аутологичной апоптотической
культуры у пациентов с ревматоидным
артритом» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20,
№ 2. С. 255–262.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-255-262

© Абрамова Т.Я. и соавт., 2018

For citation:

T. Ya. Abramova, V. A. Tsura, E. A. Blinova, A. Yu. Morenkova,
V. A. Kozlov "In vitro activation of early-stage apoptosis of
T lymphocytes by transferring apoptotic autologous cell culture
components in patients with rheumatoid arthritis", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,
Vol. 20, no. 2, pp. 255–262.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-255-262

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-255-262

Перенос первично индуцированной в условиях скученности и обеднения среды аутологичной апоптотической «aCD3» и дексаметазон-стимулированной культуры активирует процесс раннего апоптоза нормально пролиферирующих клеток. Как известно, глюкокортикоиды служат исполнителями индуцированной активации клеточной смерти. В фармакологических концентрациях глюкокортикоиды и их синтетические аналоги стимулируют в активированных лимфоцитах эндонуклеазы, разрушающие ДНК в межнуклеосомных участках, что заканчивается апоптозом клеток. Полученные в исследовании результаты свидетельствуют о возможности индукции ранней стадии апоптоза Т-лимфоцитов *in vitro* у пациентов с ревматоидным артритом посредством переноса клеток, подвергнутых активационному апоптозу.

Ключевые слова: ранний апоптоз, аутологичная культура клеток, Т-лимфоциты, ревматоидный артрит

IN VITRO ACTIVATION OF EARLY-STAGE APOPTOSIS OF T LYMPHOCYTES BY TRANSFERRING APOPTOTIC AUTOLOGOUS CELL CULTURE COMPONENTS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Abramova T.Ya.^a, Tsura V.A.^b, Blinova E.A.^a, Morenkova A.Yu.^a, Kozlov V.A.^a

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

^b *Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation*

Abstract. Defects in programmed death of peripheral blood lymphocytes may result into autotolerance and chronic persistence of inflammatory reaction in rheumatoid arthritis. According to recent data, apoptosis is not an autonomous process, i.e., an excessive accumulation of cells in conjunction with a depleted medium leads to cellular excess, thus causing effect of cells already committed to apoptosis upon surrounding cells, by morphogenetic damage due to mechanical forces. Such effects are called compensatory proliferation or apoptosis-induced proliferation. Extracellular vesicles (ectosomes and apoptotic bodies) also have a negative effect on cultured cells, triggering their programmed apoptotic death. In turn, apoptosis can also be controlled by neighboring cells in non-autonomous manner.

We conducted studies that allowed us to optimize methods aimed at the initiation of apoptotic cell death and to investigate the effects of apoptotic environment upon autologous cells under physiological conditions. The selected conditions in combination with a fluorescent labeling of lymphocytes and subsequent separate flow cytometric analysis allowed us to evaluate parameters of early apoptosis in subpopulations of peripheral blood T-lymphocytes in rheumatoid arthritis. *In vitro* studies of cells from the patients with rheumatoid arthritis allowed us to reveal a pronounced readiness of primary (CFSE⁻) and secondary (CFSE⁺)-induced T lymphocytes for early apoptosis after stimulation with anti-CD3 antibodies. It was observed both against initial level of apoptosis, and when compared to cells induced for apoptosis. The obtained data suggest that stimulation of T lymphocytes with antibodies against CD3, and, as a result, an *in vitro* rise in cell proliferation rate leading to increased levels of early apoptosis not only among the cells directly receiving a proliferative stimulus, but also to increased effect of cellular and humoral components from anti-CD3-stimulated cultures upon normally proliferating lymphocytes.

The transfer of an autologous apoptotic “aCD3” and dexamethasone-stimulated cultures, which were initially induced under conditions of cell overcrowding and medium exhaustion, was shown to activate the process of early apoptosis among normally proliferating cells. Glucocorticoids are known to serve as agents of cell death induced by activation. At pharmacological concentrations, glucocorticoids and their synthetic analogues stimulate endonucleases in activated lymphocytes. These enzymes destroy DNA in the internucleosomal regions thus resulting into cell apoptosis. The results obtained in present study suggest an opportunity of an *in vitro* early-stage apoptosis induction in T lymphocytes from the patients with rheumatoid arthritis, by means of cells subjected to activation-induced apoptosis.

Keywords: early apoptosis, autologous cell culture, T lymphocytes, rheumatoid arthritis

Введение

Актуальность

По современным представлениям, ревматоидный артрит (РА) является хроническим иммуновоспалительным заболеванием, которое характеризуется преимущественным поражением суставов по типу симметричного эрозивного полиартрита, а развитие аутоиммунного воспаления связано с нарушением супрессорных механизмов, контролирующей толерантность Т- и В-лимфоцитов к аутоантигенам [1, 2]. Накопление функционально активных Т-лимфоцитов с реактивностью в отношении собственных антигенов предполагает нарушение процессов пролиферации и гибели Т-клеток, в связи с чем предпринимаются активные попытки объяснить развитие и поддержание аутоиммунного воспаления при ревматоидном артрите нарушением процессов апоптоза [4, 11].

Апоптоз является общебиологическим механизмом, ответственным в границах иммунной системы за элиминацию выполнивших свою функцию активированных лимфоцитов, с целью предупреждения аутоиммунных реакций [5, 6]. Исследования процессов апоптоза в качестве потенциального механизма развития и поддержания патологического воспаления при РА остаются актуальным направлением, поскольку этиология заболевания остается неизвестной, а патогенез РА изучен не в полной мере [1, 11]. Известно, что при РА в полости пораженных суставов накапливаются клетки, чувствительные к активационному апоптозу, а также лимфоциты, слабо экспрессирующие Bcl-2, однако гибели указанных клеток не происходит, что способствует гиперплазии синовиальных тканей и хронизации процесса.

Также сохраняет актуальность исследование процессов программированной гибели циркулирующих лимфоцитов периферической крови, в которой, как известно, уровень апоптоза лимфоцитов у больных РА относительно высок [2], но ассоциирован с утратой иммунологической толерантности в результате увеличения продолжительности жизни и накопления аутореактивных Т-клеток [1].

На современном этапе изучения данной проблемы одной из перспективных задач является выявление механизмов «клеточного соседства» — взаимодействия апоптотирующих и нормально пролиферирующих клеток в норме и при аутоим-

мунном воспалении. Как известно, контроль клеточного гомеостаза основан на взаимодействии двух разнонаправленных процессов: пролиферации и апоптоза, и, следовательно, их баланс должен быть скоординирован. После того как клетки вступают в процесс апоптоза, окружающее клеточное сообщество способно активно пролиферировать и, таким образом, заполнять оставленные пробелы. Подобное явление называется компенсаторной пролиферацией, или апоптоз-индуцированной пролиферацией [9].

В экспериментальных исследованиях последних лет показано, что апоптотические клетки могут оказывать значительное влияние на ближайшее окружение. Так, было установлено, что при условии сохранения сигнальных возможностей в течение длительного периода времени апоптотические клетки модулируют пролиферацию, активируя эктопическую экспрессию митогенных сигналов, или индуцируют апоптоз в соседних клетках через проапоптотические сигналы (Eiger или TNF). Производство этих сигналов зависит от активации JNK пути [7, 8].

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния клеточных и гуморальных факторов апоптотирующих клеток на аутологичную культуру лимфоцитов *in vitro* у пациентов с ревматоидным артритом

Материалы и методы

В основу работы положены результаты исследования периферической крови 8 женщин, больных РА (средний возраст $39,0 \pm [30,5-59,5]$ лет), находившихся на лечении в клинике ФГБНУ НИИФКИ г. Новосибирска. У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на проведение необходимых манипуляций.

Методы исследования

Выделенная на градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,078) (BioClot GmbH, Германия) лимфоцитарная фракция клеток была распределена на 2 варианта культуры. Первый вариант («нормально пролиферирующая» [НП]) — 7 лунок по $5,0 \times 10^5$ кл./0,5 мл полной культуральной среды (ПКС), в составе ПКС — среда RPMI (ООО «Биолот», Санкт-Петербург), тиенам, (ЗАО ОПТАТ, Россия), L-глутамин (Gerbu, Biotechnik, GmbH, Германия), буферный раствор Hepes (GERBU, Biotechnik, GmbH), фетальная телячья сыворотка (FCS), (Hy Clone, США), покрашенных флуо-

ресцентным красителем CFSE (Molecular probes, США). Второй вариант культуры («апоптотическая» [АК]) – 3 лунки (нестимулированные клетки, aCD3 (МедБиоСпектр, Москва), и дексаметазон (1×10^{-4} М) – стимулированные клетки по 2×10^6 кл/150,0 мкл обедненной (1% FCS) ОС среды. На 4-е сутки инкубации апоптотическая культура (клетки и супернатант отдельно) была перенесена к лимфоцитам, пролиферирующим в условиях ПКС. Далее до 7 суток проводилось сокультивирование проб (37°C , 5%CO₂), получивших условные названия: 1 – «Контроль» – контрольное культивирование лимфоцитов в ПКС; 2 – «Контроль апоптоза» – к НП лимфоцитам была добавлена клеточная часть АК; 3 – «Контроль апоптоза супернатант» – сокультивирование НП в ПКС и перенесенного к ней супернатанта от АК; 4 – «aCD3» – НП культура и клетки АК, стимулированные aCD3; 5 – «aCD3 супернатант» – НП лимфоциты и супернатант от АК, стимулированной aCD3; 6 – «Деха» – сокультивирование НП лимфоцитов в ПКС и АК, обработанной дексаметазоном (1×10^{-4} М); 7 – «Деха супернатант» – НП лимфоциты и супернатант от АК, обработанной дексаметазоном. На 7-е сутки сокультивирования на цитофлуориметре BD FACS Canto II в популяции Т-лимфоцитов (CD3⁺/PC7) (Beckman Coulter, США) определялся уровень раннего (аннексин V, Vector Dickenson, США, %) апоптоза в нативных, а также в aCD3 и дексаметазон (1×10^{-4} М) стимулированных вариантах.

Статистическая обработка данных проводилась с применением методов непараметрической статистики (Statistica 6.0). (U-критерия Манна–Уитни, парного критерия Вилкоксона и ранговой корреляции Спирмена). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха ($Me \pm$ [lower upper quartile]). Различия между группами считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Данные о нарушении апоптотических реакций мононуклеарных клеток периферической крови [4, 11] послужили основанием для изучения у пациентов с РА особенностей ответа нормально пролиферирующих Т-клеток (культура-реципиент), подвергнутых активационному апоптозу *in vitro* посредством переноса к ним клеточных и гуморальных компонентов апоптозирующей

культуры – аутологичных нативных, а также aCD3 и дексаметазон-стимулированных лимфоцитов периферической крови (культура-донор), находящихся в условиях скученности и обеднения среды.

На этапе оптимизации метода, направленного на инициацию апоптотической гибели клеток и исследование воздействия апоптотического окружения на аутологичные клетки, находящиеся в физиологических условиях, были определены условия, которые в совокупности с методом флуоресцентного маркирования лимфоцитов и последующим отдельным анализом их на проточном цитофлуориметре, позволили оценить параметры раннего апоптоза Т-лимфоцитов периферической крови при ревматоидном артрите.

В частности, для исследования раннего апоптоза лимфоцитов пациентов с ревматоидным артритом проводился подбор наиболее физиологичных условий получения апоптотических клеток. С этой целью лимфоциты культивировались с различными концентрациями фетальной телячьей сыворотки (FCS): 1%, 3%, 7,5% и 10%, а также определялось оптимальное количество клеток на единицу объема культуральной среды. Наиболее выраженный уровень апоптоза был установлен при добавлении лимфоцитов в обедненную культуральную среду (ОС), с минимальным количеством питательных веществ – 1% FCS и концентрацией клеток 2×10^6 в 0,15 мл ОС в 96-луночных планшетах, с объемом лунки 0,2 мл.

Рядом исследователей установлено, что глюкокортикоиды вызывают апоптоз лимфоцитов больных аутоиммунными заболеваниями, и особенно чувствительны к индукции апоптоза Т-лимфоциты [3]. На этапе оптимизации метода нами было проведено исследование особенностей влияния на Т-клетки глюкокортикоида дексаметазона, поскольку принято считать, что он является одним из основных индукторов апоптоза в культуре. Дексаметазон, как синтетический аналог глюкокортикоидов, был нами выбран по причине более выраженного действия. С целью достижения максимального эффекта было проведено титрование – исследование уровня апоптоза лимфоцитов в 72-часовых культурах, культивируемых в ОС с различными дозами дексаметазона. Принято считать, что концентрации дексаметазона от 1×10^{-1} М до 1×10^{-5} М являются не физиологичными и подавляют пролиферацию клеток, вызывая апоптоз и некроз. Однако в процессе культивирования было выявлено, что

добавление дексаметазона оказывает модулирующий эффект на процессы апоптоза – более высокие дозы (1×10^{-2} М и 1×10^{-3} М) подавляют, очевидно, вызывая некроз, а субфизиологическая – (1×10^{-5} М) снижает, относительно предыдущего разведения, возможно, стимулируя пролиферативный процесс. Оптимальной оказалась концентрация 1×10^{-4} М, которая привела к наиболее выраженному апоптотическому эффекту.

Для исследования содержания клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза, применялся метод, основанный на анализе липидного состава плазматической мембраны. Появление на клеточной мембране фосфатидилсерина (PS) принято считать основным маркером клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза. Аннексин V (AnnV), называемый также «плацентарный антикоагулянтный протеин», обладает высокой аффинностью по отношению к PS, поэтому для исследования уровня апоптоза клетки окрашивали при помощи AnnV, конъюгированного

с флуорохромом FITC (изотиоцианат флуоресцеина).

С целью последующей идентификации, при культивировании популяции нормально пролиферирующих лимфоцитов, к клеткам добавлялся внутриклеточный флуоресцентный краситель CFSE, который представляет собой интернализуемую флуоресцентную метку, способную пассивно проникать внутрь клетки. Само по себе это вещество бесцветно и не флуоресцирует до тех пор, пока его ацетатные группы не будут расщеплены внутриклеточными эстеразами. После контакта с эстеразами CFSE превращается в сильнофлуоресцирующее вещество. Диапазон интенсивности флуоресценции CFSE совпадает с FITC, поэтому применялись моноклональные антитела к $CD3^+$ лимфоцитам, меченные PC7, свечение которых происходит по другому каналу флуоресценции.

Добавление флуоресцентного красителя CFSE к популяции нормально пролиферирующих лимфоцитов при цитофлуориметрии позволяет в одной пробе различить $CFSE^+$ клетки, пролифе-

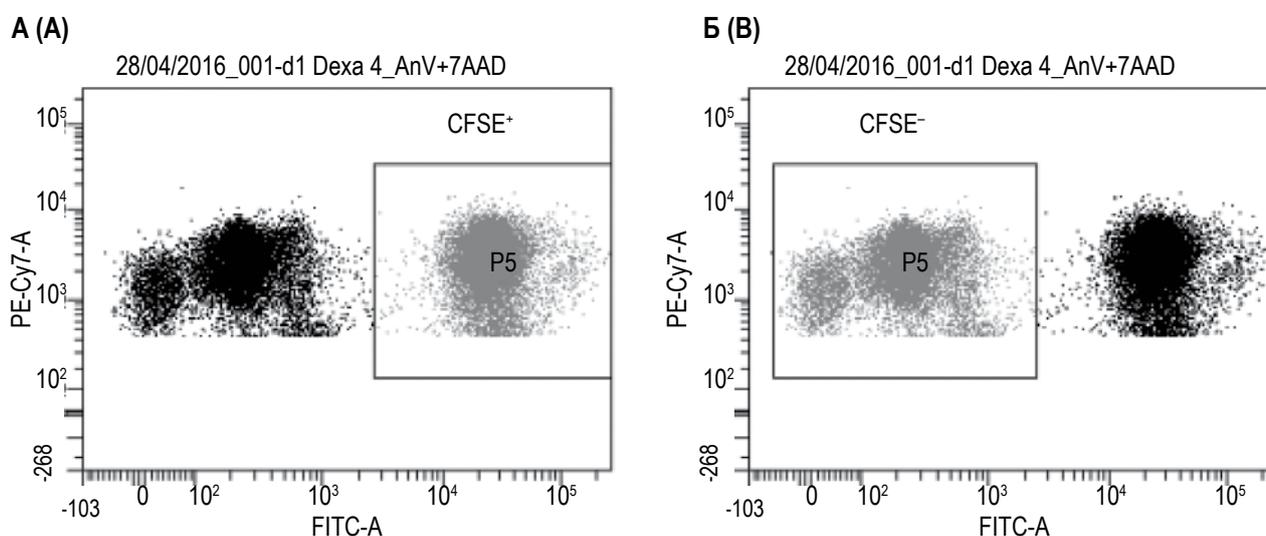


Рисунок 1. Цитофлуориметрия недельной культуры $CD3^+$ лимфоцитов, пролиферирующих в условиях ПКС, окрашенных CFSE ($CFSE^+$) и 72 часа сокультивированных с «апоптотическими» клетками, пролиферирующими в обедненной среде (ОС) с добавлением дексаметазона ($CFSE^-$)

Примечание. Гистограмма А – выделенный гейт соответствует $CFSE^+$ лимфоцитам; гистограмма Б – выделенный гейт соответствует $CFSE^-$ лимфоцитам.

