

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

Том 20, № 3. С. 289-454

2018

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АРОЕ: ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЯ АРОЕ4 НА СИСТЕМНОЕ ВОСПАЛЕНИЕ И ЕГО РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА» (АВТОРЫ: МАЛАШЕНКОВА И.К., КРЫНСКИЙ С.А., МАМОШИНА М.В., ДИДКОВСКИЙ Н.А. [с. 301-310])

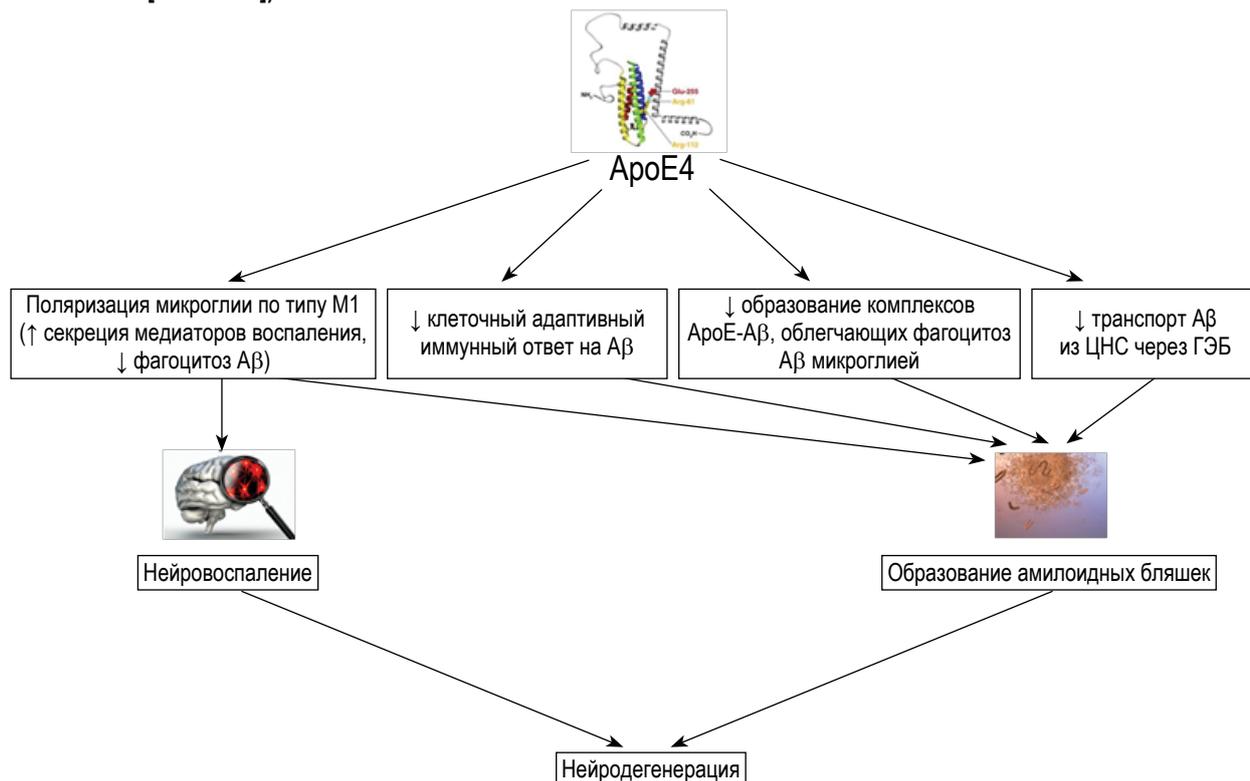


Рисунок 1. Роль изменений метаболизма амилоида-β и иммунных нарушений у носителей генетического полиморфизма ApoE4 в патогенезе болезни Альцгеймера

Figure 1. Role of changed β-amyloid metabolism and immune disturbances in carriers of genetic ApoE4 polymorphism in pathogenesis of Alzheimer disease

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ПРИМЕНЕНИЕ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ В ТЕРАПИИ ПАРОДОНТИТА» (АВТОРЫ: МУДРОВ В.П., НЕЛЮБИН В.Н., ВОРОБЬЕВА Е.С., ЛЫСЮК Е.Ю., МЯНДИЕВ М.С., ФОМЕНКОВ И.С., ИВАНОВ С.Ю. [с. 437-444])

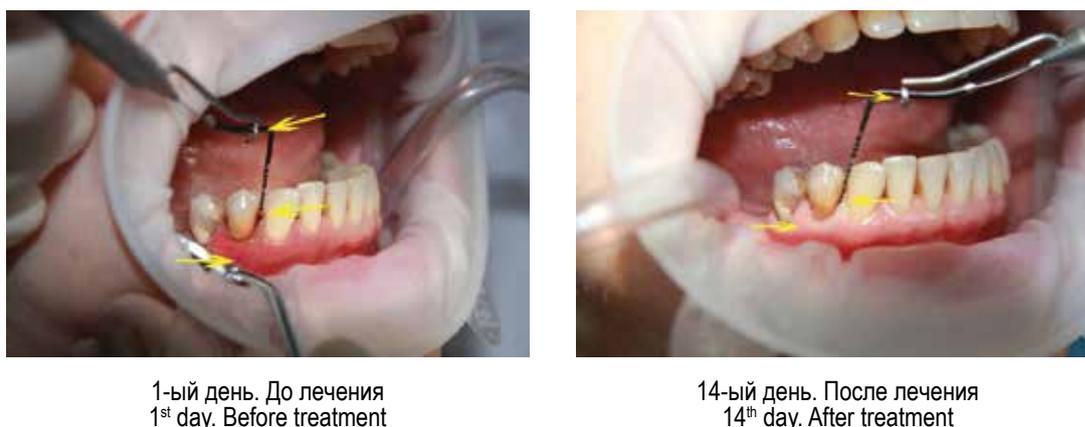


Рисунок 1. Клиническая картина пародонтита I степени до и после комплексной терапии с препаратом «Ребон. Гель для десен»

Примечание. Стрелками отмечено уменьшение глубины зубодесневого кармана, снижение воспаления.

Figure 1. Clinical picture of periodontitis I degree before and after complex treatment with the drug "Rebon. Gel for gums"
 Note. The arrows indicate the decrease in the depth of the periodontal pocket, reduction of inflammation.