Figure 1. Flow cytometry analysis of 1-week culture of $CD3^+$ lymphocytes which proliferated under FCM conditions labeled with CFSE ($CFSE^+$), and after 72 hours of co-culture with “apoptotic” cells proliferated in depleted medium (DM) supplemented with dexamethasone ($CFSE^-$)

Note. Histogram A, the marked gate corresponds to $CFSE^+$ lymphocytes; histogram B, the marked gate corresponds to $CFSE^-$ lymphocytes.

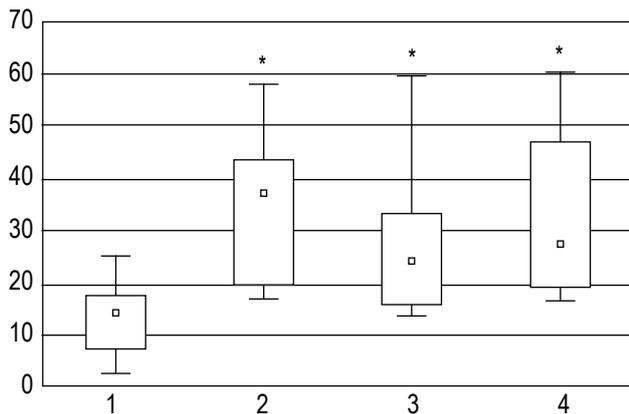


Рисунок 2. Сравнительный анализ уровня раннего апоптоза нативных клеток (1) и недельной культуры лимфоцитов, стимулированных «aCD3 (CFSE⁺)» (2), «aCD3 супернатант» (3) и «aCD3 (CFSE⁻)» (4), (%)

Примечание. * – достоверное отличие по сравнению с группой 1 до культивирования ($p < 0,05$).

Figure 2. Comparative analysis of early apoptosis levels among native cells (1) and a 1-week lymphocyte culture stimulated with “aCD3 (CFSE⁺)” (2), “aCD3 supernatant” (3) and “aCD3 (CFSE⁻)” (4), (%)

Note. *, significant difference compared to group 1 before culture ($p < 0.05$).

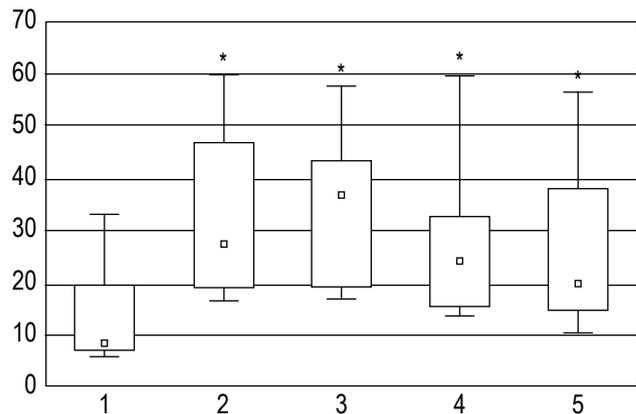


Рисунок 3. Сравнительный анализ уровня раннего апоптоза недельной культуры лимфоцитов в пробах «CA CFSE⁻» (1), «aCD3 (CFSE⁻)» (2) и «aCD3 (CFSE⁺)» (3), «aCD3 супернатант» (4), «Деха супернатант» (5)

Примечание. * – достоверное отличие по сравнению с группой «CA (CFSE⁻)» ($p < 0,05$).

Figure 3. Comparative analysis of early apoptosis levels in a 1-week lymphocyte culture for the samples “CA CFSE⁻” (1), “aCD3 (CFSE⁻)” (2) and “aCD3 (CFSE⁺)” (3), “aCD3 supernatant” (4), “Dexa supernatant” (5)

Note. *, significant difference against the “CA (CFSE⁻)” group ($p < 0.05$).

рирующие в условиях ПКС и апоптозирующие (CFSE⁻), не меченные CFSE лимфоциты (рис. 1).

В результате проведенного в течение недели культивирования лимфоцитов, полученных от пациентов с РА, произошло достоверное, в сравнении с нативными лимфоцитами, повышение уровня раннего апоптоза в пробе «aCD3 (CFSE⁺)», а также в пробе, культивируемой с добавлением супернатанта от этих клеток. Кроме того, значимый рост раннего апоптоза наблюдался в донорской популяции (CFSE⁻) лимфоцитов, стимулированных aCD3. То есть стимуляция Т-лимфоцитов антителами к CD3 и, как следствие, активация пролиферативного процесса клеток *in vitro* не только привели к увеличению уровня раннего апоптоза непосредственно клеток, получивших стимул, но и способствовали повышению влияния клеточного и гуморального компонентов aCD3-стимулированной культуры, находящейся в условиях скученности и обеднения среды, на нормально пролиферирующие лимфоциты (рис. 2).

В настоящее время показано, что процесс апоптоза не является индифферентным для окружающих клеток. Выявлены неавтономные эффекты апоптоза в отношении соседних клеток,

включающие в себя влияние на пролиферацию в окружающих клетках и морфогенетические изменения клеточного сообщества посредством создания механического давления [5, 6, 7].

Анализ полученных результатов выявил значимое повышение уровня раннего апоптоза в пробах культуры-реципиента «aCD3 (CFSE⁺)» относительно культуры-донора «Контроль апоптоза (CFSE⁻)». Против данной контрольной пробы было определено также повышение уровня апоптоза в пробах «aCD3 супернатант», «aCD3 (CFSE⁻)» и «Деха супернатант», что свидетельствует о возможности активации апоптоза нормально пролиферирующей культуры посредством переноса как клеточного, так и гуморального компонента аутологических клеток, подвергнутых активационному апоптозу (рис. 3).

Также было определено повышение раннего апоптоза пробы «aCD3 (CFSE⁺)» относительно варианта «Контроль апоптоза (CFSE⁻)» ($15,8 \pm (10,6 \ 35,7)\%$ vs $37,0 \pm (19,9 \ 43,5)\%$ [$p = 0,05$]), свидетельствующее о потенциальной возможности лимфоцитов больных РА к повышению уровня апоптоза после дополнительного пролиферативного стимула. Значимое усиление апоптоза в пробах, содержащих супернатанты

от «аCD3» и «Деха» апоптотических клеток, относительно контрольных групп, может быть обусловлено присутствием эктосом и апоптотических телец в супернатанте апоптотирующей культуры [10]. Внеклеточные везикулы оказывают негативное воздействие на культивируемые клетки, инициируя запуск программы апоптотической гибели. Кроме того, апоптотические тельца и эктосомы содержат фосфатидилсерин на поверхности мембраны, позволяющий им связываться с Annexin V [10, 12] и, возможно, классифицироваться цитофлуориметром как клетки, находящиеся на стадии раннего апоптоза. Относительно низкие параметры раннего апоптоза клеток «Контроль апоптоза», пролиферирующих в течение недели в условиях скученности и обеднения среды, свидетельствуют о том, что подобный вариант индукции клеточной гибели в меньшей степени влияет на параметры раннего апоптоза лимфоци-

тов больных, в то же время в Т-клетках больных РА выявлена высокая готовность к активационному апоптозу в результате добавления при данных условиях стимулирующего фактора – аCD3.

Таким образом, у пациентов с РА *in vitro* установлена выраженная готовность к раннему апоптозу Т-лимфоцитов, стимулированных аCD3-антителами (CFSE⁺ и CFSE⁻), как относительно исходного уровня апоптоза, так и относительно клеток, находящихся в условиях индукции апоптоза. Перенос клеточных и гуморальных компонентов аутологичной апоптотической «аCD3» и дексаметазон-стимулированной культур активирует некоторые из вариантов раннего апоптоза нормально пролиферирующих клеток, что свидетельствует о высоком уровне активационного апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных РА.

Список литературы / References

1. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н., Новиков А.А. Аутоиммунные ревматические заболевания – проблемы иммунопатологии и персонализированной терапии // Вестник РАМН, 2015. Т. 70, № 2. С. 169-182. [Nasonov E.L., Aleksandrova E.N., Novikov A.A. Autoimmune rheumatic diseases – problems of immunopathology and personalized treatment. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, Vol. 70, no. 2, pp. 169-182. (In Russ.)]
2. Пачкунова М.В. Иммунологический профиль больных ревматоидным артритом // Фундаментальные исследования, 2011. № 1. С. 148-156. [Pachkunova M.V. Immunologic profile sick of rheumatoid arthritis. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2011, no. 1, pp. 148-156. (In Russ.)]
3. Сорока Н.Ф., Свирновский Л.И., Рекун А.Л. Влияние иммуносупрессивных лекарственных препаратов на апоптоз лимфоцитов больных системной красной волчанкой *in vitro* // Научно-практическая ревматология, 2007. № 1. С. 15-21. [Soroka N.F., Svirnovsky A.I., Rekun A.L. Immunosuppressive drugs influence on lymphocyte apoptosis in patients with systemic lupus erythematosus *in vitro*. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2007, no. 1, pp. 15-21. (In Russ.)]
4. Cao Y., Liu J. Impaired apoptosis of peripheral blood CD4⁺T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2015, no. 31 (5), pp. 682-685.
5. Fuchs Y., Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 2011, no. 147 (4), pp. 742-758.
6. Kawamoto Y., Nakajima Y., Kuranaga E. Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, pp. 1-15.
7. Morata, G., Shlevkov E., Perez-Garijo A. Mitogenic signaling from apoptotic cells in *Drosophila*. *Dev. Growth Differ*, 2011, no. 53, pp. 168-176.
8. Pérez-Garijo A., Steller H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development*, 2015, no. 142, pp. 3253-3262.
9. Ryoo H.D., Bergmann A. The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2012, no. 4, pp. 787-789.
10. Sadallah S., Eken C., Schifferli J.A. Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 2011, Vol. 163, pp. 26-32.

11. Szodoray P, Jellestad S., Nakken B. Programmed cell death in rheumatoid arthritis peripheral blood T-cell subpopulations determined by laser scanning cytometry. *Lab. Invest.*, 2003, Vol. 83, no. 12, pp. 1839-1848.
12. Withrow J., Murphy C., Liu Y. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2016, Vol. 18, p. 12.

Авторы:

Абрамова Т.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Цура В.А. — студентка VI курса медико-профилактического факультета ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Блинова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Моренкова А.Ю. — клинический ординатор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

Authors:

Abramova T.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Tsura V.A., Student, Department of Biochemistry, Novosibirsk State Medical University, Russian Federation

Blinova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Morenkova A.Yu., Clinical Intern, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Поступила 27.07.2017
Принята к печати 13.07.2017

Received 27.07.2017
Accepted 13.07.2017

ЧАСТОТА СДВИГОВ ОТ НОРМЫ В СУБПОПУЛЯЦИОННОМ СОСТАВЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯЗВОЙ РОГОВИЦЫ

Куликова И.Г., Балацкая Н.В., Ковалева Л.А., Макаров П.В.

ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. В статье представлена подробная характеристика сдвигов в субпопуляционном составе лимфоцитов крови, ассоциированных с развитием язвенного поражения роговицы, а также при проведении сквозной кератопластики.

Выявлены общие изменения, характерные для пациентов с ЯР и группы СКП, отражающие воспалительную активность: достоверное повышение количества лимфоцитов (CD45⁺), относительного и абсолютного содержания популяции Т-клеток (CD3⁺), субпопуляции CD3⁺CD4⁺, а также В-лимфоцитов (CD19⁺) по сравнению с группой контроля.

Отличительной особенностью группы с СКП явился статистически значимый рост содержания натуральных киллеров CD16⁺CD56⁺.

При анализе средних значений иммунорегуляторного индекса больных с ЯР не обнаружено статистически значимой разницы между исследуемыми клиническими группами. Однако индивидуальное сравнение по характеру и частоте сдвигов CD4⁺/CD8⁺ среди пациентов с «высоким» индексом качественно выделило III группу (ЯР тяжелого течения): тяжелый дисбаланс основных иммунорегуляторных Т-субпопуляций в ней выявлялся в 2,4 раза достоверно чаще, чем в группе пациентов с ЯР легкой степени.

Полученные данные представляются важными для понимания патогенеза ЯР центральной локализации (характера и степени тяжести деструктивных повреждений) и должны приниматься во внимание при прогнозировании, разработке дифференцированного подхода к лечению заболевания.

Ключевые слова: лимфоциты, фенотип, кровь, язвенное поражение роговицы

FREQUENCY OF DEVIATIONS FROM NORMAL VALUES IN THE BLOOD SUBPOPULATIONS' PROFILE IN THE PATIENTS WITH CENTRAL CORNEAL ULCERS

Kulikova I.G., Balatskaya N.V., Kovaleva L.A., Makarov P.V.

Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Abstract. This article presents a detailed description of shifts in subsets of blood lymphocyte subpopulations associated with development of the corneal ulcerative lesions as well as during penetrating keratoplasty.

Адрес для переписки:

Куликова Ирина Геннадьевна
ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт
глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства
здравоохранения РФ
105062, Россия, Москва, ул. Садовая-Черногрязская, 14/19.
Тел.: 8 (926) 386-40-29.
E-mail: ig-kulikova@yandex.ru

Address for correspondence:

Kulikova Irina G.
Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases
105062, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-
Chernogryazskaya str., 14/19.
Phone: 7 (926) 386-40-29.
E-mail: ig-kulikova@yandex.ru

Образец цитирования:

И.Г. Куликова, Н.В. Балацкая, Л.А. Ковалева,
П.В. Макаров «Частота сдвигов от нормы
в субпопуляционном составе крови у пациентов
с центральной язвой роговицы» // Медицинская
иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 263–270.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-263-270

© Куликова И.Г. и соавт., 2018

For citation:

I.G. Kulikova, N.V. Balatskaya, L.A. Kovaleva, P.V. Makarov
“Frequency of deviations from normal values in the blood
subpopulations' profile in the patients with central corneal
ulcers”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 263–270.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-263-270

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-263-270

We have revealed some general changes typical for patients with corneal ulcer and patients with keratoplasty, reflecting inflammatory activity, i.e., a significant increase in the numbers of lymphocytes (CD45⁺), relative and absolute contents of the T-cell population (CD3⁺), CD3⁺ CD4⁺ subpopulation, and B-lymphocytes (CD19⁺), as compared with the control group. A statistically significant increase in natural killer cells (CD16⁺CD56⁺) proved to be a distinctive feature of the group with keratoplasty.

When analyzing mean values of CD4⁺/CD8⁺ cells from the patients with corneal ulcer, there was no statistically significant difference between the clinical groups studied. However, individual comparison of nature and frequency of CD4⁺/CD8⁺ shifts among the patients with «high» index allowed qualitative separation of the third group (severe corneal ulcer): a severe imbalance of main T-cell subpopulations was detected 2.4 times significantly more often than in the group of patients with mild forms of corneal ulcers.

The obtained data are important for understanding pathogenesis of centrally localized corneal ulcer, and should be taken into account when predicting and developing a differentiated approach to the treatment of the disease.

Keywords: lymphocytes, phenotype, blood, corneal ulcer (helcoma)

Введение

Язвы роговицы (ЯР) — тяжелое заболевание глаза, характеризующееся поражением глубоких слоев роговой оболочки (глубже боуменовой мембраны в область стромы, нередко с захватом десцеметовой оболочки, слоя эндотелиальных клеток) вследствие обширного экссудативно-деструктивного воспаления, наличием язвенных образований, лейкоцитарного инфильтрата [4, 8]. ЯР являются одной из причин значительного снижения остроты зрения и слепоты, составляющей в развитых странах от 6,3 до 30%. Известно, что они могут приводить к эндофтальмиту, перфорации роговицы и потере глаза [7, 16]. Деструктивный процесс при ЯР может затрагивать любую часть роговой оболочки, но чаще локализуется в центральной (оптической) зоне (по архивным данным отдела инфекционных и аллергических заболеваний глаз — более чем в 70% случаев), где воспаление протекает тяжело, трудно поддается лечению, а рубцевание в этой области всегда приводит к образованию интенсивного помутнения — бельма, значительно снижающего зрительные функции. Тяжелые ЯР требуют кардинального вмешательства, как правило, оперативного — выполнения кератопластики ([КП] — трансплантации роговицы) [8]. Среди факторов, способствующих развитию заболевания, выделяют два основных — инфекционный фактор и снижение местной (в том числе ослабление поверхностной защиты глаза; нарушение целостности эпителия роговицы) резистентности [4]. Несмотря на успехи и достижения современной медицины, прогноз и лечение центральных ЯР на сегодняшний день представляет большие трудности.

В первую очередь это определяется неполно исследованным патогенезом заболевания, в частности недостаточными и противоречивыми сведениями о вкладе иммунологических факторов (как локальных, так и системных) в развитие язвенных поражений центральной области роговицы.

Считают, что истинно иммунную природу (нарушения аутоиммунной регуляции) имеют краевые кератиты и ЯР (например, язва Мурена) [11].

Вместе с этим, по нашим предварительным данным, системный клеточный ответ на антигены тканей глаза (роговицы и/или хрусталика, увеа, сетчатки) выявляется почти в трети случаев при центральной инфекционной ЯР и коррелирует с ее тяжестью [3].

Эти наблюдения предполагают определенный вклад аутоиммунного компонента в воспалительную деструкцию при центральных ЯР, позволяют рассматривать органоспецифическую сенсибилизацию как серьезный фактор риска развития прогрессирования и осложнения течения заболевания. Известно, что активации и развитию иммунного ответа на антигены собственных тканей могут способствовать разнообразные нарушения в функционировании иммунной системы организма, в том числе в субпопуляционном составе лимфоцитов [9].

Однако данный вопрос при развитии ЯР центральной локализации, разных клинических вариантах течения заболевания остается практически неизученным.

Цель: анализ содержания основных субпопуляций лимфоцитов в крови больных с центральной ЯР в зависимости от степени тяжести течения заболевания.

Материалы и методы

Обследовано 192 пациента в возрасте от 18 до 85 лет (76 женщин и 116 мужчин) с ЯР центральной локализации. Основанием для этиологической диагностики ЯР служили данные анамнеза, клинические признаки, выявленные при биомикроскопии, и лабораторные методы исследования. На основании разработанных в отделе инфекционных и аллергических заболеваний глаз ФГБУ «МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава РФ [2] критериев оценки степени тяжести течения ЯР, были сформированы 4 группы больных: I-я — ЯР легкой степени тяжести (с инфильтратами до 3 мм в диаметре,

площадь изъязвления до 1/4 площади роговицы и глубиной изъязвления не более 1/3 толщины стромы роговицы) – 21 пациент, II-я группа – средняя степень тяжести заболевания (с инфильтратами от 3 до 5 мм в диаметре, изъязвлением от 1/4 до 1/2 площади роговицы и глубиной не более 2/3 толщины стромы роговицы) – 81 человек; у 55 пациентов, составивших III-ю группу, ЯР относились к тяжелой степени (с инфильтратами более 5 мм в диаметре, изъязвлением более 1/2 площади роговицы и глубиной до десцеметовой оболочки). В IV-ю группу вошли 35 больных с тяжелой ЯР и оперативным вмешательством – пересадкой роговицы (сквозная кератопластика [СКП]), из них 18 пациентам выполнялась повторная СКП. Контрольную группу составили 33 практически здоровых донора соответствующего возраста и пола.

Материалом исследования служили пробы цельной крови, взятой из локтевой вены натощак в утренние часы (с 9.00-10.00 ч) при помощи вакуумных систем в пробирки Vacuette® с антикоагулянтом К3ЕДТА. Иммунофенотипирование проведено методом лазерной цитофлуориметрии на проточном цитометре BD FACS Canto II (BectonDickinson, США) с использованием системы моноклональных антител Multitest 6-Color TBNK Reagent в пробирках BD Tru Count (BectonDickinson, США). Для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов использовался лизирующий раствор BD FACS TM Lysing Solution (BectonDickinson, США). Относительное и абсолютное содержание популяций и субпопуляций лимфоцитов определялось в программе Canto (Becton Dickinson, США), с выделением анализируемого региона по общей популяции, экспрессирующей CD45⁺ антиген и по гранулярности клеток (CD45⁺PerCP-Cy5,5*/SSC); использовались меченные флуорохромами антитела CD3⁺(FITC), CD4⁺(PE-Cy7*), CD8⁺(APC-Cy7*), CD16⁺/56⁺(PE), CD19⁺(APC*), позволяющие дифференцировать клетки: Т-лимфоциты (CD3⁺), Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺CD8⁻), Т-цитотоксические (CD3⁺CD4⁻CD8⁺), Т-дубль-позитивные (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), NK-клетки – натуральные киллеры (CD16⁺CD56⁺), В-лимфоциты (CD19⁺), вычислить соотношение субпопуляций CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺, отражающее баланс Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток (CD4⁺/CD8⁺).

Статистическая обработка данных и вариационный анализ выполнены в программах Biostatd, Excel (M – среднее значение, σ – среднее квадратическое отклонение; t – критерий Стьюдента); уровень статистической значимости: p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Данные иммунофенотипирования основных субпопуляций лимфоцитов крови больных с цен-

тральной язвой роговицы в сравнении с контролем представлены в таблице 1.

При анализе результатов исследования во всех клинических группах пациентов с ЯР выявлено статистически значимое повышение абсолютного количества лимфоцитов (CD45⁺) по сравнению с группой здоровых, а также достоверный рост общей популяции Т-клеток (относительно и абсолютного содержания).

В I-й группе (ЯР легкой степени течения) среди популяции Т-лимфоцитов было обнаружено статистически значимое увеличение содержания Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), как абсолютного, так и процентного, послужившее причиной значительного повышения CD4⁺/CD8⁺ (p < 0,05). Кроме того, в группе с ЯР легкой степени отмечен достоверный рост абсолютного количества В-лимфоцитов (CD19⁺) по сравнению с таковым в группе здоровых добровольцев без офтальмопатологии. Характерным для I-й группы стало существенное статистически значимое снижение абсолютного и относительного содержания натуральных киллеров (CD16⁺CD56⁺).

При исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов крови пациентов с ЯР средней степени тяжести (II группа) выявлено достоверное значительное повышение абсолютного количества общей популяции Т-клеток и их субпопуляции CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов – хелперов, а также В-лимфоцитов (p < 0,05). В этой же группе сохранялась тенденция к снижению абсолютного и относительного содержания NK (CD16⁺CD56⁺).

Отличительной особенностью II группы (ЯР средней тяжести течения) явилось статистически значимое повышение абсолютного количества Т-цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) по сравнению с группой здоровых доноров без офтальмопатологии.

Деструктивный процесс глубоких слоев роговой оболочки и развитие осложнений при ЯР тяжелого течения (III-я группа) сопровождались дальнейшими значительными сдвигами в субпопуляционном составе лимфоцитов крови с тенденцией к повышению индекса CD4⁺/CD8⁺: направление динамики относительного и абсолютного содержания иммунокомпетентных клеток в целом было аналогичным таковому в I и II группах. Характерным для III-й группы (ЯР тяжелого течения) больных стало статистически значимое повышение абсолютного количества Т-дубль-позитивных лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD8⁺).

Наиболее значительные изменения были выявлены в IV группе больных с СКП: в первую очередь, это существенный рост абсолютного количества лимфоцитов (CD45⁺), Т-лимфоцитов (CD3⁺) и субпопуляции Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), прогрессивное усугубление дисбаланса в системе Т-клеток – значительное повышение

ТАБЛИЦА 1. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ С ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯЗВОЙ РОГОВИЦЫ (M±σ)

TABLE 1. PHENOTYPIC CONTENTS OF BLOOD LYMPHOCYTES IN HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH CENTRAL CORNEAL ULCERS (M±σ)

Показатель Factors		Контрольная группа Control group (n = 33)	Группы Groups			
			I	II	III	IV
		Степень тяжести ЯР Severity of central corneal ulcers				
		легкая mild (n = 21)	средняя medium (n = 81)	тяжелая severe (n = 55)	СКП keratoplasty (n = 35)	
Лимфоциты CD45 ⁺ Lymphocytes CD45 ⁺	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	2,06±0,11	2,4±0,16	2,63±0,1*	2,49±0,13*	2,79±0,24*
Т-лимфоциты об- щая популяция CD3 ⁺ T lymphocytes (total population) CD3 ⁺	%	73,1±0,87	76,5±1,28*	75,11±0,78	75,24±0,84	70,39±1,29
	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	1,51±0,08	1,85±0,14*	1,97±0,07*	1,88±0,1*	1,99±0,04*
Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺ T helpers CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	45,7±1,19	51,4±1,57*	48,7±0,78	50,3±0,07*	47,09±1,28
	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	0,97±0,06	1,27±0,11*	1,28±0,05*	1,24±0,07*	1,3±0,11*
Т-цитотоксические CD3 ⁺ CD8 ⁺ T cytotoxic CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	25,6±1,04	22,8±1,21	24,5±0,82	23,4±0,84	21,69±1,14
	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	0,52±0,03	0,57±0,044	0,65±0,03*	0,58±0,04	0,67±0,08
Т-«дубль-позитив- ные» лимфоциты CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ «double-positive» lymphocytes CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	%	0,54±0,31	1,02±0,22	0,7±0,06	0,8±0,07	0,92±0,19
	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	0,009±0,007	0,025±0,006	0,018±0,002	0,02±0,002*	0,027±0,005*
В-лимфоциты CD19 ⁺ B lymphocytes CD19 ⁺	%	12,8±0,63	14,4±0,802	14,9±0,62	15,06±0,69 *	13,9±1,02
	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	0,24±0,02	0,34±0,03*	0,41±0,03*	0,39±0,03*	0,39±0,05*
Натуральные кил- леры CD16 ⁺ CD56 ⁺ Natural killers CD16 ⁺ CD56 ⁺	%	14±0,87	8,6±1,01**	9,5±0,51**	9,12±0,69**	14,7±1,08
	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	0,29±0,03	0,19±0,02**	0,23±0,01**	0,21±0,01**	0,37±0,03
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	рассч.ед. conventional unit	1,95±0,12	2,47±0,18*	2,45±0,22	2,8±0,32	2,6±0,19*

Примечание. n – количество обследуемых в группе; * – достоверность различия параметров у больных исследуемых групп по сравнению с группой контроля (p < 0,05); # – достоверность различия параметров у больных исследуемых групп по сравнению с группой после пересадки роговицы (p < 0,05).

Note. n, number of experimental subjects in the group; *, the differences in study group in comparison with control are significant by p < 0.05; # – the differences in study group in comparison with the group after corneal transplantation are significant by p < 0.05.

CD4⁺/CD8⁺. Содержание двойных позитивных Т-клеток (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) статистически значимо в три раза превышало таковое в контрольной группе здоровых.

Отличительной особенностью IV группы было достоверное значительное повышение абсолютного и процентного количества NK-клеток в крови пациентов, перенесших СКП, по сравнению с остальными клиническими группами.

В ходе исследования был проведен сравнительный анализ частоты случаев выявления характерных сдвигов в субпопуляционном составе лимфоцитов и повышения CD4⁺/CD8⁺ у пациентов исследуемых клинических групп (рис. 1).

В 27% случаев при ЯР легкой степени отмечено повышение содержания лимфоцитов (CD45⁺), в 23% — рост основной популяции Т-клеток (CD3⁺) и Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), у трети обследованных больных этой группы высокие значения CD4⁺/CD8⁺ и повышение количества Т-дубль-позитивных лимфоцитов CD3⁺CD4⁺CD8⁺ (31% случаев) (рис. 1А)

ЯР средней степени течения (II группа) характеризовались дальнейшим увеличением частоты случаев повышения содержания лимфоцитов (CD45⁺) (35%), цитотоксических Т-клеток (CD3⁺CD8⁺) (у 35% больных II-й группы против 15% I-й; $p < 0,05$), а также В-лимфоцитов (с 8% случаев в I-й группе до 22% во II-й). В этой же группе более чем в 2 раза возрастало количество пациентов (с 5% в группе с ЯР легкой степени течения до 11% во II группе) со значительным снижением содержания в крови NK-лимфоцитов (CD16⁺CD56⁺). Повышенные значения CD4⁺/CD8⁺ встречались у 30% пациентов (рис. 1Б).

Динамика случаев сдвигов показателей клеточного иммунного статуса, описанная во II-й группе больных, в целом сохранялась при ЯР тяжелой степени, за исключением Т-дубль-позитивных лимфоцитов CD3⁺CD4⁺CD8⁺, повышенное содержание этой субпопуляции отмечено в крови 37% пациентов с тяжелыми язвенными поражениями роговицы (рис. 1В).

В IV группе больных (СКП) повышение CD4⁺/CD8⁺ выявлено уже практически в половине случаев. Следует отметить, что только в группе пациентов с СКП (у 13 % больных) встретились случаи повышения количества NK-лимфоцитов (CD16⁺CD56⁺), не обнаруженные более ни в одной из клинических групп (рис. 1Г).

Таким образом, как при общем, так и при дифференцированном анализе данных были выявлены нарушения в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови пациентов с ЯР различной степени тяжести течения заболевания, а также в группе с СКП; при этом изменение клинической картины (от ЯР легкой степени к усилению деструктивного процесса с развитием осложнений) ассоциировалось с нарастанием

частоты случаев характерных иммунологических сдвигов (рис. 1).

В целом во всех клинических группах пациентов, страдавших ЯР, по сравнению с группой здоровых, имело место статистически значимое повышение общего содержания лимфоцитов, абсолютного количества общей популяции Т-лимфоцитов (CD3⁺), отражающее воспалительную активность, наиболее выраженную в группах с ЯР средней степени тяжести и СКП, что согласуется с данными литературы, отмечающими активацию лимфоцитарного звена при инфекционной нагрузке, а также в условиях трансплантации.

Увеличение абсолютного количества популяции Т-хелперов, послужившего причиной достоверного повышения CD4⁺/CD8⁺ у трети больных с ЯР различной степени тяжести и практически в половине случаев в группе пациентов с СКП (по сравнению с группой здоровых доноров) свидетельствует о развитии дисбаланса субпопуляций Т-клеток у этой части пациентов.

Известно, что доминирование популяции CD3⁺CD4⁺ способствует развитию иммунного ответа, в том числе и на аутоантигены. Прямая взаимосвязь повышения CD4⁺/CD8⁺ и активации системного клеточного ответа на антигены тканей глаза была показана в работах при воспалительной офтальмопатологии [6].

Сравнительный анализ средних значений CD4⁺/CD8⁺ пациентов с ЯР не выявил статистически значимой разницы между исследуемыми клиническими группами. Однако индивидуальный сравнительный анализ по характеру и частоте индекса среди пациентов с высоким CD4⁺/CD8⁺ между клиническими группами качественно выделил III-ю группу (ЯР тяжелого течения) и показал в ней достоверное, в 2,4 раза чаще выявляемое значительное повышение CD4⁺/CD8⁺ (от 4,0 до 8,5), чем в группе пациентов с ЯР легкой степени (табл. 2).

Известно, что наряду с основными, достаточно хорошо изученными субпопуляциями (CD3⁺CD4⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺CD8⁺) в крови человека, могут обнаруживаться дубль-позитивные Т-клетки, характеризующиеся как лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD8⁺. К настоящему времени установлено, что дубль-позитивные Т-лимфоциты являются высокодифференцированными клетками памяти [15].

Накоплено достаточное количество данных, рассматривающих CD3⁺CD4⁺CD8⁺ как возможный показатель развития аутоиммунных процессов, но единого мнения по этому вопросу не достигнуто [9].