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

май-июнь

2018, том 20

№ 3

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 05.04.2018 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 20,75. 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, научный руководитель 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

Михалеk 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**

May-June

2018, volume 20

No. 3

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 05.04.2018. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 20,75. 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, Scientific Director, 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

История науки

Назаров П.Г., Фрейдлин И.С.

ОСНОВЫ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ АКАДЕМИКА В.И. ИОФФЕ (К 120-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АКАДЕМИКА В.И. ИОФФЕ)..... 295

Обзоры

Малашенкова И.К., Крынский С.А., Мамошина М.В., Дидковский Н.А.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА APOE: ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЯ APOE4 НА СИСТЕМНОЕ ВОСПАЛЕНИЕ И ЕГО РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА 303

Лежнин Ю.Н., Христинченко А.Ю., Ратникова Н.М., Кравченко Ю.Е., Чумаков С.П.

КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ – СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ 313

Оригинальные статьи

Ригер Н.А., Евстратова В.С., Апрятин С.А., Гмошинский И.В., Ханферьян Р.А.

ЗНАЧЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЛЕПТИНА И ГРЕЛИНА КАК БИОМАРКЕРА ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИЕТОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ У САМОК МЫШЕЙ C57Black/6J 341

Тыринова Т.В., Мишинов С.В., Леплина О.Ю., Альшевская А.А., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Калиновский А.В., Лопатникова Ю.А., Чернов С.В., Ступак В.В., Сенников С.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

РОЛЬ TNF α /TNFR1-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В РЕАЛИЗАЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРОТИВ ГЛИОБЛАСТОМНЫХ ЛИНИЙ 353

Дроздова Е.А., Хохлова Д.Ю., Мезенцева Е.А., Никушкина К.В.

ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ ПРИ ОККЛЮЗИИ ВЕН СЕТЧАТКИ НА ФОНЕ АНТИАНГИОГЕННОЙ ТЕРАПИИ 365

Гольцов С.В., Гольцова Е.Н., Сухолей Ю.Г., Костоломова Е.Г., Паульс В.Ю.

ЦИТОИММУНОГРАММА КОЖИ – НОВЫЙ МЕТОД ОБЪЕКТИВНОЙ ЦИФРОВОЙ ОЦЕНКИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА КЛЕТОК КОЖИ 373

Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Мозушкова Х.А., Кит О.И.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 383

Куртасова Л.М., Савченко А.А., Зуков Р.А., Толмачева Т.В.

ФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ДО И ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ 391

Шульгинова А.А., Конопля А.И., Быстрова Н.А., Гаверилук В.П., Караулов А.В.

КОРРЕКЦИЯ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА 401

Краткие сообщения

Емельянов А.С., Емельянова А.Н., Пушкарев Б.С., Витковский Ю.А.

ПОЛИМОРФИЗМ ПРОМОТОРНОГО РЕГИОНА rs1800629 ГЕНА TNF α И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА СОДЕРЖАНИЕ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ РОЖЕЙ 411

Лапштаева А.В., Сычев И.В., Гончарова Л.Н.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 α (rs1800587 5' UTR ОБЛАСТИ ГЕНА) С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ 417

Буданова Е.В., Свитич О.А., Шуленина Е.А., Зверев В.В.

АССОЦИАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА TLR2, TLR4, TLR9 С ТЕЧЕНИЕМ ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE IN VIVO* 425

Савченко А.А., Дудина М.А., Борисов А.Г., Догадин С.А., Кудрявцев И.В., Мошев А.В., Маньковский В.А.

ВЛИЯНИЕ ХЕЛПЕРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ В-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА 431

Мудров В.П., Нелюбин В.Н., Воробьева Е.С., Лысюк Е.Ю., Мяндиев М.С., Фоменков И.С., Иванов С.Ю.

ПРИМЕНЕНИЕ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ В ТЕРАПИИ ПАРОДОНТИТА 439

Дневник иммунолога 445

Правила для авторов 451

Авторский указатель 454

Предметный указатель 454

CONTENTS

History of Science

Nazarov P.G., Freydlin I.S.

FUNDAMENTAL STUDIES IN BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY PERFORMED BY ACADEMICIAN V.I. IOFFE (TO THE 120 TH ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF ACADEMICIAN V.I. IOFFE)	295
---	-----

Reviews

Malashenkova I.K., Krynskiy S.A., Mamoshina M.V., Didkovskiy N.A.

APOE GENE POLYMORPHISM: THE IMPACT OF APOE4 ALLELE ON SYSTEMIC INFLAMMATION AND ITS ROLE IN THE PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE.....	303
---	-----

Lezhnin Yu.N., Khristichenko A.Yu., Ratnikova N.M., Kravchenko Yu.E., Chumakov S.P.

CELLULAR IMMUNOTHERAPY: A MODERN APPROACH TO TREATMENT OF ONCOLOGICAL DISEASES	313
--	-----

Original articles

Riger N.A., Evstratova V.S., Apryatin S.A., Gmoshniskiy I.V., Khanferyan R.A.

IMPORTANCE OF THE LEPTIN/GRELIN RATIO AS A BIOMARKER IN DIETARY INDUCED HYPERLIPIDEMIA IN FEMALE C57Black/6 MICE	341
---	-----

Tyrinova T.V., Mishinov S.V., Leplina O.Yu., Alshevskaya A.A., Kurochkina Yu.D., Oleynik E.A., Kalinovskiy A.V., Lopatnikova Yu.A., Chernov S.V., Stupak V.V., Sennikov S.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

ROLE OF TNF α /TNF-R1-SIGNALING PATHWAY IN CYTOTOXIC ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS AGAINST GLIOBLASTOMA CELL LINES	353
--	-----

Drozdova E.A., Khokhlova D.Yu., Mezentseva E.A., Nikushkina K.V.

STUDIES OF SYSTEMIC AND LOCAL CYTOKINE LEVEL IN RETINAL VEIN OCCLUSION ASSOCIATED WITH ANTIANGIOGENIC THERAPY.....	365
---	-----

Goltsov S.V., Goltsova E.N., Sukhovey Yu.G., Kostolomova E.G., Pauls V.Yu.

CYTOIMMUNOGRAM OF THE SKIN: A NEW METHOD FOR OBJECTIVE EVALUATION OF THE SKIN CELL SUBPOPULATION PROFILE	373
--	-----

Vodolazhskiy D.I., Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A., Kit O.I.

TRANSCRIPTIONAL PROFILE OF CANCER-TESTICULAR ANTIGENS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER	383
--	-----

Kurtasova L.M., Savchenko A.A., Zukov R.A., Tolmacheva T.V.

ENZYME PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH THE RENAL CELL CARCINOMA BEFORE AND AFTER SURGICAL	391
---	-----

Shulginova A.A., Konoplya A.I., Bystrova N.A., Gavriiliuk V.P., Karaulov A.V.

CORRECTION OF IMMUNE DISTURBANCES IN CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA	401
--	-----

Short communications

Emelyanov A.S., Emelyanova A.N., Pushkarev B.S., Vitkovskiy Yu.A.

PROMOTER REGION rs1800629 TNF α POLYMORPHISM AND ITS INFLUENCE ON TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA CONCENTRATION IN BLOOD OF HEALTHY INDIVIDUALS AND PATIENTS WITH ERYSIPELAS	411
--	-----

Lapshtaeva A.V., Sychev I.V., Goncharova L.N.

ASSOCIATION OF INTERLEUKIN-1 α GENE POLYMORPHISM (ENCODED REGION rs1800587 5' UTR) WITH EFFICIENCY OF IN VITRO FERTILIZATION.....	417
---	-----

Budanova E.V., Svitich O.A., Shulenina E.A., Zverev V.V.

ASSOCIATION OF TLR2, TLR4, TLR9 GENE EXPRESSION RELATED TO INNATE IMMUNITY WITH IN VIVO ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS CAUSED BY KLEBSIELLA PNEUMONIAE	425
---	-----

Savchenko A.A., Dudina M.A., Borisov A.G., Dogadin S.A., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V., Mankovskiy V.A.

EFFECTS OF HELPER AND REGULATORY CELLS UPON PHENOTYPIC COMPOSITION OF BLOOD B LYMPHOCYTES AND THYROID GLAND IN GRAVES' DISEASE.....	431
--	-----

Mudrov V.P., Nelyubin V.N., Vorobieva E.S., Lysiuk E.Yu., Miandiev M.S., Fomenkov I.S., Ivanov S.Yu.

THE USE OF GROWTH FACTORS IN PERIODONTITIS TREATMENT	439
--	-----

Chronicle	445
-----------------	-----

Instructions to Authors	451
-------------------------------	-----

Author index	454
--------------------	-----

Subject index.....	454
--------------------	-----

ОСНОВЫ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ АКАДЕМИКА В.И. ИОФФЕ (К 120-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АКАДЕМИКА В.И. ИОФФЕ)

Назаров П.Г.¹, Фрейдлин И.С.^{1,2}

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. В 2018 г. исполняется 120 лет со дня рождения корифея отечественной иммунологии академика Владимира Ильича Иоффе. Реальные, мирового уровня, достижения академика В.И. Иоффе, его несомненный приоритет в важнейших областях фундаментальной иммунологии достойны признания и интереса иммунологов. В.И. Иоффе был прозорлив и точен в научном предвидении. Ему принадлежит ряд открытий, научная и практическая значимость которых была оценена лишь в последующие 50 лет развития иммунологии. Вклад В.И. Иоффе в науку равновелик вкладу виднейших нобелевских лауреатов. Академик В.И. Иоффе рассматривал иммунопатологию как следующий этап в развитии общей иммунологии, что позволяет использовать в иммунопатологии все достижения фундаментальной иммунологии. Академик Владимир Ильич Иоффе заслуженно считается основателем отечественной клинической иммунологии. В.И. Иоффе были сформулированы задачи клинической иммунологии, вытекающие из интересов и запросов клиницистов. В.И. Иоффе было сформулировано требование, которое он относил к любому клинико-иммунологическому исследованию: необходимость сопоставления результатов иммунологических тестов с клиническим течением заболевания. Все сформулированные и обоснованные академиком В.И. Иоффе требования к проведению иммунологической лабораторной диагностики сохранили свою актуальность до наших дней.

Ключевые слова: фундаментальная иммунология, клиническая иммунология, иммунологическая диагностика, иммунопатология

Адрес для переписки:

Фрейдлин Ирина Соломоновна
ФГБУ «Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-94-89.
E-mail: irinaf-n@yandex.ru

Address for correspondence:

Freydlin Irina S.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-94-89.
E-mail: irinaf-n@yandex.ru

Образец цитирования:

П.Г. Назаров, И.С. Фрейдлин «Основы фундаментальной и клинической иммунологии в исследованиях академика В.И. Иоффе (К 120-летию со дня рождения академика В.И. Иоффе)» // *Медицинская иммунология*, 2018. Т. 20, № 3. С. 295-302. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-295-302

© Назаров П.Г., Фрейдлин И.С., 2018

For citation:

P.G. Nazarov, I.S. Freydlin "Fundamental studies in basic and clinical immunology performed by Academician V.I. Joffe (To the 120th anniversary of the birth of academician V.I. Joffe)", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 295-302. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-295-302

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-295-302

FUNDAMENTAL STUDIES IN BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY PERFORMED BY ACADEMICIAN V.I. IOFFE (TO THE 120th ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF ACADEMICIAN V.I. IOFFE)

Nazarov P.G.^a, Freydlin I.S.^{a, b}

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

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

Abstract. In 2018, we celebrate the 120th anniversary of Academician, Professor Vladimir I Ioffe, a leading figure of national immunology. The world-level achievements of V.I.Ioffe in research, his undisputed priority in the most important areas of fundamental immunology are worth of recognition and interest among the immunologists. V.I.Ioffe was far-seeing and precise in his scientific prescience. He has authored a number of discoveries which were proved to be of fundamental and practical significance over 50 succeeding years. The scientific contribution of V.I.Ioffe is considered equal to achievements of the most illustrious Nobel Prize winners. Academician V.I.Ioffe regarded the immune pathology as a next step in development of general immunology, thus allowing applications of general fundamental immunology to the tasks of immune pathology. Vladimir I. Ioffe is rightly seen as a founder of native clinical immunology. He has formulated the tasks of clinical immunology as based on interests and requirements of clinicians. Vladimir I.Ioffe has presented a condition which he related to any study in clinical immunology, i.e., a need for comparisons between the results of immunological testing and clinical course of the disease. All the requirements in immune laboratory diagnostics, having been proposed and established by the Academician Vladimir I. Ioffe, have kept their significance up to the present day.