Отмеченное нами повышение содержания дубль-позитивных Т-клеток у всех больных и особенно их абсолютного количества при тяжелом течении (III-я группа) ЯР и группе с СКП, согласуется с данными Parel Y. и соавт. (2007),

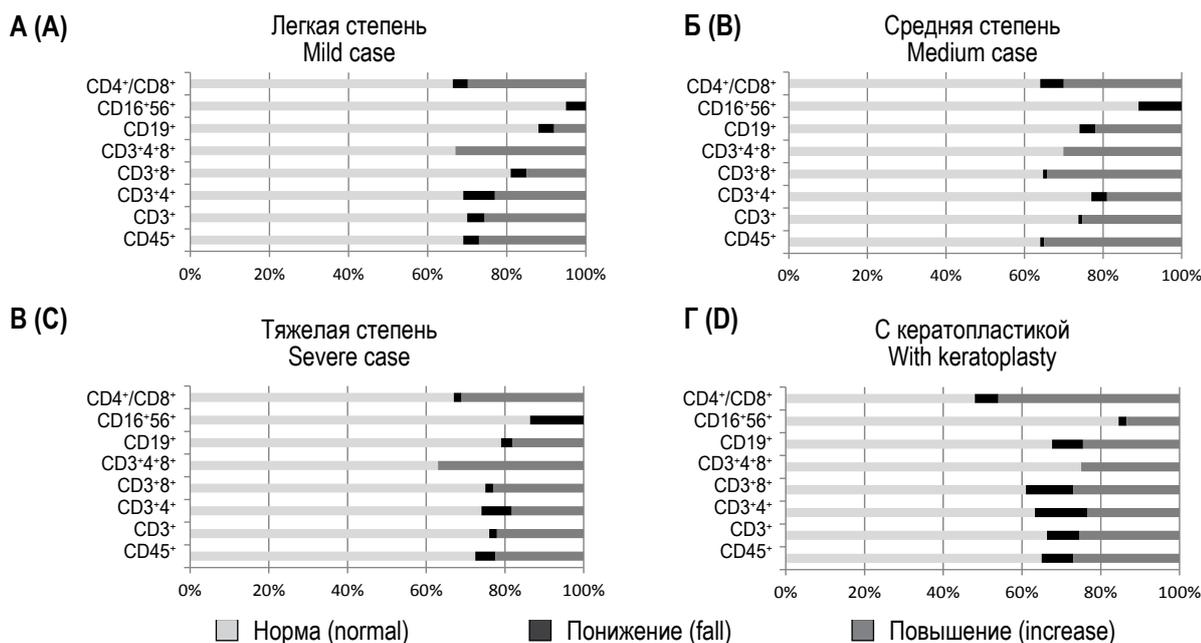


Рисунок 1. Частота сдвигов от нормы в субпопуляционном составе крови у пациентов с центральной язвой роговицы

Примечание. По оси абсцисс – частота сдвигов (относительные значения); по оси ординат – абсолютное количество субпопуляций.

Figure 1. Frequency of deviations from normal values in the blood subpopulations' profile in the patients with central corneal ulcers
Note. Abscissa, frequency of abnormal shifts (relative content); Ordinate, absolute number of a subpopulation.

Armengol M.P. и соавт. (2008), И.В. Кудрявцева и соавт. (2014), показавшими увеличение содержания этой минорной субпопуляции у пациентов с аутоиммунными заболеваниями [5, 10, 17].

Помимо Т-цитотоксических лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$), субпопуляцию $CD3^+CD4^+CD8^+$ клеток рассматривают в аспекте защиты от инфекций. Есть сведения об увеличении $CD4^+CD8^+$ лимфоцитов в периферической крови при инфекционном мононуклеозе, ВИЧ-инфекции и др. Считают, что дубль-позитивные Т-лимфоциты могут иметь большое значение в реакциях адаптивного иммунитета в ответ на различные инфекционные агенты [15]. Увеличение частоты случаев повышения как $CD3^+CD8^+$ (достоверное во II-й группе), так и $CD3^+CD4^+CD8^+$ субпопуляций в крови пациентов с центральной ЯР может служить доказательством иммунного ответа на присутствие инфекционных возбудителей, которое было подтверждено перед лечением у всех больных специальными лабораторными методами (бактериологическими и серологическими при определении этиологии язвенного процесса).

Относительное и абсолютное количество популяции НК в крови больных с ЯР I-III клинической групп было значительно ниже, а В-лимфоцитов – выше нормы. В целом такая динамика характерна при инфекционных заболеваниях, и наши результаты согласуются с данными работ, в частности Алексеевой Л.А. и соавт., продемонстрировавшими накопление $CD19^+$ (В-лимфоцитов) в системном кровотоке

и активную миграцию $CD16^+CD56^+$ лимфоцитов (НК-клеток) в очаг воспаления при вирусных и бактериальных менингитах, Liu F. и соавт., обнаружившими снижение популяции циркулирующих натуральных киллеров и ослабление их функциональной активности при вирусном гепатите В [1, 12].

Подобную динамику для НК-клеток (миграцию из системного кровотока и вторичных лимфоидных органов на периферию в очаг воспаления) описали Liu Q. и соавт. при экспериментальной травме роговицы у мышей [13].

Относительное содержание натуральных киллеров в крови пациентов группы с СКП было достоверно выше, чем в основных группах с ЯР, помимо этого, абсолютное количество этой субпопуляции превышало таковое в группе здоровых доноров. Следует отметить, что IV-я группа отличалась от остальных клинических групп: ее составили пациенты с наиболее тяжелыми поражениями роговицы, которым была выполнена кератопластика, при этом практически половине из них – 18 больным – поведены повторные трансплантации (2 и более раза).

Субпопуляция $CD16^+CD56^+$ лимфоцитов (НК-клеток) в последнее время активно изучается в трансплантологии (в частности в плане отторжения трансплантата). Полученные нами результаты для группы с СКП находят косвенное подтверждение в работах López-Botet M. и соавт., посвященных изучению роли натуральных киллеров в выживании почечных трансплантатов,

ТАБЛИЦА 2. ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ХАРАКТЕРА И ЧАСТОТЫ СДВИГОВ CD4⁺/CD8⁺ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ВЫСОКИМИ ЗНАЧЕНИЯМИ CD4⁺/CD8⁺ ИССЛЕДУЕМЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ГРУПП С ЯР (%)

TABLE 2. INDIVIDUAL ANALYSIS OF CHARACTERISTICS AND FREQUENCY OF SHIFTS CD4⁺/CD8⁺ AMONG PATIENTS WITH HIGH CD4⁺/CD8⁺ VALUES IN DISTINCT CLINICAL GROUPS WITH CORNEAL ULCERS (%)

Диапазон повышения CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Range of CD4 ⁺ /CD8 ⁺ increase	Группы Groups			
	I	II	III	IV
	Степень тяжести ЯР Severity of central corneal ulcers			
	легкая mild (n = 8)	средняя medium (n = 28)	тяжелая severe (n = 20)	СКП keratoplasty (n = 24)
незначительное ↑ minor [2,5-3,0]	37,5	35,7	35	42
умеренное ↑↑ moderate [3,0-3,9]	50	46,3	35	37
значительное ↑↑↑ major [4,0-8,5]	12,5	17,8	30*	21

Примечание. n – количество пациентов с повышенными значениями CD4⁺/CD8⁺ в группе; * – достоверность различия частоты повышения CD4⁺/CD8⁺ у больных I-й группы по сравнению с III-й (p < 0,05).

Note. n, number of patients with high values of CD4⁺/CD8⁺ in the group; *, the differences in frequency of CD4⁺/CD8⁺ rise between the first third group are significant by p < 0.05.

а также Schwartzkopff J. и соавт., исследовавших субпопуляцию CD16⁺CD56⁺ при пересадке роговицы в условиях эксперимента [14,18].

Таким образом, в результате проведенных исследований представлена характеристика сдвигов в субпопуляционном составе лимфоцитов крови, ассоциированных с развитием язвенных поражений роговицы при легком, среднем и тяжелом

течении заболевания, а также при проведении сквозной кератопластики. Полученные данные представляются важными для понимания патогенеза ЯР центральной локализации (характера и степени тяжести деструктивных повреждений) и должны приниматься во внимание при прогнозировании, разработке дифференцированного подхода к лечению заболевания.

Список литературы / References

1. Алексеева Л. А., Железникова Г.Ф., Жирков А.А., Скрипченко Н.В., Вильниц А.А., Монахова Н.Е., Бессонова Т.В. Субпопуляции лимфоцитов и цитокины в крови и цереброспинальной жидкости при вирусных и бактериальных менингитах // Инфекция и иммунитет, 2016. Т. 6, № 1. С. 33-44. [Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Zhirkov A.A., Skripchenko N.V., Vilnits A.A., Monakhova N.E., Bessonova T.V. Lymphocyte subsets and cytokines in blood and cerebrospinal fluid in children with viral and bacterial meningitis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, Vol. 6, no. 1, pp. 33-44. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2016-1-33-44.
2. Арестова Н.Н., Бржеский В.В., Вахова Е.С., Яни Е.В. Клиника, диагностика и консервативная терапия бактериальных язв роговицы // Федеральные клинические рекомендации. М., 2014. С. 16. [Arestova N.N., Brzhesky V.V., Vakhova E.S., Yani E.V. Clinic, diagnosis and conservative therapy of bacterial corneal ulcers. Federal clinical guidelines]. Moscow, 2014, p. 16.
3. Ковалева Л.А., Слепова О.С., Куликова И.Г., Миронкова Е.А. Роль аутоиммунного компонента при центральных язвах роговицы // Российский офтальмологический журнал, 2013. № 2. С. 29-31. [Kovaleva L.A., Slepova O.S., Kulikova I.G., Mironkova E.A. The role of the autoimmune component in central corneal ulcers. *Rossiyskiy oftalmologicheskii zhurnal = Russian Journal of Ophthalmology*, 2013, no. 2, pp. 29-31. (In Russ.)]
4. Копаева В.Г. Глазные болезни. М.: Медицина, 2002. С. 200-244. [Kopayeva V.G. Eye diseases]. Moscow: Medicine, 2002, pp. 200-244.
5. Кудрявцев И.В., Захарова Г.А., Гапонова Т.В. Исследование основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток при ревматоидном артрите // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 2 (1). С. 89-92. [Kudryavtsev I.V., Zakharova G.A., Gaponova T.V. Investigation of the main subpopulations of T-helpers and cytotoxic T cells in rheumatoid arthritis. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 2 (1), pp. 89-92. (In Russ.)]

6. Куликова И.Г., Слепова О.С., Макаров П.В., Ковалева Л.А., Кугушева А.Э. Роль (суб)популяционного дисбаланса лимфоцитов крови в развитии системной органоспецифической сенсибилизации при воспалительной и посттравматической патологии глаз // Российский офтальмологический журнал, 2013. Т. 6, № 4. С. 71-75. [Kulikova I.G., Slepova O.S., Mironkova E.A., Makarov P.V., Kugusheva A.E., Kovaleva L.A. The role of (sub) populational imbalance of blood lymphocytes in development of systemic organ-specific sensitization in inflammatory and posttraumatic eye diseases. *Rossiyskiy oftalmologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Ophthalmology*, 2013, Vol. 6, no. 4, pp. 71-75. (In Russ.)]
7. Майчук Ю.Ф. Терапевтические алгоритмы при инфекционных язвах роговицы // Вестник офтальмологии, 2000. № 3. С. 35-37. [Maychuk Yu.F. Therapeutic algorithms for corneal infectious ulcers. *Vestnik oftalmologii = Bulletin of Ophthalmology*, 2000, no. 3, pp. 35-37. (In Russ.)]
8. Ченцова Е.В., Вериги Е.Н., Хазамова А.И., Яни Е.В. Современные аспекты лечения язвенных поражений роговицы // Евразийский союз ученых, 2016. № 2-2 (23). С. 99-105. [Chentsova E.V., Verigo E.N., Khazamova A.I., Yani E.V. Modern aspects of the treatment of corneal ulcerations. *Evraziyskiy soyuz uchenykh = Eurasian Union of Scientists*, 2016, no. 2-2 (23), pp. 99-105. (In Russ.)]
9. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. С. 314-332, 588-624. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010, pp. 314-332, 588-624.
10. Armengol M.P., Sabater L., Fernandez M. Influx of recent thymic emigrants into autoimmune thyroid disease glands in humans. *Clinical and Experimental Immunology*, 2008, Vol. 153, pp. 338-350.
11. Kafkala C., Choi J., Zafirakis P., Baltatzis S., Livir-Rallatos C., Rojas B., Foster C.S. Mooren ulcer: an immunopathologic study. *Cornea*, 2006, Vol. 25, no. 6, pp. 667-673.
12. Liu F., Duan X., Wan Z., Zang H., You S., Yang R., Liu H., Li D., Li J., Zhang Y., Xin S. Lower number and decreased function of natural killer cells in hepatitis B virus related acute-on-chronic liver failure. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, 2016, Vol. 40, no. 5, pp. 605-613.
13. Liu Q., Smith C.W., Zhang W., Burns A.R., Li Z. NK cells modulate the inflammatory response to corneal epithelial abrasion and thereby support wound healing. *Am. J. Pathol.*, 2012, Vol. 181, no. 2, pp. 452-462.
14. López-Botet M., Vilches C., Redondo-Pachón D., Muntasell A., Pupuleku A., Yélamos J., Pascual J., Crespo M. Dual role of natural killer cells on graft rejection and control of cytomegalovirus infection in renal transplantation. *Front. Immunol.*, 2017, no. 8, p. 166.
15. Nascimbeni M., Shin E.C., Chiriboga L., Kleiner D.E., Rehmann B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood*, 2004, Vol. 104, no. 2, pp. 478-486.
16. Nurozler A.B., Salvarli S., Budak K. Results of therapeutic penetrating keratoplasty. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 2004, Vol. 48, no. 4, pp. 368-371.
17. Parel Y., Aurrand-Lions M., Scheja A. Presence of CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis. Rheum.*, 2007, Vol. 56, pp. 3459-3467.
18. Schwartzkopff J., Schlereth S.L., Berger M., Bredow L., Birnbaum F., Böhringer D., Reinhard T. NK cell depletion delays corneal allograft rejection in baby rats. *MolVis*, 2010, no. 16, pp. 1928-1935.

Авторы:

Куликова И.Г. — старший научный сотрудник, отдел иммунологии и вирусологии ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Балацкая Н.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, отдел иммунологии и вирусологии ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ковалева Л.А. — научный сотрудник, отдел инфекционных и аллергических заболеваний глаз ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Макаров П.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, отдел травматологии, реконструктивной, пластической хирургии и глазного протезирования ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Kulikova I.G., Senior Research Associate, Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Balatskaya N.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Kovaleva L.A., Research Associate, Department of Infectious and Allergic Eye Diseases, Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Makarov P.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Traumatology, Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Disease, Moscow, Russian Federation

Поступила 10.05.2017

Отправлена на доработку 19.06.2017

Принята к печати 12.10.2017

Received 10.05.2017

Revision received 19.06.2017

Accepted 12.10.2017

ИЗУЧЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА, ИНДУЦИРОВАННОГО ВАКЦИНОЙ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ Ag85, TB10 И FliC

Еремеев В.В.¹, Духовлинов И.В.², Орлов А.И.², Шепелькова Г.С.¹, Федорова Е.А.², Балазовский М.Б.³, Гергерт В.Я.¹

¹ ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ЗАО «Фарма ВАР», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Вот уже около ста лет БЦЖ остается единственной широко используемой противотуберкулезной вакциной. Известно, что интенсивность индуцированного БЦЖ иммунного ответа по типу Th1 со временем снижается и сходит на нет в течение 10-15 лет. Это существенно отличает БЦЖ от вакцин, обеспечивающих пожизненную протекцию, таких как вакцины против полиомиелита или кори, и может быть связано с естественным ограничением длительности персистенции индуцированных БЦЖ CD4⁺T-клеток. Накапливаются данные о недостаточной способности БЦЖ стимулировать длительную иммунологическую память. Ранее в нашей лаборатории на модели заражения лабораторных мышей относительно резистентной к туберкулезу линии С57BL/6 вирулентным лабораторным штаммом *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) H37Rv по результатам определения высеваемости бактерий из органов и продолжительности жизни животных после заражения была продемонстрирована высокая (сравнимая с BCG Russia) протективная активность трех субъединичных вакцинных препаратов. Целью настоящей работы было изучение характеристик и длительности иммунного ответа, индуцируемого наиболее эффективным из этих препаратов. Группы мышей С57BL/6 вакцинировали внутримышечно два раза с двухнедельными интервалами 10 мкг белка, конъюгированного с 200 мкл эмульсии гидроксида алюминия. Мониторинг иммунного ответа (продукция специфических антител, стимулированная вакцинным белком продукция интерферона-гамма и пролиферация) осуществляли на протяжении 10 месяцев после вакцинации. Установлено, что испытуемый препарат стимулирует у мышей формирование длительной иммунологической памяти к бактериальному антигену. При этом добавление глутоксима смещает спектр иммунологической памяти к «протективно-му» типу, т.е. стимулирует преобладание клеточного компонента иммунного ответа над гуморальным. Следующим этапом исследования данной вакцины будет изучение эффективности ее применения для ревакцинации после первичной иммунизации БЦЖ.