Keywords: basic immunology, clinical immunology, immunological diagnostics, immunopathology

Академик Владимир Ильич Иоффе (1898-1979) заслуженно считается основателем отечественной клинической иммунологии. Обобщая собственные исследования, проведенные совместно с клиницистами, Владимир Ильич Иоффе в 1963 г. впервые предложил определение клинической иммунологии (иммунопатологии) как самостоятельной науки: «Иммунопатологию следует рассматривать как раздел иммунологии, предмет изучения которого составляют патологические реакции организма и заболевания, возникновение и развитие которых обусловлено иммунологическими факторами и механизмами» [9]. Правомерность выделения иммунопатологии как самостоятельного раздела иммунологии оспаривалось аллергологами на основании того, что в основе иммунопатологических процессов «лежат реакции аллергического характера» [7]. В.И. Иоффе отвечал оппонентам: «В иммунопатологию включаются и аллергические

реакции на экзогенные антигены, повышенная чувствительность не противопоставляется иммунитету, напротив, противоположные по знаку иммунологические явления рассматриваются в их единстве» [10].

В 1971 г. В.И. Иоффе оценивает этапы развития иммунопатологии. Современная иммунопатология возникла как клиническая проблема, которая нуждалась в иммунологическом анализе фактов и явлений. На первом этапе были предприняты попытки классификации заболеваний, которые характеризовались как «аутоиммунные». Академиком В.И. Иоффе была предложена классификация заболеваний, относящихся к области иммунопатологии, которая учитывает выраженность аутоиммунного характера заболеваний, характер и особенности иммунологических механизмов патологического процесса. В этой классификации особое место занимают «коллагеновые болезни». В отношении заболеваний этой

группы не ясны условия приобретения аутоантигенности конкретными веществами. На втором этапе произошли дифференцировка и уточнение понятий «аутоиммунные» и «иммунопатологические». На третьем этапе начинается изучение и характеристика непосредственных иммунологических факторов, ведущих к развитию иммунопатологических процессов [10]. Более широкий взгляд В.И. Иоффе на содержание клинической иммунологии проявился в том, что он включил в сферу интересов клинических иммунологов «заболевания иммунологической недостаточности». Он предложил рассматривать клиническую иммунологию в двух аспектах: в одном речь идет о дефектах и болезнях самой иммунной системы (согласно современной классификации, иммунодефициты), содержанием исследований второго аспекта является иммунологическая характеристика различных по этиологии и природе заболеваний [11].

Тогда же В.И. Иоффе были сформулированы задачи клинической иммунологии, обоснованные интересами и запросами клиницистов: «доказательство наличия иммунопатологического компонента патогенеза данного заболевания, выяснение характера этого компонента и его роли в заболевании и определение клинического значения полученных данных для общей оценки болезни и тенденций ее развития» [3]. В.И. Иоффе неоднократно возвращался к вопросу «о задачах и возможностях клинико-иммунологических исследований» [4]. Он настаивал на конкретности результатов клинико-иммунологического исследования, критически оценивая неопределенные заключения: «Имеющиеся в литературе ссылки на "нарушение нормального иммунологического гомеостаза" нельзя рассматривать как исчерпывающий и удовлетворяющий ответ» [3].

Опираясь на результаты исследований сотрудников отдела иммунологии ИЭМа, В.И. Иоффе провел критический анализ иммунологических методов, доступных в 60-70-е годы диагностическим иммунологическим лабораториям. Он высоко оценил возможности иммуноморфологических исследований с помощью иммунолюминесцентного метода для исследования образцов пораженных тканей, полученных при биопсии [2]. «Большое значение иммунофлуоресцентного метода подтверждает необходимость его значительного развития». Со свойственной ему дальновидностью В.И. Иоффе обратил внимание на «начатые исследования по выявлению сенсibilизированных лимфоцитов в лейкоцитарной пленке крови с помощью антигенов, ко-



ньюгированных с флюорохромом». Этот метод можно считать предтечей современных методов фенотипирования клеток крови с помощью вариантов цитофлуориметрии.

Положительную оценку В.И. Иоффе заслужила и предложенная «проба на бласттрансформацию» для оценки пролиферативной активности лимфоцитов, но при условии «учета, который должен опираться на увеличение продукции ДНК». В.И. Иоффе приходит к выводу: «Решение задачи требует во многих отношениях новых количественных методов исследования» [3]. Такие новые количественные методы появились в последующие годы: радиометрический метод и цитофлуориметрический количественный учет интенсивности синтеза ДНК в клетках, оценка распределения клеток по фазам цикла пролиферации.

Для выявления сенсibilизации клеток лимфоидной системы *in vitro* В.И. Иоффе прогнозировал возможность использования реакции торможения миграции макрофагов, которая была разработана в отделе [1]. Тест позволяет оценить реакцию клеток иммунной системы *in vitro* при встрече с соответствующим антигеном. При легочном туберкулезе было показано соответствие

между активностью процесса и подавлением миграции лейкоцитов.

Распространенное в те годы серологическое исследование (реакция Штеффена) для определения неполных противотканевых аутоантител детально анализируется В.И. Иоффе: критически оцениваются диагностические возможности и их ограничения. Были подвергнуты анализу результаты обширного клинико-иммунологического исследования: на протяжении нескольких лет было исследовано 4000 сывороток от значительного числа больных различными заболеваниями, в которых предполагалось участие иммунопатологического компонента. Одновременно было исследовано более 1000 сывороток практически здоровых людей. В.И. Иоффе пришел к выводу, что «при тщательной постановке с учетом контрольных данных, дифференцированных в отношении возраста обследуемых, при надлежащем клинико-иммунологическом анализе можно использовать полученные данные для оценки отдельного заболевания». Одновременно сделано заключение о «насушной необходимости в более точной реакции» [10].

При анализе результатов серологических исследований В.И. Иоффе было сформулировано требование, которое он относил к любому клинико-иммунологическому исследованию: необходимость сопоставления результатов иммунологических тестов с клиническим течением заболевания. «Имунологические показатели должны оцениваться в динамике развития заболевания в сопоставлении с клиническим течением» [5, 6]. В качестве примера В.И. Иоффе рассматривает оценку прогноза течения ревматоидного артрита на основании динамики титров ревматоидного фактора. В исследовании сотрудников отдела совместно с клиницистами (Е. Сергель, О. Родштейн) было показано, что высокие титры ревматоидного фактора учащаются с каждой последующей стадией болезни, нарастают в каждой стадии по мере повышения активности процесса [4].

В.И. Иоффе была обоснована очередная задача — разработка метода для количественного определения в крови иммунных комплексов с определением их состава, задача «улавливать» иммунные комплексы посредством специального серологического метода и изучать динамику их формирования в течении болезни.

Задача эта была решена при активном участии сотрудников отдела. Разработанный метод получил широкое распространение в диагностических иммунологических лабораториях, где применяется до сих пор.

На основании анализа результатов исследований сотрудников отдела, учеников и последователей академиком В.И. Иоффе были сформулированы требования к проведению клинико-иммунологических исследований и к используемым методам (тестам). Важнейшим требованием является иммунологическая специфичность, которая обеспечивается одновременным изучением контрольных образцов. «Результаты исследования могут быть учтены лишь при абсолютной уверенности в их иммунологической специфичности, что достигается одновременным проведением необходимых контрольных исследований». «При каждой постановке реакции нужно включать наряду с образцами от исследуемых больных значительное количество контрольных образцов, заменяя их новыми при следующем опыте. Нельзя ограничиваться небольшим количеством отобранных «стандартных» контрольных образцов, дающих отрицательные результаты». При выборе контрольных образцов необходимо добиться соответствия доноров и больных по полу и возрасту. Следующее требование — «любой разработанный тест должен быть доведен до той степени стандартности, которая необходима в клинико-иммунологических исследованиях, особенно, если речь идет не о групповой, а об индивидуальной характеристике больного» [3]. Еще одно обязательное требование: параллельное использование нескольких иммунологических тестов с обязательным сопоставлением полученных результатов. «Должно оцениваться сочетание иммунологических показателей в динамике». В этой связи им был предложен термин «иммунограмма», который впоследствии получил права гражданства и используется до сих пор [18]. Выбор материала для исследования диктуется патогенетическими особенностями заболевания, стадией клинического течения, острым или хроническим характером течения, интересами клиницистов [3].

Академик В.И. Иоффе призывал с большой осторожностью оценивать патогенетическую значимость полученных результатов иммунологических исследований. В качестве примера он описывает исследование, результаты которого показали появление сердечного антигена в крови у больных инфарктом миокарда, корреляцию его концентрации с обширностью некроза. Возможность прогностического использования этого показателя была поставлена под сомнение при сопоставлении с другими иммунологическими показателями: у тех же больных отсутствовали циркулирующие иммунные комплексы [3].

Академик В.И. Иоффе рассматривал иммунопатологию как следующий этап в развитии общей иммунологии, что позволяет использовать в иммунопатологии все достижения фундаментальной иммунологии.

Исследования В.И. Иоффе в области фундаментальной иммунологии заслуживают отдельного описания.

В 1940-е гг. В.И. Иоффе было опубликовано несколько работ, каждая из которых открывала совершенно новую главу в биологической науке, превосходящая и опережала на пару десятилетий будущие ярчайшие открытия, но была абсолютно неожиданной для современного ему научного мировоззрения и осталась в общем незамеченной.

В 1943 г. он опубликовал в ЖМЭИ статью по результатам исследований, выполненных еще в блокадном Ленинграде [14]. В этой работе впервые в мировой иммунологии был поставлен и решен положительно вопрос о, говоря современным языком, вариативности антител разной специфичности. Точнее, об антигенном отличии друг от друга антител, индуцированных разными антигенами. В 1943 г. еще не было известно строение IgG (Нобелевская премия за расшифровку IgG была присуждена Портеру и Эдельману только через 28 лет, в 1972-м), еще ничего не знали не только о «вариативности» аминоконцевых частей Н- и L-цепей, но даже о существовании самих этих цепей. Между тем, В.И. Иоффе поставил вопрос о вероятности антигенного своеобразия каждого нового антитела (антитела к новому антигену) и показал, что, да, у антител к конкретному антигену есть своя, оригинальная антигенность, и к этим антителам могут быть получены «анти-антитела». В.И. Иоффе был прозорлив и точен в предвидении, пунктуален в постановке опытов, но был осторожен в использовании терминов. В статье 1943 года он писал фактически об анти-антителах, но ни разу не употребил этот термин. Название «анти-антитела» также появится лишь спустя два десятилетия и будет пущено в обиход не им.

В опытах по индукции образования антиантител В.И. Иоффе использовал простейшую схему: кроликов иммунизировали бараньей «тифозной» сывороткой (т.е. сывороткой барана, иммунизированного микробами *S. typhi*), а полученную антисыворотку проверяли на наличие анти-антител с помощью реакции связывания комплемента (РСК) (кстати, В.И. Иоффе принадлежит важное усовершенствование метода РСК, состоящее в добавлении «холодовой» инкубации сыворотки с антигеном в течение ночи при

+ 4 °С, что значительно повышало чувствительность РСК) [15]. Эти опыты впервые показали, что антитела, которые вырабатывали иммунизированные кролики, реагировали в РСК не только с бараньей «тифозной» сывороткой (непосредственным иммуногеном), но также с кроличьими «тифозными» сыворотками, т.е. с сыворотками кроликов, иммунизированных микробами *S. typhi* (позже выяснилось, что и с сыворотками мышей, иммунных к *S. typhi*), но не реагировали с бараньими и кроличьими сыворотками к другим антигенам.

Когда через 20 с лишним лет после публикации 1943-го года в мировой литературе началась бурная дискуссия об анти-антителах, В.И. Иоффе вернулся к своим старым опытам, продолжил их и опубликовал несколько новых статей [8, 12, 13], в которых анализировал свои и чужие подходы и результаты. Методическое отличие опытов В.И. Иоффе 1940-х от опытов зарубежных авторов 1960-х состояло в том, что иностранные исследователи 1960-х — начала 1970-х гг. индуцировали анти-антитела введением иммунного комплекса, а анти-антитела оценивали в реакции преципитации, тогда как В.И. Иоффе иммунизировал животных не специально сконструированными иммунными комплексами, а непосредственно иммунными сыворотками и использовал иной метод для регистрации анти-антител — РСК. Что касается результатов, то отличие состояло в том, что в первом случае анти-антитела были строго анти-идиотипическими, т.е. направленными на идиотипические детерминанты иммуногена (конкретного антитела, использованного для иммунизации), и реагировали только с ним, но ни с какими другими иммуноглобулинами и ни с какими другими антителами этой же специфичности. Тогда как у В.И. Иоффе, при его схеме иммунизации, анти-антитела взаимодействовали с антителами любого вида животных, главное — чтобы антитела были той же специфичности, что и иммуноген. Сегодня ясно, что результаты исследований В.И. Иоффе фактически расширили словарь эпитопов вариативной части молекулы антител, добавив в него новый, никем не описанный ни в 1960-е годы, ни впоследствии (но не названный и самим В.И. Иоффе) «ксено-эпитоп», — как можно обозначить то, с чем впервые в мире столкнулся В.И. Иоффе — некую конформационную детерминанту N-концевой части молекулы иммуноглобулина любого вида животного (близ антигенсвязывающего центра), характерную для конкретной антигенспецифической укладки легкой и тяжелой цепей антитела.