Ключевые слова: туберкулез, вакцина, иммунологическая память

Адрес для переписки:

Еремеев Владимир Витальевич
ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
E-mail: yeremeev56@mail.ru

Address for correspondence:

Yeremeev Vladimir V.
Central Tuberculosis Research Institute
107564, Russian Federation, Moscow, Yauzskaya al., 2.
Phone: 7 (499) 785-90-72.
E-mail: yeremeev56@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Еремеев, И.В. Духовлинов, А.И. Орлов, Г.С. Шепелькова, Е.А. Федорова, М.Б. Балазовский, В.Я. Гергерт «Изучение продолжительности иммунного ответа, индуцированного вакциной на основе рекомбинантных белков Ag85, TB10 и FliC» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 271-276. doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-271-276
© Еремеев В.В. и соавт., 2018

For citation:

V.V. Yeremeev, I.V. Dukhovlinov, A.I. Orlov, G.S. Shepelkova, E.A. Fedorova, M.B. Balazovsky, V.Ya. Gergert "Duration of immune response induced by the vaccine based on recombinant Ag85, TB10 and FliC proteins", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 271-276. doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-271-276

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-271-276

DURATION OF IMMUNE RESPONSE INDUCED BY THE VACCINE BASED ON RECOMBINANT Ag85, TB10 AND FliC PROTEINS

Yeremeev V.V.^a, Dukhovlinov I.V.^b, Orlov A.I.^b, Shepelkova G.S.^a, Fedorova E.A.^b, Balazovsky M.B.^c, Gergert V.Ya.^a

^a Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c Pharma VAM, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Already about one hundred years BCG remains the only widely used tuberculosis (TB) vaccine. It is known that intensity of the BCG-induced Th1 immune response decreases over time and comes to naught within 10-15 years. It significantly distinguishes BCG from the vaccines providing a lifelong protection such as vaccines against poliomyelitis or measles, and can be bound to natural restriction of duration of a persistence of the BCG-induced CD4⁺ T-cells. Data on insufficient ability of BCG to stimulate life-long immunological memory is accumulating. Earlier in our lab on the model of rather resistant to TB C57BL/6 mice infection with the virulent laboratory strain of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) H37Rv protective activity (comparable to that of BCG Russia) of 3 subunit vaccine variants was demonstrated as assessed by lung and spleen CFU counts and life span of animals after infection. The aim of this study was to study the characteristics and duration of the immune response induced by the most effective variant of these vaccines. Groups of C57BL/6 mice were vaccinated intramuscularly twice with two-week intervals with 10 µg protein conjugated to 200 µl of an aluminum hydroxide emulsion. Immune response (production of specific antibodies, vaccine protein-stimulated production of interferon gamma and proliferation in vitro) was monitored during 10 months after vaccination. We have shown that the test vaccine induces in mice the formation of long-term immunological memory to a bacterial antigen. Moreover, in the presence of glutoxim the immunological memory spectrum shifts to a "protective" type, i.e. the predominance of the cellular component of the immune response over the antibody response is stimulated. The next step will be the investigation of vaccine effectiveness for revaccination after primary BCG immunization.

Keywords: tuberculosis, vaccine, immune memory

Введение

Вот уже около ста лет BCG остается единственной широко используемой противотуберкулезной вакциной. Известно, что интенсивность индуцированного BCG иммунного ответа по типу Th1 со временем снижается и сходит на нет в течение 10-15 лет. Это существенно отличает BCG от вакцин, обеспечивающих пожизненную протекцию, таких как вакцины против полиомиелита или кори, и может быть связано с естественным ограничением длительности персистенции индуцированных BCG CD4⁺T-клеток. Однако накапливаются данные о недостаточной способности BCG стимулировать длительную иммунологическую память. Прямое сравнение особенностей и длительности иммунологической памяти, индуцированной BCG в сравнении с субъединичной вакциной H1/CAF01 (синтетический белок на основе генетической конструкции из Ag85B и ESAT-6, применяется с адьювантом из липосом) у мышей, показало, что в то время как субъединичная вакцина эффективно поддерживает генерацию T-клеток центральной памяти (TCM) в течение 2 лет после вакцинации, при вакцинации BCG экспрессия TCM транзиторна, напротив, индуцируется форми-

рование эффекторных T-клеток памяти (TEM), активно продуцирующих IFN γ и TNF α [9]. Подобная картина наблюдается и при хроническом течении туберкулеза у мышей. На этом фоне буст субъединичной вакциной поддерживает значительную популяцию TCM в инфицированных органах, в то время как инъекция BCG таким животным стимулирует ответ по типу терминально-дифференцированных эффекторных T-клеток и неспособность контролировать размножение микобактерий [10]. В полном соответствии с данным наблюдением находится тот факт, что нарушение выхода TCM из лимфоузлов не влияет на индуцируемую BCG протекцию, что указывает на преимущественную направленность T-клеточного ответа на BCG в сторону тканеворезидентных TEM и T-эффекторов [4]. Таким образом, недостаточная стимуляция формирования долгоживущих TEM, возможно, является одним из основных недостатков BCG [10, 12]. Действительно, в недавно проведенном исследовании результатов вакцинации БЦЖ у новорожденных было установлено, что несмотря на то, что активированные вакцинацией T-клетки имеют фенотип, близкий к TCM, их цитокиновый профиль (преимущественная продукция IFN γ) и снижен-

ная пролиферативная активность обуславливают их функциональное сходство с эффекторными Т-клетками [14].

В предыдущем исследовании в нашей лаборатории на модели заражения лабораторных мышей относительно резистентной к туберкулезу линии C57BL/6 вирулентным лабораторным штаммом *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) H37Rv по результатам определения высеваемости бактерий из органов и продолжительности жизни животных после заражения была продемонстрирована высокая (сравнимая с BCG Russia) протективная активность трех субъединичных вакцинных препаратов [2]. **Целью настоящей работы** было изучение характеристик и длительности иммунного ответа, индуцируемого наиболее эффективным из этих препаратов.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на мышах линии C57BL/6JCit (B6), содержащихся в виварии ФГБНУ «ЦНИИТ» в условиях неограниченного доступа к воде и пище. Параметры содержания мышей и проводимых экспериментов соответствовали нормам, установленным в приказе № 755 МЗ РФ. Были использованы самки мышей B6, достигшие возраста 2-3 мес. к началу эксперимента.

Основная композиция представляет собой сочетание вариантов химерного белка на основе Ag85B-TB10.4-FliC и плазмидной ДНК, кодирующей антиген Ag85A Mtb. Химерный белок Ag85B-TB10.4-FliC получали с использованием штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21, трансформированного векторной плазмидой pet28a-Ag85B-TB10.4-FliC. Плазмидную ДНК получали с использованием штамма *Escherichia coli* DH10/B, трансформированного векторной плазмидой pEXag85A. В состав второй композиции дополнительно включен глутоксим, обладающий, по нашим данным, активирующим влиянием на макрофаги мышей [1].

Группы по 15 мышей (2 группы животных соответственно каждой композиции) B6 вакцинировали внутримышечно два раза с двухнедельными интервалами 10 мкг белка, конъюгированного с 200 мкл эмульсии гидроксида алюминия. Мышам контрольной группы вводили 200 мкл эмульсии гидроксида алюминия (отрицательный контроль). Положительный контроль — мыши, однократно иммунизированные 10e5 КОЕ живой вакцины BCG (штамм Russia).

Через 1,5; 3,5; 6,25 и 9,75 мес. после вакцинации у 4-5 мышей из группы брали кровь на сыворотку, а после умерщвления цервикальной дислокацией у тех же 4-5 мышей из группы забирали селезенку и лимфоузлы. Полученные органы тщательно растирали в стеклянных гомогенизаторах и выделяли лимфоциты. Выделенные лимфоциты культивировали 72 часа при 37 °С и

5% CO *in vitro* в среде RPMI 1640, содержащей необходимые добавки, в присутствии белкового антигена, использованного для вакцинации. Для определения уровня продукции IFN γ иммуноферментным методом через 48 часов от начала культивирования из опытных и контрольных культур отбирали аликвоты супернатанта. Для определения антиген-специфической пролиферативной активности лимфоцитов последние 24 часа культивирования проводили в присутствии меченного тритием тимидина, с последующим определением количества включенной клетками метки на сцинтилляционном счетчике.

Собранные на всех этапах мышинные сыворотки были использованы для определения титра антимикобактериальных антител иммуноферментным методом. С этой целью высокоадсорбирующие 96-луночные планшеты для ИФА (Nunc, США) покрывали раствором комплекса белков вакцинной композиции в концентрации 30 мкг/мл PBS и инкубировали 18 ч при 4 °С. Далее планшеты отмывали раствором 0,1% Твин 20 в PBS и блокировали 1% раствором БСА в PBS в течение 1 ч при 37 °С. После блокировки планшеты снова отмывали и инкубировали с опытными и контрольными сыворотками в разведениях (PBS) 1/100, 1/200 и 1/400 2 ч при 37 °С. Далее планшеты отмывали и инкубировали с мечеными пероксидазой хрена антителами к IgG мыши в разведении (PBS) 1/1000 2 ч при 37 °С. Затем, после отмывки, добавляли высокочувствительный субстрат пероксидазы ТМБ (Thermo, США). Через 5 мин реакцию останавливали 0,167 М раствором серной кислоты. Реакцию читали на ридере VICTOR2 (Perkin Elmer, США) при длине волны 450 нм.

Результаты

Проведенные исследования показали, что выбранная для данной серии экспериментов схема иммунизации мышей экспериментальным комплексным антигеном стимулирует развитие долгосрочной иммунологической памяти, что, в частности, подтверждается наличием специфических антител в сыворотке через 10 месяцев после вакцинации (рис. 1).

Реакции адаптивного клеточного иммунитета — антиген-зависимая пролиферация лимфоцитов и продукция IFN γ — все еще отчетливо выраженные через 3,5 месяца после вакцинации, существенно теряют интенсивность через полгода после последней инъекции вакцины (рис. 2, табл. 1).

Интересно отметить, что интенсивность пролиферации, определяемая по индексу стимуляции пролиферативной реакции лимфоцитов, и продукция IFN γ существенно выше в группе мышей, провакцинированных комбинацией экспериментального комплексного антигена с глю-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ IFN γ (пг/мл) В СУПЕРНАТАНТАХ СТИМУЛИРОВАННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ БЕЛКОВЫМ АНТИГЕНОМ КУЛЬТУР ЛИМФОЦИТОВ В РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ

TABLE 1. LEVELS OF IFN γ (pg/ml) IN SUPERNATANTS FROM EXPERIMENTAL PROTEIN ANTIGEN STIMULATED LYMPHOCYTE CULTURES AT DIFFERENT TIME POINTS POST-VACCINATION

	1,5 месяцы months	3,5 месяцы months	6,25 месяцы months	9,75 месяцы months
Вакцина Vaccine	272,6	28,6	0,0	0,0
Вакцина + глютоксим Vaccine + glutoxim	404,9	175,0	0,0	0,0
BCG	249,3	0,0	0,0	0,0

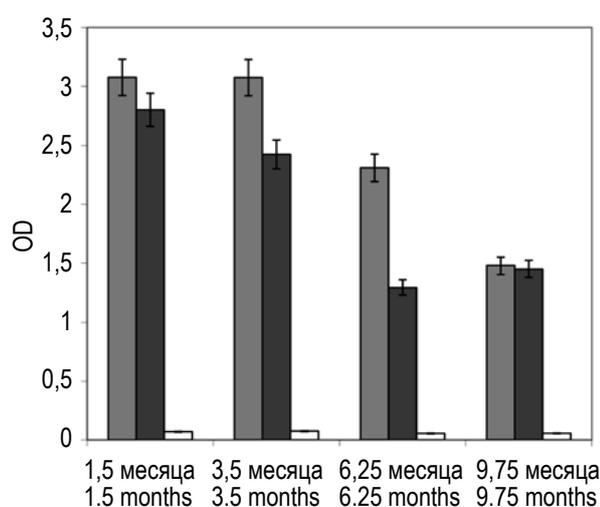


Рисунок 1. Динамика продукции специфических антител после вакцинации

Примечание. Серые столбики – вакцина, черные столбики – вакцина + глютоксим, белые столбики – BCG.

Figure 1. Dynamics of vaccination-induced specific antibody production

Note. Grey bar, novel vaccine; black bar vaccine + glotoxim; white bar, BCG.

токсимом, по сравнению с группами, получившими вакцину без дополнительного адьюванта или BCG (рис. 2, табл. 1).

Через 3,5 месяца после вакцинации специфическая пролиферативная активность регистрировалась в группах провакцинированных комбинацией экспериментального комплексного антигена с адьювантом или BCG, но не белком без дополнительного адьюванта. При этом пролиферация успешно активировалась как экспериментальным белком, так и отдельными белками культурального фильтрата микобактерий (рис. 2 и неопубликованные данные).

Обсуждение

Исходя из незначительной протективной эффективности ревакцинации BCG, в настоящее

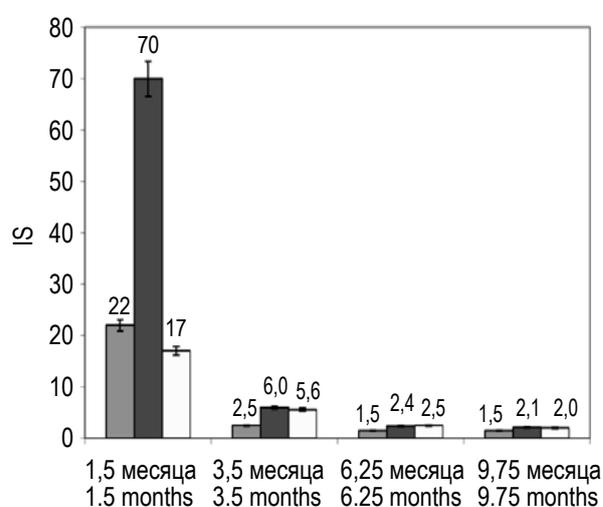


Рисунок 2. Пролиферативный ответ стимулированных экспериментальным белковым антигеном культур лимфоцитов в разные сроки после вакцинации

Примечание. Серые столбики – вакцина, черные столбики – вакцина + глютоксим, белые столбики – BCG.

Figure 2. Experimental protein antigen-stimulated lymphocyte proliferation at different time points post-vaccination

Note. Grey bar, new vaccine; black bar, vaccine + glotoxim; white bar, BCG.