Спустя десятилетия, когда мир «дорос» и новые иммунологи заново повторяли его находки, В.И. Иоффе попытался отстоять свой приоритет [8, 12, 13], но был встречен пресыщенной анти-антителами и уже начавшей разочаровываться в их перспективности литературой как отстающий, предлагающий, к тому же, далекие от аутоиммунитета «ксено-отношения». Большой иммунологический мир, ослепленный блистательным теоретиком Н.К. Эрне [20], встретил В.И. Иоффе равнодушно.

Принцип, положенный В.И. Иоффе в основу детекции анти-антител, он сам использовал в 1970-е гг. для изучения антигенспецифичных клеточных рецепторов при гиперчувствительности замедленного типа [1].

Иммунологический подход, использованный для выявления анти-антител, В.И. Иоффе применил еще в одной области. В 1950-е была не ясна природа С-реактивного протеина (CRP). Является ли этот белок антителом или нет? Закономерности его появления в крови у больных острыми воспалительными заболеваниями допускали возможность принадлежности CRP к антителам.

40 лет назад, в 1958 г., вышла в свет работа В.И. Иоффе и Л.М. Хай [16], ознаменовавшая новый взгляд на механизмы регуляции острой фазы воспаления и иммуногенеза. Исследование, проведенное на кроликах, показало, что иммунная реакция и реакция острой фазы воспаления (которую оценивали по появлению в крови С-реактивного белка) взаимосвязаны лишь в том случае, когда обе вызваны антигенными раздражителями, но могут протекать и независимо друг от друга, если индуктором острой фазы является неиммуногенное вещество. С современных позиций это означает, что системный острофазовый ответ может быть индуцирован двумя независимыми путями, один из которых связан с иммуногенезом, другой – нет. Позже к этому выводу пришли и другие исследователи [19].

В цитируемой работе 1959 г. В.И. Иоффе и Л.М. Хай был затронут еще один аспект биологии CRP – вопрос о наличии у CRP полиморфизма, подобного идиотипическому полиморфизму антител. Вызывают ли разные острофазовые индукторы образование антигенно различающихся С-реактивных белков, т.е. свойственно ли этому белку антигенное (идиотипическое) разнообразие? Результаты исследования дали четкий ответ: CRP не обладает таким полиморфизмом. Острофазовую реакцию индуцировали у кроликов тремя способами: стрептококковой инфекцией, введением коклюшной вакцины или воспроиз-

ведением феномена Шварцмана. Острофазовыми сыворотками кроликов иммунизировали крыс. Проверка крысиных сывороток показала, что каждая из них реагировала не только с гомологичным антигеном (то есть сывороткой, применявшейся для иммунизации), но и с сыворотками любых других кроликов, в которых содержался CRP. Истошение крысиных антисывороток кроличьими острофазовыми сыворотками подтвердило антигенную идентичность CRP: всякая крысиная иммунная сыворотка против CRP истошалась любой кроличьей острофазовой сывороткой [16].

Таким образом, В.И. Иоффе решил вопрос однозначно, он установил: С-реактивный белок кардинально отличается от антител отсутствием у него той варибельности, которой, как он уже знал, обладают антитела, индуцированные разными веществами. В настоящее время отсутствие гетерогенности (варибельности, идиотипического разнообразия) у CRP подтверждено секвенационными данными и данными о структуре гена этого белка.

Еще одним важнейшим достижением В.И. Иоффе в области фундаментальной иммунологии является его открытие того, что впоследствии было открыто заново и получило название «австралийского» антигена [17]. Феномен был открыт с помощью так называемого внутреннего серологического анализа, также разработанного В.И. Иоффе и широко применявшегося им для анализа динамики антигена и антител в крови больных инфекционными заболеваниями (сыворотки, взятые на отдаленных сроках заболевания (30-е, 40-е, 50-е дни) использовались для выявления антигена в сыворотках более ранних сроков).

Научное наследие академика Владимира Ильича Иоффе насчитывает более 150 работ, в том числе более 10 монографий.

Реальные, мирового уровня, достижения В.И. Иоффе, его несомненный приоритет в важнейших областях фундаментальной иммунологии (всемирному признанию которого помешал лишь «железный занавес») продолжают вызывать к иммунологам, историкам науки и к обществу: надо признать заслуги В.И. Иоффе и внести его имя в золотой фонд абсолютных рекордсменов науки. Его имя должно стоять рядом с именами пионера космонавтики К.Э. Циолковского, автора периодической таблицы химических элементов Д.И. Менделеева, всемирно известного И.И. Мечникова, русского отца радио А.С. Попова и других. Вклад В.И. Иоффе в науку равно велик вкладу виднейших нобелевских лауреатов.

Список литературы / References

1. Артемова А.Г., Иоффе В.И. К изучению специфических клеточных рецепторов при гиперчувствительности замедленного типа // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1975. № 1. С. 19-25. [Artemova A.G., Ioffe V.I. Study of specific cellular receptors in delayed type hypersensitivity. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1975, no. 1, pp. 19-25. (In Russ.)]
2. Зубжицкий Ю.Н. Метод люминесцентной микроскопии. Л.: Медицина, 1964, 151 с. [Zubzhitsky Yu.N. A method of luminescent microscopy]. Leningrad: Medicine, 1964. 151 p.
3. Иоффе В.И. Вопросы методологии клинико-иммунологического исследования в связи с прогнозированием течения болезни // Вестник АМН СССР, 1979. № 2. С. 3-11. [Ioffe V.I. Methodological issues of studies in clinical immunology aiming for prediction of clinical course. *Vestnik AMN SSSR = Bulletin of the Academy of Medical Sciences of the USSR*, 1979, no. 2, pp. 3-11. (In Russ.)]
4. Иоффе В.И. Задачи и перспективы иммунологического исследования в области ранней диагностики ревматизма и коллагеновых болезней // Вопросы ревматизма, 1971. № 3. С. 15-21. [Ioffe V.I. Tasks and prospectives of immunological studies in the early diagnostics of rheumatic and collagen diseases. *Voprosy revmatizma = Problems of Rheumatism*, 1971, no. 3, pp. 15-21. (In Russ.)]
5. Иоффе В.И. Иммунология ревматизма. Л.: Медгиз, 1962. 356 с. [Ioffe V.I. Immunology of rheumatic disease]. Leningrad: Medgiz, 1962. 356 p.
6. Иоффе В.И. Клиническая и эпидемиологическая иммунология. Л.: Медицина, 1968. 373 с. [Ioffe V.I. Clinical and epidemiological immunology]. Leningrad: Medicine, 1968. 373 p.
7. Иоффе В.И. Клиническая иммунопатология – предмет изучения, задачи и основы иммунологических исследований // Терапевтический архив, 1969. № 3. С. 21-32. [Ioffe V.I. Clinical immune pathology as a research subject: tasks and fundamentals of immunological studies. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 1969, no. 3, pp. 21-32. (In Russ.)]
8. Иоффе В.И. Навстречу столетию научной иммунологии: о новом и старом. В кн.: Вопросы инфекционной патологии и иммунологии. Вып. 5. Под ред. О. В. Барояна. М.: Медицина, 1976. С. 15-36. [Ioffe V.I. Towards the centennial of scientific immunology: the new and the old. In: *Problems of infectious pathology and immunology*. Issue 5. Ed. O.V. Baroyan]. Moscow: Medicine, 1976, pp. 15-36.
9. Иоффе В.И. О некоторых задачах исследования по экспериментальной и клинической иммунопатологии // Вестник АМН СССР, 1967. № 2. С. 3-10. [Ioffe V.I. On certain research tasks in experimental and clinical immune pathology. *Vestnik AMN SSSR = Bulletin of the Academy of Medical Sciences of the USSR*, 1967, no. 2, pp. 3-10. (In Russ.)]
10. Иоффе В.И. О пройденном и очередном в проблеме иммунопатологии // Вестник АМН СССР, 1971. № 1. С. 3-9. [Ioffe V.I. Past and pending issues in immune pathology. *Vestnik AMN SSSR = Bulletin of the Academy of Medical Sciences of the USSR*, 1971, no. 1, pp. 3-9. (In Russ.)]
11. Иоффе В.И. Экспериментальная и клиническая иммунопатология // Вестник АМН СССР, 1974. № 2. С. 16-23. [Ioffe V.I. Experimental and clinical immunopathology. *Vestnik AMN SSSR = Bulletin of the Academy of Medical Sciences of the USSR*, 1974, no. 2, pp. 16-23. (In Russ.)]
12. Иоффе В.И., Розенталь К.М. Анти-антитела. Сообщение 1. Получение анти-антител и некоторые условия их образования // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1974, № 1. С. 5-12. [Ioffe V.I., Rozental K.M. Anti-antibodies. I. Obtaining anti-antibodies and some conditions required for their formation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1974, no. 1, pp. 5-12. (In Russ.)]
13. Иоффе В.И., Розенталь К.М. Анти-антитела. Сообщение 2. Иммунологические закономерности продукции анти-антител, анти-антитела к аутологичным антителам // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1974. № 3. С. 3-16. [Ioffe V.I., Rozental K.M. Anti-antibodies. II. Immunologic characteristics of anti-antibody production, anti-antibodies to autologous antibodies. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1974, no. 3, pp. 3-16. (In Russ.)]
14. Иоффе В.И., Розенталь К.М. К вопросу о специфической антигенной функции иммунных сывороток. ЖМЭИ, 1943, № 12, с. 14-18. [Ioffe V.I., Rozental K.M. To the question of the specific antigenic function of immune sera. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1943, no. 12, pp. 14-18. (In Russ.)]
15. Иоффе В.И., Розенталь К.М. Экспериментальные материалы к объяснению большей чувствительности метода длительного холодного связывания // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1940. № 4. С. 65-69. [Ioffe V.I., Rozental K.M. Experimental materials to explain the greater sensitivity of the method of prolonged cold binding. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1940, no. 4, pp. 65-69. (In Russ.)]
16. Иоффе В.И., Хай Л.М. К изучению серологии воспалительных процессов. Об «острофазовой» реакции // Ежегодник Института экспериментальной медицины АМН СССР. Л., 1959. С. 238-252. [Ioffe V.I.,

Khai L.M. To study the serology of inflammatory processes. On the "acute phase" reaction. *Ezhegodnik Instituta eksperimentalnoy meditsiny AMN SSSR = Yearbook of the Institute of Experimental Medicine of the Academy of Medical Sciences of the USSR, 1959, pp. 238-252. (In Russ.)*

17. Иоффе В.И., Хай Л.М. По вопросу так называемого австралийского антигена (Некоторые вопросы частной и общей инфекционной патологии) // Вопросы вирусологии, 1973. № 4. С. 496-503. [Ioffe V.I., Khai L.M. Apropos of so-called Australia antigen (Some problems of individual and general infectious pathology). *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 1973, no. 4, pp. 496-503. (In Russ.)*]

18. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. М.: Наука, 1990. 224 с. [Lebedev K.A., Ponyakina I.D. Immunogram in clinical practice]. Moscow: Science, 1990. 224 p.

19. Baltz M.L., Simons D., Simpson W., Gomer K., Davies A.J.S., Pepys M.B. The acute phase reactin in experimental infections. Role of the specific host immunological response and different patterns in different acute phase reactants. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 1982, Vol. 389, pp. 427-428.*

20. Jerne N.K. The Generative grammar of the immune system. Nobel lecture, 8 December 1984.

Авторы:

Назаров П.Г. — д.м.н., профессор, руководитель отделения иммунологии ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Фрейдлин И.С. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины»; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, кафедра иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Nazarov P.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Freydlin I.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 20.12.2017

Отправлена на доработку 25.12.2017

Принята к печати 28.12.2017

Received 20.12.2017

Revision received 25.12.2017

Accepted 28.12.2017

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АРОЕ: ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЯ АРОЕ4 НА СИСТЕМНОЕ ВОСПАЛЕНИЕ И ЕГО РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Малашенкова И.К.^{1,2}, Крынский С.А.^{1,2}, Мамошина М.В.^{1,3},
Дидковский Н.А.²

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

² ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России», Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва, Россия