время ВОЗ не рекомендует повторные инъекции BCG в регионах с высокой заболеваемостью туберкулезом (ТБ). Идеальная вакцина должна создавать эффективную иммунологическую память, способную защитить людей в эндемичных по ТБ регионах. В большинстве случаев единичная вакцинация не способна обеспечить генерацию длительной памяти, что обуславливает необходимость бустерных инъекций для повышения эффективности уже примированной иммунной системы [11, 15]. В настоящее время стратегия повторных вакцинаций применяется в ряде клинических и доклинических испытаний противотуберкулезных вакцин. При этом для повторных инъекций используют либо гомологичные (те же что и для примирования), либо гетерологичные (отличные от примиряющей) вакцины. Схе-

ма гетерологичной ревакцинации подразумевает применение различных средств доставки антигена, таким образом, что иммунизация осуществляется антигеном в составе одного вектора, а буст-иммунизация происходит тем же антигеном в составе другого вектора [6]. Привлекательность данного подхода заключается в преимущественной стимуляции ТБ-специфических пресуществующих ТСМ к общим антигенам первичной и буст-вакцин. Несмотря на теоретически существующую возможность использования субъединичных вакцин в качестве примиряющих, обычный подход заключается в примирении BCG с последующим бустом субъединичной вакциной, поскольку буст вакциной BCG неэффективен. Целый ряд антигенов *Mtb*, таких как ESAT6, MPT63, Ag85A, Ag85B, Mtb32a, Mtb39a и Hsp60, при использовании в качестве буст-вакцины, стимулировали существенное повышение протекции по сравнению с единичной инъекцией BCG [3, 8, 13]. К настоящему времени несколько субъединичных вакцин находятся на I или II стадии клинических испытаний [7].

В настоящем исследовании мы показали, что двукратное введение сложной по составу вакцины, состоящей из белкового компонента и плазмидной ДНК в сочетании с набором адьювантов, не только генерирует протективный иммунный ответ, но и стимулирует формирование длительной иммунологической памяти. При этом динамика продукции специфических антител после вакцинации значительно отличается от динамики пролиферативного ответа (рис. 1, 2) и продукции $IFN\gamma$ (табл. 1). Во-первых, отмечалось наличие антител в сыворотке проиммунизированных экспериментальным антигеном мышей в течение всего срока наблюдения, хотя некоторое снижение зарегистрировано к 10-му месяцу после вак-

цинации (рис. 1). Во-вторых, вакцинация BCG очень слабо индуцирует формирование антител к экспериментальному антигену. И, в-третьих, дополнительный адьювант в вакцине до некоторой степени снижает специфическое антителообразование в первые полгода после вакцинации. Показатели специфического антителообразования выравниваются в группах с дополнительным адьювантом и без него лишь к 10-му месяцу после иммунизации животных (рис. 1).

О роли антител в противотуберкулезном иммунитете написаны многочисленные обзоры. Лидирующей концепцией является представление о преимущественно негативном влиянии антител на эффективность защиты организма от туберкулезной инфекции и, напротив, о важной роли реакций клеточного иммунитета в протекции от туберкулеза, хотя имеются и альтернативные мнения [5]. В связи с этим представляется важным отмеченное нами альтернативное воздействие адьюванта на результат вакцинации: стимуляция клеточного компонента на фоне частичного подавления специфического антителообразования. Однако для подтверждения данной концепции требуются дополнительные исследования.

Таким образом, установлено, что испытуемый препарат стимулирует у мышей формирование длительной иммунологической памяти к бактериальному антигену. При этом добавление дополнительного адьюванта смещает спектр иммунологической памяти к «протективному» типу, т.е. стимулирует преобладание клеточного компонента иммунного ответа над гуморальным. Следующим этапом исследования данной вакцины будет изучение эффективности ее применения для ревакцинации после первичной иммунизации BCG.

Список литературы / References

1. Еремеев В.В., Гергерт В.Я. Изучение способности препарата глутоксим влиять на антимикобактериальную активность фагоцитов чувствительных и устойчивых к туберкулезу мышей // Туберкулез и болезни легких, 2013. № 7. С. 43-47. [Yeremeev V.V., Gergert V.Ya. Investigation of the ability of glutoxim to affect the antimycobacterial activity of phagocytes in tuberculosis susceptible and resistant mice. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Desiases*, 2013, no. 7, pp. 43-47. (In Russ.)]
2. Еремеев В.В., Духовлинов И.В., Орлов А.И., Маленко А.Ф., Федорова Е.А., Балазовский М.Б., Гергерт В.Я. Исследование протективных свойств вакцинного препарата на основе рекомбинантных белков Ag85, TB10 и FliC // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С.197-202. [Yeremeev V.V., Dukhovlinov I.V., Orlov A.I., Malenko A.F., Fedorova E.A., Balazovsky M.B., Gergert V.Ya. Studies on protective effects of a vaccine, based on recombinant Ag85, TB10 and FliC proteins. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 197-202. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-197-202.
3. A Randomized, Placebo Controlled, Partially Blinded Phase II Study to Evaluate Safety, Immunogenicity, and Prevention of Infection With *Mycobacterium tuberculosis* of AERAS-404 and BCG Revaccination in Healthy Adolescents (040-404). Available from: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT02075203>.
4. Connor L.M., Harvie M.C., Rich F.J., Quinn K.M., Brinkmann V., Le Gros G., Kirman J.R. A key role for lung-resident memory lymphocytes in protective immune responses after BCG vaccination. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, no. 9, pp. 2482-2492.
5. Coppola M., Arroyo L., van Meijgaarden K.E., Franken K.L., Geluk A., Barrera L.F., Ottenhoff T.H.M. Differences in IgG responses against infection phase related *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) specific antigens in individuals exposed or not to *Mtb* correlate with control of TB infection and progression. *Tuberculosis*, 2017, Vol. 106. pp. 25-32.

6. Fournillier A., Frelin L., Jacquier E., Ahlén G., Brass A., Gerossier E., Holmström F., Broderick K.E., Sardesai N.Y., Bonnefoy J.Y., Inchauspé G., Sällberg M. Heterologous prime/boost vaccination strategy enhances the immunogenicity of therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 208, no. 6, pp. 1008-1019.
7. Kaufmann S.H., Weiner J., von Reyn C.F. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *Int. J. Infect. Dis.*, 2017, Vol. 56, pp. 263-267.
8. Leroux-Roels I., Forgas S., De Boever F., Clement F., Demoitié M.A., Mettens P., Moris P., Ledent E., Leroux-Roels G., Ofori-Anyinam O.I. Improved CD4⁺ T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* in PPD-negative adults by M72/AS01 as compared to the M72/AS02 and Mtb72F/AS02 tuberculosis candidate vaccine formulations: A randomized trial. *Vaccine*, 2013, Vol. 31, no. 17, pp. 2196-2206.
9. Lindenstrom T., Agger E.M., Korsholm K.S., Darrach P.A., Aagaard C., Seder R.A., Rosenkrands I., Andersen P. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 12, pp. 8047-8055.
10. Lindenstrom T., Knudsen N.P., Agger E.M., Andersen P. Control of chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD4 KLRG1- IL-2-secreting central memory cells. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 12, pp. 6311-6319.
11. Lu S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr. Opin. Immunol.*, 2009, Vol. 21, no. 3, pp. 346-351.
12. Orme I.M. The Achilles heel of BCG. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2010, Vol. 90, no. 6, pp. 329-332.
13. Reither K., Katsoulis L., Beattie T., Gardiner N., Lenz N., Said K., Mfinanga E., Pohl C., Fielding K.L., Jeffery H., Kagina B.M., Hughes E.J., Scriba T.J., Hanekom W.A., Hoff S.T., Bang P., Kromann I., Daubenberger C., Andersen P., Churchyard G.J. Safety and immunogenicity of H1/IC31(R), an adjuvanted TB subunit vaccine, in HIV-infected adults with CD4⁺ lymphocyte counts greater than 350 cells/mm³: a phase II, multi-centre, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 12, e114602. doi: 10.1371/journal.pone.0114602.
14. Soares A.P., Kwong Chung C.K., Choice T., Hughes E.J., Jacobs G., van Rensburg E.J., Khomba G., de Kock M., Lerumo L., Makhetha L., Maneli M.H., Pienaar B., Smit E., Tena-Coki N.G., van Wyk L., Boom W.H., Kaplan G., Scriba T.J., Hanekom W.A. Longitudinal changes in CD4(+) T-cell memory responses induced by BCG vaccination of newborns. *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 207, no. 7, pp. 1084-1094.
15. Tyagi A.K., Nangpal P., Satchidanandam V. Development of vaccines against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 2011, Vol. 91, no. 5, pp. 469-478.
16. 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.

Авторы:

Еремеев В.В. — д.м.н., заведующий лабораторией клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Духовлинов И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Орлов А.И. — д.х.н., заместитель директора ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Шепелькова Г.С. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Федорова Е.А. — аспирант отдела молекулярной биотехнологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Балазовский М.Б. — директор ЗАО «Фарма ВАМ», Санкт-Петербург, Россия

Гергерт В.Я. — д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунологии, ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Authors:

Yeremeev V.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory for Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Orlov A.I., PhD, MD (Chemistry), Deputy Director, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Shepelkova G.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Fedorova E.A., Research Fellow, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Balazovsky M.B., Director, Pharma VAM, St. Petersburg, Russian Federation

Gergert V.Ya., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Поступила 03.07.2017

Отправлена на доработку 22.09.2017

Принята к печати 25.09.2017

Received 03.07.2017

Revision received 22.09.2017

Accepted 25.09.2017

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОПЕПТИДНО-ЦИТОКИНОВОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ С ПОЛИМОРБИДНОЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИЕЙ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ НА ФОНЕ ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

Герцев А.В.^{1,2}, Закревский Ю.Н.³

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

² Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

³ Объединенное стратегическое командование «Север», Россия

Резюме. На сегодняшний день в основе патогенетического процесса ишемической болезни сердца и гипертонической болезни следует рассматривать сложные реакции нейроиммунных взаимодействий, характеризующихся активацией провоспалительных цитокинов, опиатных рецепторов и эндогенных опиоидных пептидов. Эти изменения опосредуются высокой активностью на уровне основных регуляторных систем, повышающих устойчивость миокарда к острым и хроническим ишемическим повреждениям. Тем не менее имеет место недостаточное количество данных о степени выраженности этих изменений при полиморбидном течении ишемической болезни сердца и гипертонической болезни, протекающих на фоне тревожно-депрессивных расстройств.

В связи с чем целью данной работы явилось изучение регуляторных нарушений на уровне нейропептидно-цитокинового пула иммунной системы у больных с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией, протекающей на фоне тревожно-депрессивных расстройств. Проведено клиническое обследование 85 больных (мужчин) в возрасте от 35 до 45 лет, с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией (ишемической болезнью сердца в сочетании с гипертонической болезнью второй стадии), протекающей на фоне тревожно-депрессивных расстройств. Для решения задач, поставленных в настоящей работе, сформировали группы больных в коморбидности с тревожно-депрессивными нарушениями 1-я (n = 40) – пациенты с полиморбидной патологией; 2-я (n = 20) – больные с ишемической болезнью сердца; 3-я (n = 25) – больные с гипертонической болезнью второй стадии; 4-я (n = 30) – контроль (здоровые лица). С целью исследования регуляторных дисфункций на уровне нейропептидно-цитокинового звена иммунитета в группах обследования изучили состояние надсегментарного аппарата вегетативной нервной системы и цитокиновый пул иммунной системы. Использовали тест-системы по определению в сыворотке крови больных β -эндорфина, цитокинов провоспалительного (TNF α , IL-1 β , IL-6) и противовоспалительного (IL-4, IL-10) спектра.

В ходе проведенного клинико-лабораторного исследования авторами установлено, что у больных с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией имеет место формирование регуляторных дис-

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, Ю.Н. Закревский «Характеристика нейропептидно-цитокинового звена иммунитета у больных с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией, протекающей на фоне тревожно-депрессивных расстройств» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 277-284.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-277-284

© Герцев А.В., Закревский Ю.Н., 2018

For citation:

A.V. Gertsev, Yu.N. Zakrevsky "Characteristics of neuropeptide-cytokine immunity links in patients with combined cardiovascular pathology, proceeding with anxiety/depression disorder", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 277-284.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-277-284

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-277-284

функций на уровне нейропептидно-цитокинового звена иммунной системы, характеризующихся снижением уровня продукции β -эндорфина в 1,5–2 раза, увеличением провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6) и уменьшением противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов.

Ключевые слова: ишемическая болезнь, гипертензия, тревожность, депрессия, β -эндорфин, цитокины

CHARACTERISTICS OF NEUROPEPTIDE-CYTOKINE IMMUNITY LINKS IN PATIENTS WITH COMBINED CARDIOVASCULAR PATHOLOGY, PROCEEDING WITH ANXIETY/DEPRESSION DISORDER

Gertsev A.V.^{a, b}, Zakrevsky Yu.N.^c

^a S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

^b A. Nikiforov All-Russian Center for Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c Northern Joint Strategic Command, Russian Federation

Abstract. To date, pathogenetic events underlying coronary heart disease and hypertensive syndrome should be regarded as complex reactions of neuroimmune interactions characterized by activation of proinflammatory cytokines, opiate receptors and endogenous opioid peptides. These changes are mediated by high activity of basic regulatory systems that increase myocardial resistance to acute and chronic ischemic damage. However, there is lack of data concerning severity of these changes in the course of complicated coronary heart disease and hypertension, which occur in the background of anxiety-depressive disorders.

The aim of present study was to assess regulatory disturbances at the level of neuropeptide-cytokine pool in the patients with polymorbid cardiovascular disease accomplished by anxiety and depressive conditions. Clinical examination of 85 patients (males) aged 35 to 45 years, with complicated cardiovascular disease (coronary heart disease combined with essential hypertension stage II) associated with anxiety and depressive disorders. To address these issues, we have formed a group of patients with anxiety and depressive disorders (group 1, n = 40), patients with coronary artery disease and stage II hypertension; group 2 (n = 20) included patients with coronary artery disease; group 3 (n = 25) included patients with hypertension stage II; group 4 (n = 30) represented controls (healthy person). In order to study dysfunction of regulatory neuropeptides at the level of cytokine-mediated immunity in these groups, we have studied diagnostic markers of the suprasegmentary autonomous nervous condition, and cytokine pool of immune system. Immune testing was used to determine β -endorphin, cytokines of pro-inflammatory (TNF α , IL-1 β , IL-6) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) spectra in blood serum of patients

In the course of clinical and laboratory examination, the authors found that the patients with polymorbid cardiovascular pathology exhibit regulatory dysfunctions at the level of neuropeptide-cytokine links of immunity characterized by 1.5–2-fold decrease of β -endorphin levels, increase in pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6) and decrease in anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines.

Keywords: ischemic disease, hypertension, anxiety, depression, β -endorphin, cytokines

Введение

В настоящее время в качестве неотъемлемой части патогенеза ишемической болезни сердца (ИБС) и гипертонической болезни (ГБ) рассматривается системная воспалительная активность, проявляющаяся взаимодействием провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов [1, 2]. Изменения цитокинового спектра при ИБС и ГБ опосредуются высокой активностью симпатико-адреналовой

и ренин-ангиотензин-альдостероновой систем, обусловленной хронической гипоксией и усилением катаболических процессов [14]. Множественные регуляторные эффекты цитокинов систематизируются разнонаправленным действием в атеросклеротическом процессе. Так, провоспалительные цитокины – TNF α , IL-1 β и IL-6 – рассматриваются как атерогенные, а противовоспалительные факторы – IL-4 и IL-10 – как атеропротекторные медиаторы [10, 11].

Согласно современным исследованиям, цитокины провоспалительного и противовоспалительного спектра непосредственно участвуют в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. При этом IL-1 β запускает каскад воспалительных процессов после повреждения эндотелиальной стенки, а IL-6 способствует активации эндотелия, усиливает его адгезивную способность к тромбоцитам и лейкоцитам, что приводит к пролиферации гладкомышечных элементов сосудистого русла [9]. На фоне ишемических повреждений в органах и тканях, а также течения артериальной гипертензии, уровень атерогенных цитокинов в сыворотке крови повышается в несколько раз [2, 13].

Роль регуляторов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при атеросклеротических процессах принадлежит эндогенным опиатным пептидам (эндорфинам и энкефалинам) вегетативной нервной системы (ВНС) [4, 8]. Основным эффектом опиодных нейропептидов, в первую очередь β -эндорфина, является регуляция синтеза маркеров иммунного воспаления, прежде всего цитокинов [3, 5].

Согласно последним исследованиям, было установлено, что при ИБС, на фоне психоэмоциональной нагрузки, отмечается повышение уровня содержания β -эндорфина в периферической крови [6]. Активация β -эндорфина на фоне стресс-реакции у больных с ИБС повышает устойчивость миокарда к ишемическим повреждениям [8]. Уровень β -эндорфина значительно увеличивается во время эмоциональной нагрузки, в процессе адаптации сердечной мышцы к стрессовым воздействиям, в том числе и на мобилизационный стресс, геморрагический шок и при гипертрофии миокарда [12, 15].

Острая ишемия миокарда, обусловленная коронарным тромбозом, кардиохирургическим вмешательством или перевязкой коронарной артерии, также ведет к увеличению концентрации β -эндорфина в плазме крови. Кроме того, у пациентов с острым инфарктом миокарда уровень β -эндорфина в плазме крови в 10 раз превосходит норму, а у людей, находящихся в состоянии кардиогенного шока, концентрация β -эндорфина в 20 раз превосходит аналогичный показатель у здоровых лиц [7].

Следует резюмировать, что ИБС и ГБ протекают как сложный процесс нейроиммунных взаимодействий, характеризующийся активацией провоспалительных цитокинов, опиатных рецепторов и эндогенных опиодных пептидов, которые снижают воспалительные процессы на системном уровне, в локальных очагах атеросклероза и повышают устойчивость миокарда

к ишемическим повреждениям. Процессы адаптации сердечно-сосудистой системы к ишемическим повреждениям, протекающие на фоне длительных психоэмоциональных нагрузок, хронического стресса, тревожно-депрессивных и соматовегетативных расстройств, нарушаются. Это обусловлено в первую очередь подавлением β -эндорфина на уровне гипоталамо-гипофизарной зоны, недостаточной его антиишемической и противовоспалительной активности.

Несмотря на наличие результатов исследований, доказывающих, что быстрому прогрессированию атеросклероза при ИБС и ГБ способствуют регуляторные нарушения в функционировании вегетативной нервной, иммунной и нейроэндокринно-медиаторной систем, тем не менее открытыми остаются вопросы о степени выраженности этих дисфункций на уровне нейропептидно-цитокинового звена иммунитета при полиморбидной сердечно-сосудистой патологии, протекающей на фоне тревожно-депрессивных расстройств.

Цель исследования — изучение регуляторных нарушений на уровне нейропептидно-цитокинового звена иммунной системы при полиморбидной сердечно-сосудистой патологии, протекающей на фоне тревожно-депрессивных расстройств.

Материалы и методы

Провели клиническое обследование 85 больных (мужчин) в возрасте от 35 до 45 лет, средний возраст — $38,0 \pm 4,6$ лет. У обследуемых имелись ИБС (I20 по МКБ-10) и ГБ II стадии (I10 по МКБ-10) в коморбидности с тревожно-депрессивными расстройствами (F41.2 по МКБ-10). Длительность наблюдения за больными была $24 \pm 8,4$ суток.

Исследования проводили в клинике военно-морской терапии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, углубленное лабораторное обследование — в научно-исследовательской лаборатории клеточного и гуморального иммунитета Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им А.М. Никифорова МЧС России (Санкт-Петербург).

Для решения задач, поставленных в настоящей работе, сформированы группы больных в коморбидности с тревожно-депрессивными нарушениями:

1-я (n = 40) — пациенты с ИБС и ГБ II стадии; 2-я (n = 20) — больные с ИБС; 3-я (n = 25) — больные с ГБ II стадии; 4-я (n = 30) — контроль (здоровые лица). Критерием исключения являлись пациенты с активным воспалительным процес-

сом, онкологическими заболеваниями и с заболеваниями иммунной системы.

С целью изучения регуляторных дисфункций на уровне нейропептидно-цитокинового звена иммунной системы в группах обследования было проведено клинико-лабораторное исследование. Исследовали состояние вегетативной регуляции и показатели цитокинового пула иммунной систем с применением тест-систем отечественного и зарубежного производства по определению в сыворотке крови пациентов β -эндорфина, цитокинов провоспалительного ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6) и противовоспалительного (IL-4, IL-10) спектра методом иммуноферментного анализа. Применяли тест-системы фирмы BioSource International (США, Калифорния) для определения в сыворотке крови IL-1 β , IL-4 и фирмы ProCon (Санкт-Петербург, Россия) — $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-10. 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.

Кроме того, провели оценку качественных и количественных парных корреляционных связей между основными показателями, характеризующими состояние надсегментарного аппарата ВНС (β — эндорфин), провоспалительных ($\text{TNF}\alpha$, 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.

Математическую обработку данных осуществили на IBM-совместимом персональном компьютере. Электронную базу данных создали в программной среде Microsoft Excel 2003-2007, статистический анализ выполнили с помощью пакета прикладных программ Statistica for Windows. 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 ($M \pm m$).

Результаты

Состояние вегетативной регуляции

При проведении клинико-лабораторных исследований было выявлено достоверно значимое снижение уровня β -эндорфина в 1-й группе пациентов по отношению ко 2-й ($p < 0,05$) и 3-й ($p < 0,05$) группам больных с монопатологией (табл. 1).

Кроме того, уровень содержания β -эндорфина в периферической крови больных 3-й группы также значимо превышал аналогичные показатели пациентов группы 2 ($p < 0,05$).

Состояние иммунной системы

Все показатели цитокинов провоспалительного и противовоспалительного спектра в группах обследования изменялись в широких пределах (табл. 2).

Установлено статистически значимое повышение $\text{TNF}\alpha$ в 1-й группе больных ($p < 0,05$), последующее снижение $\text{TNF}\alpha$ отмечено во 2-й ($p < 0,05$) и 3-й группах ($p < 0,05$) обследования. При этом уровень $\text{TNF}\alpha$ в сыворотке крови больных 3-й группы отличался от показателей больных группы 2 ($p < 0,05$).

Показатели IL-1 β 1-й и 2-й групп различались между собой недостоверно. В 3-й группе уровень содержания IL-1 β был ниже, чем у пациентов в 1-й и 2-й группах обследования ($p < 0,05$).

Выявлены также изменения уровня IL-6 у больных с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией. Отмечается статистически значимое снижение IL-6 во 2-й группе пациентов ($p < 0,05$), в дальнейшем снижение IL-6 отмечено в 3-й группе ($p < 0,05$) обследования по отношению к пациентам группы 1. При этом концентрации IL-6 в сыворотке крови больных 3-й груп-

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ СОДЕРЖАНИЯ β -ЭНДОРФИНА, ($M \pm SD$) пг/мл

TABLE 1. β -ENDORPHIN LEVELS IN BLOOD SERUM OF SUBJECTS FROM DIFFERENT CLINICAL GROUPS, ($M \pm SD$) pg/ml

Показатель Index	Группы обследуемых Groups of subjects			
	1-я 1 st	2-я 2 nd	3-я 3 rd	4-я 4 th
β -эндорфин β -endorphin	1816,22 \pm 614,84	2741 \pm 551,6*	3102 \pm 656,2**	4548,6 \pm 1081,5***

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 for $p < 0.05$ compared to: *, the 1st group; #, the 2nd group; **, the 3rd group.

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ, (M±SD) пг/мл

TABLE 2. CYTOKINE CONTENTS IN BLOOD SERUM OF SUBJECTS FROM DIFFERENT CLINICAL GROUPS, (M±SD) pg/ml

Показатель Index	Группа больных с полиморбидной и монопатологией Groups of patients with polymorbid and mono-pathology			
	1-я 1 st	2-я 2 nd	3-я 3 rd	4-я 4 th
TNF α	33,3±18,40	26,7±9,1*	19,6±7,0**	7,3±4,6****
IL-1 β	4,1±0,71	3,7±0,8	2,9±1,3**	2,4±1,1****
IL-6	14,3±8,62	11,8±2,7*	9,7±1,8**	2,5±0,9****
IL-4	2,9±0,61	3,7±0,3*	4,9±0,7**	6,1±1,1****
IL-10	33,3±18,40	26,7±9,1*	19,6±7,0**	7,3±4,6****

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As in Table 1.

пы значимо отличались от показателей больных группы 2 ($p < 0,05$).

При оценке уровня содержания IL-4 и IL-10 *in vivo* наблюдали увеличение противовоспалительных цитокинов во 2-й группе больных ($p < 0,05$), в дальнейшем их уровень повышался в 3-й группе пациентов ($p < 0,05$) по сравнению с пациентами 1-й группы обследования. Концентрации IL-4 и IL-10 в сыворотке крови больных 3-й группы достоверно отличались от группы 2 ($p < 0,05$).

Взаимосвязи показателей функционирования надсегментарного аппарата ВНС и цитокинового звена иммунитета

Выявлено следующее (см. табл. 3):

– у больных с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией установлены прямые корреляционные связи слабой силы между показателем содержания β -эндорфина и уровнем TNF α и IL-10 в сыворотке крови; корреляционные связи умеренной силы – между показателем содержания β -эндорфина и уровнем IL-1 β , IL-6 и IL-4;

ТАБЛИЦА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРНЫХ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НАДСЕГМЕНТАРНОГО АППАРАТА ВЕГЕТАТИВНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ГРУППАХ ОБСЛЕДУЕМЫХ

TABLE 3. PAIRED CORRELATIONS BETWEEN THE FUNCTIONAL INDICES OF AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM AND IMMUNE SYSTEM IN THE GROUPS OF UNDER STUDY

Цитокины Cytokines	Уровень продукции β -эндорфина Levels of β -endorphin production			
	Группы обследуемых Groups of subjects			
	1-я 1 st	2-я 2 nd	3-я 3 rd	4-я 4 th
TNF α	0,18	0,28*	0,67**	0,86****
IL-1 β	0,47	0,57*	0,58**	0,84****
IL-6	0,44	0,62*	0,66**	0,86****
IL-4	0,41	0,59*	0,28**	0,86****
IL-10	0,21	0,42*	0,62**	0,78****

Примечание. См. примечание к таблице 1.

В таблице представлены силы корреляционных связей в виде числовых величин между показателями продукции β -эндорфина, провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов у пациентов 1-й, 2-й, 3-й и 4-й групп, а также достоверность различий между этими связями ($p < 0,05$) в группах обследуемых.

Note. As in Table 1.

The table contains correlation quotients for links between the values of β -endorphin production, pro-inflammatory (TNF α , IL-1 β , IL-6) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines in the patients from 1st, 2nd, 3rd and 4th groups, as well as significance of the differences between these links ($p < 0.05$) for distinct groups of subjects.

– у больных с ИБС и тревожно-депрессивными нарушениями выявлены прямые корреляционные связи умеренной силы между уровнем β -эндорфина и IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10; прямые корреляционные связи слабой силы между значениями уровня β -эндорфина и TNF α ;

– у больных с ГБ и тревожно-депрессивными нарушениями выявлены прямые корреляционные связи умеренной силы между уровнем β -эндорфина и TNF α , IL-1 β , IL-6 и IL-10; прямые корреляционные связи слабой силы между значениями уровня β -эндорфина, а также IL-4;

– в группе здоровых были определены прямые сильные корреляционные связи между уровнем β -эндорфина и TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-4 и IL-10.

Силы корреляционных связей между уровнем β -эндорфина и показателями цитокинового звена иммунной системы у больных с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией значимо отличались от корреляционных взаимосвязей больных с изолированным течением ГБ, ИБС и группы контроля ($p < 0,05$). У пациентов с изолированным течением ИБС силы корреляционных связей между уровнем содержания β -эндорфина и показателями цитокинового звена иммунной системы также отличались от показателей корреляционных взаимосвязей больных с ГБ и группы контроля ($p < 0,05$). Силы корреляционных связей между уровнем β -эндорфина, цитокинами провоспалительного и противовоспалительного спектра больных с изолированным течением ГБ также достоверно отличались от показателей корреляционных связей группы контроля ($p < 0,05$).

Обсуждение

Анализ показателей, отражающих состояние вегетативной регуляции у больных с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией, позволил определить снижение уровня содержания β -эндорфина в периферической крови примерно в 1,5-2 раза, по сравнению с пациентами с монопатологией, что достоверно объективизирует нарушения в регуляторных процессах на уровне надсегментарной области ВНС в группе этих больных.

В ходе проведенного клиничко-лабораторного исследования были получены результаты, позволяющие охарактеризовать степень дисфункций на уровне цитокинового пула иммунной системы в группах пациентов с полиморбидной и монопатологией. Так, в группе пациентов с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией установлено значимое увеличение уровня содержания в периферической крови цитокинов, отражающих активность воспаления (TNF α , IL-1 β ,

IL-6) и уменьшение цитокинов противовоспалительного (IL-4, IL-10) спектра, по сравнению с пациентами с изолированным течением ИБС и ГБ. Эти данные свидетельствуют об усилении иммуновоспалительного процесса при полиморбидном течении ИБС и ГБ на фоне тревожно-депрессивных нарушений.

При сравнении парных корреляционных связей у больных с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией были установлены прямые умеренные корреляционные связи между содержанием β -эндорфина и IL-1 β , IL-6 и IL-4, а также слабые взаимосвязи между уровнем β -эндорфина, TNF α и IL-10, что свидетельствует о нарушениях в контроле ВНС над их функциями на уровне цитокинового пула иммунной системы.

Кроме того, определяется четкая взаимосвязь между уровнем продукции β -эндорфина, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у больных с полиморбидной и моносердечно-сосудистой патологией, протекающей на фоне тревожно-депрессивных расстройств. При этом активность показателей цитокинового звена иммунитета прямо коррелирует с уровнем содержания β -эндорфина и клиническим течением кардиологической патологии.

Таким образом, выявлены различия в регуляторном портрете, маркируемом корреляционными связями показателей, характеризующих состояние надсегментарной области ВНС и цитокинового пула иммунной системы у больных с полиморбидной патологией. Различия в регуляторном портрете у больных с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией обусловлены перестройкой регуляторных взаимодействий на уровне нейропептидно-цитокинового звена иммунитета, что будет способствовать прогрессированию атеросклеротических процессов в сердце и сосудах в группе этих пациентов.

Заключение

У больных с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией, протекающей на фоне тревожно-депрессивных расстройств, выявлена десинхронизация в функционировании вегетативной нервной и иммунной систем, проявляющаяся перестройкой регуляторных взаимодействий на уровне нейропептидно-цитокинового звена иммунитета в виде снижения уровня β -эндорфина периферической крови в 1,5-2 раза, увеличением провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6) и уменьшением противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов.

Список литературы / References

1. Алексеева Г.В., Гавришева Н.А., Панов А.В., Сесь Т.П., Быков В.Н., Корженевская К.В. Оксидантная активность лейкоцитов и провоспалительные цитокины при остром коронарном синдроме // Артериальная гипертензия, 2008. Т. 14, № 2. С. 68-72. [Aleksееva G.V., Gavrisheva N.A., Panov A.V., Ses T.P., Bikov V.N., Korgenevskaya K.V. Oxidant activity of white blood cells and inflammatory cytokines in acute coronary syndrome. *Arterial'naya gipertenziya = Arterial Hypertension*, 2008, Vol. 14, no. 2, pp. 68-72. (In Russ.)]
2. Гаврилюк Е.В., Конопля А.И., Караулов А.В. Роль иммунных нарушений в патогенезе артериальной гипертонии // Иммунология, 2016. Т. 37, № 1. С. 29-35. [Gavrilyuk E.V., Konoplya A.I., Karaulov A.V. The role of immune disorders in the pathogenesis of arterial hypertension. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 1, pp. 29-35. (In Russ.)]
3. Гейн С.В., Баева Т.А., Чернышев В.А. Роль бета-эндорфина в регуляции процессов пролиферации и продукции IL-4 лимфоцитами периферической крови *in vitro* // Иммунология Урала, 2005. № 1 (4). С. 4-5. [Gein S.V., Baeva T.A., Chernishov V.A. The role of beta-endorphin in the IL-4 *in vitro* lymphocyte peripheral blood cell proliferation and regulation of product. *Immunologiya Urala = Immunology of Ural*, 2005, no. 1 (4), pp. 4-5. (In Russ.)]
4. Гейн С.В., Горшкова К.Г., Тендрякова С.П. Роль бета-эндорфина в регуляции продукции провоспалительных цитокинов моноцитами периферической крови *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2007. № 2. С. 175-178. [Gein S.V., Gorshkov K.G., Tendryakova S.P. The role of beta-endorphin in the regulation of the production of proinflammatory cytokines by monocytes *in vitro* peripheral blood. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2007, no. 2, pp. 175-178. (In Russ.)]
5. Гейн С.В., Баева Т.А. Роль опиоидных пептидов в регуляции пролиферации лимфоцитов и изменении Th1/Th2 цитокинового профиля // Проблемы эндокринологии, 2005. Т. 51, № 5. С. 49-51. [Gein S.V., Baeva T.A. Role of opioid peptides in the regulation of lymphocyte proliferation and the change of Th1/Th2 cytokine profile. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2005, Vol. 51, no. 5, pp. 49-51. (In Russ.)]
6. Лишманов Ю.Б., Цибульников С.Ю., Нарыжная Н.В., Коробов М.В., Маслов Л.Н. Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции толерантности сердца к стрессорному повреждению // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2017. Т. 163, № 1. С. 32-35. [Lishmanov Yu.B., Tsubulnikov S.Yu., Naryzhnaya N.V., Korobov M.V., Maslov L.N. The role of the endogenous opioid system in regulating the tolerance of the heart to stress damage. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2017, Vol. 163, no. 1, pp. 32-35. (In Russ.)]
7. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Гросс Г.Д., Шульц Д.Э., Стефано Д. Активация опиатных рецепторов изменяет устойчивость сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям // Вестник аритмологии, 2002. № 28. С. 67-78. [Maslov L.N., Lishmanov Yu.B., Gross G.D., Shultz D.E., Stefano D. Activation of opiate receptors changes the resistance of the heart to ischemic and reperfusion injuries. *Vestnik aritmologii = Journal of Arrhythmology*, 2002, no. 28, pp. 67-78. (In Russ.)]
8. Маслов Л.Н., Мухомедзянов А.В., Лишманов Ю.Б. Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции функционального состояния сердца // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2016. Т. 102, № 9. С. 1017-1029. [Maslov L.N., Mukhomedzyanov A.V., Lishmanov Yu.B. The role of the endogenous opioid system in the regulation of the functional state of the heart. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*, 2016, Vol. 102, no. 9, pp. 1017-1029. (In Russ.)]
9. Ованесян Р.А., Ованесян И.Г., Межлумян Р.Г. Корреляционные связи между интерлейкином IL-1 β и степенью агрегации тромбоцитов при ишемическом инсульте // Гемореология и микроциркуляция, 2007. С. 117. [Ovanesyan R.A., Ovanesyan I.G., Mezhlumyan R.G. Correlation between interleukin IL-1 β and the degree of platelet aggregation in ischemic stroke. *Gemoreologiya i mikrotsirkulyatsiya = Hemorheology and Microcirculation*, 2007, p. 117. (In Russ.)]
10. Орлова Н.В. Генетическая обусловленность воспаления при атеросклеротическом поражении сосудов сердца // Сердечная недостаточность, 2008. Т. 9, № 4. С. 180-183. [Orlova N.V. Genetically caused inflammation in atherosclerotic lesions of vessels of the heart. *Serdechnaya nedostatochnost = Heart Failure*, 2008, Vol. 9, no. 4, pp. 180-183. (In Russ.)]
11. Сергеева Е.Г. Провоспалительные цитокины у больных ишемической болезнью сердца в зависимости от степени распространенности атеросклероза и их динамика на фоне терапии медостатином // Регионарное кровообращение и микроциркуляция, 2002. Т. 1, № 4. С. 40-43. [Sergeeva E.G. Proinflammatory cytokines in patients with ischemic heart disease, depending on the prevalence of atherosclerosis and their dynamics against the background of medostatin therapy. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya = Regional Blood Circulation and Microcirculation*, 2002, Vol. 1, no. 4, pp. 40-43. (In Russ.)]
12. Судаков С.К., Сотников С.В., Чекмарева Н.Ю., Колпаков А.А., Чумакова Ю.А., Умрюхин А.Е. Изменения уровня бета-эндорфина в поясной коре мозга крыс при периферическом введении лоперамида и метилналоксона в покое и во время эмоционального стресса // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2010. Т. 149, № 2. С. 124-126. [Sudakov S.K., Sotnikov S.V., Chekmareva N.Yu., Kolpakov A.A., Chumakova Yu.A., Umryukhin A.E. Changes in the level of beta-endorphin in the lumbar cortex of rats at peripheral administration of loperamide and methylnaloxonium in rest and during emotional stress. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*, 2010, T. 149, No. 2, P. 124-126. (In Russ.)]

Chumakova Yu.A., Umryukhin A.E. Changes in the level of beta-endorphin in the lumbar cortex of rats with peripheral administration of loperamide and methylnaloxone at rest and during emotional stress. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2010, Vol. 149, no. 2, pp. 124-126. (In Russ.)]

13. Трофименко А.И., Каде А.Х., Мясникова В.В., Пирогова Н.П., Занин С.А. β-эндорфин и цитокиновый профиль в динамике экспериментального ишемического инсульта // Современные проблемы науки и образования, 2014. № 6. С. 1125. [Trofimenko A.I., Kade A.H., Myasnikova V.V., Pirogova N.P., Zanin S.A. β-endorphin and cytokine profile in the dynamics of experimental ischemic stroke. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2014, no. 6, p. 1125. (In Russ.)]

14. Чукаева И.И., Орлова Н.В., Алешкин В.А., Громов Д.Г., Пухальский А.Л., Алексеева Е.Г. Влияние факторов риска на течение воспалительных реакций и развитие атеросклероза // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии, 2007. № 13. С. 45-50. [Chukaeva I.I., Orlova N.V., Aleshkin V.A., Gromov D.G., Pukhalsky A.L., Alekseeva E.G. Influence of risk factors on the course of inflammatory reactions and the development of atherosclerosis. *Mezhdunarodnyy zhurnal interventsionnoy kardioangiologii = International Journal of Interventional Cardioangiology*, 2007, no. 13, pp. 45-50. (In Russ.)]

15. Fontana F., Bernardi P., Spampinato S., Toro R., Bugiardini R. β-endorphin modulation of pressor response to hyperventilation in hypertensive patients. *Peptides*, 2002, Vol. 23, no. 5, pp. 911-918.

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

Закревский Ю.Н. — д.м.н., начальник медицинской службы Объединенного стратегического командования «Север», Россия

Authors:

Gertsev A.V., PhD (Medicine), Resident Physician, Managing Staff Faculty, S. Kirov Military Medical Academy; Research Laboratory of Cellular and Humoral Immunity, A. Nikiforov All-Russian Center for Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Zakrevsky Yu.N., PhD, MD (Medicine), Chief Medical Officer, Northern Joint Strategic Command, Russian Federation

Поступила 13.05.2017

Отправлена на доработку 21.06.2017

Принята к печати 13.07.2017

Received 13.05.2017

Revision received 21.06.2017

Accepted 13.07.2017

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 оплаты в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
 - Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
 - Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
 - Полное название статьи, направляемой в редакцию.
 - Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
 - Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
 - Дата отправления работы.
- 2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)
- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем – не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка»)

6) Файл в формате .doc, .docx, ttf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» – индекс 83030; Каталог «Пресса России» – индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абрамова Т.Я.....	255	Закревский Ю.Н.....	277	Ренге Л.В.	203
Артиюков А.А.....	179	Зверев В.В.....	151	Савченко А.А.....	215, 227
Архипова С.В.....	203	Зорин Н.А.....	203	Савченко С.П.....	241
Баженова Л.Г.....	203	Зорина В.Н.....	203	Самцов А.В.....	163
Балазовский М.Б.....	271	Зорина Р.М.....	203	Санджиев Д.Н.....	241
Балацкая Н.В.....	263	Климович А.А.....	179	Свитич О.А.....	151
Белоусова И.Э.....	163	Клюева С.Н.....	241	Сельков С.А.....	251
Белякова К.Л.....	251	Ковалева Л.А.....	263	Серебрякова М.К.....	227
Блинова Е.А.....	255	Козлов В.А.....	255	Серебряная Н.Б.....	171
Борисов А.Г.....	215, 227	Конушева С.В.....	241	Соколов Д.И.....	251
Бугоркова С.А.....	241	Костецкий Э.Я.....	179	Титов В.А.....	193
Васильева Е.В.....	227	Костянко М.В.....	193	Тотолян Арег А.....	227
Вафин И.А.....	193	Кробинец И.И.....	227	Третьякова Т.В.....	203
Веселова М.Д.....	179	Кудрявцев И.В.....	215, 227	Федорова Е.А.....	271
Воробьева Е.И.....	163	Куликова И.Г.....	263	Филатенкова Т.А.....	171
Вязьмина Л.П.....	251	Лихачева В.В.....	203	Филина А.Б.....	151
Ганковская Л.В.....	151	Макаров П.В.....	263	Фомичева Е.Е.....	171
Гарабаджиу А.В.....	163	Михайлова В.А.....	251	Хайрутдинов В.Р.....	163
Гвоздев И.И.....	215	Моренкова А.Ю.....	255	Хасыкова Б.А.....	241
Гергерт В.Я.....	271	Мошев А.В.....	215	Цура В.А.....	255
Герцев А.В.....	277	Мун С.А.....	193	Цыбульский А.В.....	179
Глушков А.Н.....	193	Орлов А.И.....	271	Шанин С.Н.....	171
Гордеева Л.А.....	193	Пашкин А.Ю.....	163	Шевелева А.Р.....	251
Давыдова Н.В.....	151	Поленок Е.Г.....	193	Шепелькова Г.С.....	271
Духовлинов И.В.....	271	Попов А.М.....	179	Щербакова С.А.....	241
Еремеев В.В.....	271	Рагожина С.Е.....	193	Шуковская Т.Н.....	241

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

активные формы кислорода.....	179	клеточный иммунитет.....	241	рак легкого.....	193
альфа-2-макроглобулин.....	204	кортикостерон.....	172	рак почки.....	216
антитела.....	193, 241	костимулирующие молекулы.....	216	ранний апоптоз.....	256
апоптоз.....	172	кровь.....	263	ревматоидный артрит.....	256
аутологичная культура клеток.....	256	лактоферрин.....	204	сериновые протеазы.....	163
бензо[а]пирен.....	193	лимфоциты.....	263	Т-лимфоциты.....	256
бесплодие.....	204	маркеры эффекторных клеток.....	228	тестостерон.....	172
вакцина.....	271	метформин.....	179	тревожность.....	278
врожденный иммунитет.....	151	микровезикулы.....	251	туберкулез.....	271
генетика.....	151	микрочастицы.....	251	фенотип.....	216, 263
гипертензия.....	278	многоцветный анализ.....	228	хемокины.....	151
гликозиды женьшеня.....	179	моноциты.....	216	циркулирующие иммунные комплексы.....	241
гуморальный иммунитет.....	241	нейтрофильные внеклеточные ловушки.....	163	цитокины.....	179, 204, 241, 278
дендритные клетки.....	216	нейтрофильные гранулоциты.....	163	цитотоксические Т-лимфоциты.....	228
депрессия.....	278	оксикаротиноиды.....	179	цитотоксичность.....	172
дисульфат лютеолина.....	179	опухолеобразование.....	151	ЭКО.....	204
дифференцировка.....	228	поверхностные рецепторы.....	251	экспериментальная ЧМТ.....	172
доксорубин.....	179	полиморфизмы генов.....	193	эстрадиол.....	193
иммунный ответ.....	163	презентация антигена.....	216	эхинохром А.....	179
иммуноглобулины.....	241	прогестерон.....	193	язвенное поражение роговицы.....	263
иммунологическая память.....	271	прогноз.....	204	НК-92.....	251
ингибиторные рецепторы.....	228	пролиферация лимфоцитов.....	172	НК-клетки.....	251
интерлейкины семейства IL-36.....	163	противоопухолевая активность.....	179	rIL-2.....	172
ишемическая болезнь.....	278	проточная цитофлуориметрия.....	228, 251	TLR.....	151
канцерогенез.....	193	псориаз.....	163	β-эндорфин.....	278
клеточная культура.....	251				

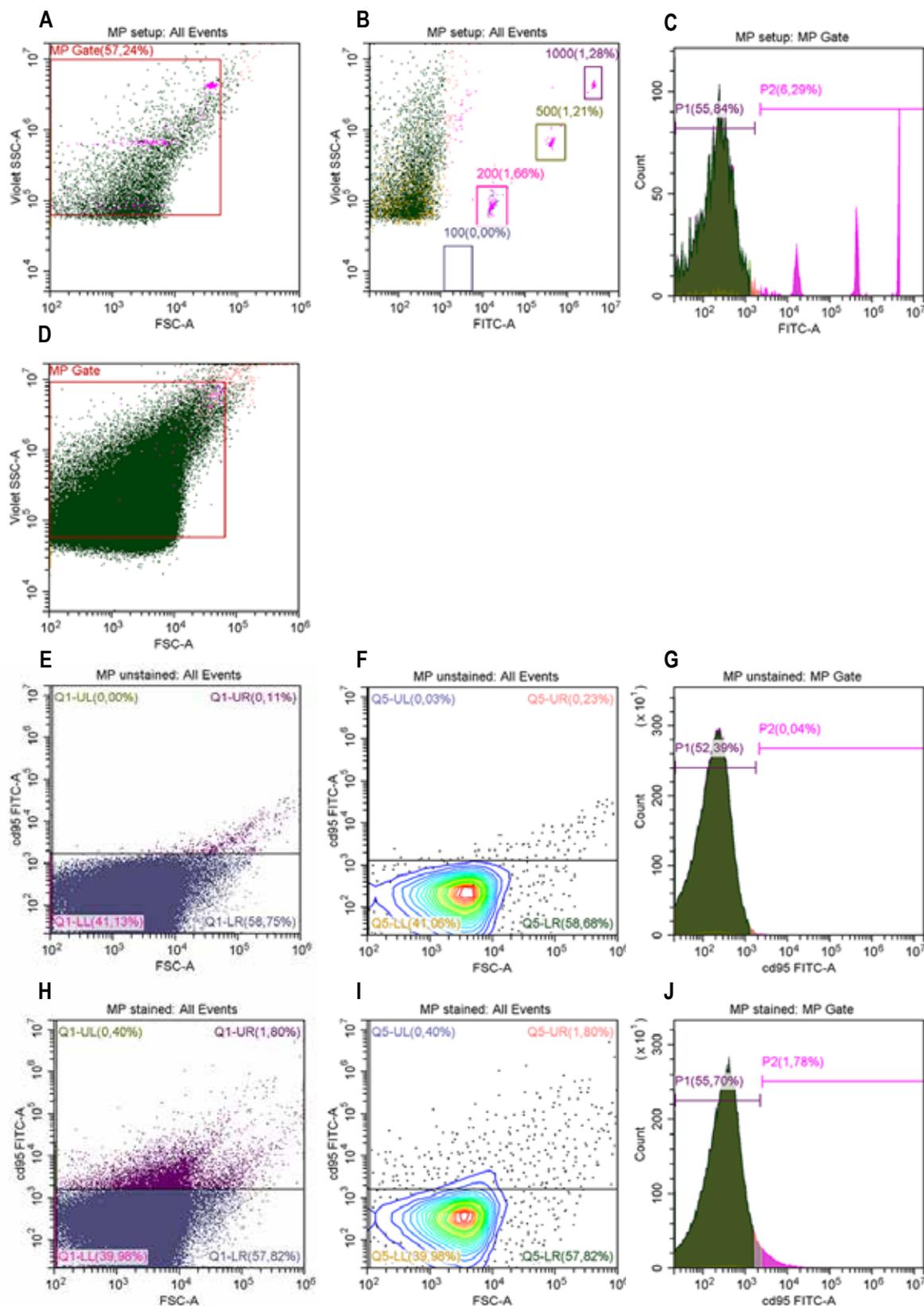
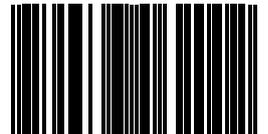


Figure 2. Distribution graphs for calibration particles and microvesicles formed by NK cells of the NK-92 cell line

Note. Calibration particles in coordinates: A, FSC-Violet SSC (Violet SSC – side scatter criterion obtained using 405 nm laser and 405/10 filter); B, FITC – Violet SSC; C, FITC – count (histogram). Microvesicles of NK cells in coordinates: D, FSC – Violet SSC; E, H, in coordinates FSC-CD95 (FITC) (dot plot); F, I, in coordinates FSC-CD95 (FITC) (contour plot); G, J, in coordinates CD95 (FITC) – count (histogram). E-G, microvesicles of NK cells untreated with antibodies to CD95; H-J, microvesicles of NK cells treated with antibodies to CD95.

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

ISSN 1563-0625



9 771563 062002 >