Резюме. ApoE – белок семейства липопротеинов, наиболее высокий уровень его экспрессии отмечается в печени и в центральной нервной системе (ЦНС). ApoE секретируется астроцитами, микроглией, нейронами, а также иммунокомпетентными клетками, включая лимфоциты, моноциты и макрофаги. Согласно данным последних лет, этот белок, помимо участия в обмене липидов в ЦНС, имеет эндотелиотропные функции (индуцирует синтез NO-синтазы, уменьшает адгезию моноцитов к эндотелию), а также оказывает иммуномодулирующее действие: подавляет воспалительную активацию фагоцитов и антиген-стимулированную пролиферацию Т-клеток. Полиморфный аллель *APOE4* гена *APOE* – основной генетический фактор риска болезни Альцгеймера, повышающий вероятность заболевания более чем в 3 раза. Белок, кодируемый данным аллелем, имеет измененную функциональную активность. Механизмы, способствующие более раннему развитию нейродегенерации у носителей полиморфизма, связаны с рядом факторов, среди которых нарушение обмена липидов в ЦНС, предрасположенность к формированию нейротоксичных олигомеров амилоида-бета, замедленный клиренс амилоида-бета из ЦНС, нарушение регуляции иммунных процессов в ЦНС. В настоящем обзоре рассматриваются современные представления о функциях белка ApoE в центральной нервной системе и иммунной системе, описываются изменения функциональной активности белка у носителей аллеля *APOE4*. Приводятся данные о влиянии полиморфизма гена *APOE* на фенотип моноцитов человека и их воспалительную активацию, метаболизм амилоида-бета, на специфический клеточный ответ к антигенам амилоида-бета и на проявления нейровоспаления при болезни Альцгеймера. Обсуждается возможное участие иммунотропных эффектов ApoE в формировании повышенного риска болезни Альцгеймера, характерного для носителей *APOE4*.

Ключевые слова: амилоид-бета, болезнь Альцгеймера, воспаление, иммунный ответ, нейродегенерация, ApoE

Адрес для переписки:

Крынский Сергей Андреевич
Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт»
123182, Россия, Москва,
площадь академика Курчатова, 1.
Тел.: 8 (499) 196-95-39.
Факс: 8 (499) 196-17-04.
E-mail: srgkr002@gmail.com

Address for correspondence:

Krynskiy Sergey A.
National Research Center “Kurchatov Institute”
123182, Russian Federation, Moscow, Acad. Kurchatov
Square, 1.
Phone: 7 (499) 196-95-39.
Fax: 7 (499) 196-17-04.
E-mail: srgkr002@gmail.com

Образец цитирования:

И.К. Малашенкова, С.А. Крынский, М.В. Мамошина,
Н.А. Дидковский «Полиморфизм гена АРОЕ: влияние аллеля
АРОЕ4 на системное воспаление и его роль в патогенезе
болезни Альцгеймера» // Медицинская иммунология, 2018.
Т. 20, № 3. С. 303–312.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-303-312

© Малашенкова И.К. и соавт., 2018

For citation:

I.K. Malashenkova, S.A. Krynskiy, M.V. Mamoshina,
N.A. Didkovskiy “APOE gene polymorphism: the impact of APOE4
allele on systemic inflammation and its role in the pathogenesis
of Alzheimer’s disease”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 303–312.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-303-312

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-303-312

APOE GENE POLYMORPHISM: THE IMPACT OF APOE4 ALLELE ON SYSTEMIC INFLAMMATION AND ITS ROLE IN THE PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

Malashenkova I.K.^{a, b}, Krynskiy S.A.^{a, b}, Mamoshina M.V.^{a, c},
Didkovskiy N.A.^b

^a National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russian Federation

^b Federal Clinical Research Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

^c Moscow Institute of Physics and Technology (The State University), Moscow, Russian Federation

Abstract. ApoE is a member of lipoprotein family. It is the most common lipoprotein in the central nervous system (CNS), secreted by astrocytes, microglia, neurons and immunocompetent cells, including lymphocytes, monocytes and macrophages. According to recent data, it has endotheliotropic and immunomodulatory functions, regulating inflammatory activation of mononuclear phagocytes and antigen-induced lymphocyte proliferation. *APOE4* allele is a major genetic risk factor of Alzheimer's disease, with prevalence 3-12 times higher in those who have this allele. Mechanisms that predispose carriers of the allele to earlier clinical presentation of neurodegeneration include changes in lipid metabolism in the CNS, in the buildup of neurotoxic amyloid-beta oligomers, in the clearance of amyloid-beta peptides from the CNS and in regulation of immune response. In this review the functions of ApoE protein in central nervous and immune system and changes in functional activity of the protein in *APOE4* carriers are discussed. The impact of *APOE4* allele on monocyte phenotype and inflammatory activation of monocytes, on specific cell-mediated immune response to amyloid-beta antigens and on effectiveness of immunomodulatory therapy in patients with Alzheimer's disease summarized, as well as the possible role of changes in the immune response characteristic for *APOE4* carriers in the increased risk of Alzheimer's disease.

Keywords: amyloid-beta, Alzheimer's disease, inflammation, immune response, neurodegeneration, ApoE

Введение

Аполипопротеин Е (АпоЕ) – белок семейства липопротеинов, входящий в состав хиломикрон и липопротеинов промежуточной плотности. Наиболее высокий уровень его экспрессии отмечается в печени и в центральной нервной системе [52]. Ген *APOE* у человека имеет два распространенных и клинически значимых однонуклеотидных полиморфизма (SNP) в позициях 112 и 158, наследуемых кодоминантно. В зависимости от их сочетания различают три аллеля: *APOE2* (cys112, cys158), *APOE3* (cys112, arg158), *APOE4* (arg112, arg158) (табл. 1). Распространенность их варьирует в различных популяциях и составляет около 5-10%, 60-70% и 12-20% соответственно. В российской популяции распространенность аллеля *APOE4* составляет 12-13% [1, 2, 3].

Болезнь Альцгеймера (БА) – первая по частоте причина деменции у лиц старше 65 лет. Примерно в половине случаев развитию БА предшествует синдром мягкого когнитивного снижения амнестического типа (amnesic mild cognitive impairment, аМСИ). Деменция развивается в среднем у 15% больных аМСИ за 1 год и более чем у 50%

больных за 5 лет [40]. Наличие аллеля *APOE4* является наиболее важным генетическим фактором риска БА: вероятность развития БА возрастает примерно в 3 раза у носителей гетерозиготного генотипа *APOE3/APOE4* и приблизительно в 12 раз при гомозиготном генотипе *APOE4/APOE4* (по сравнению с лицами, имеющими генотип *APOE3/APOE3*). Сходным образом носительство *APOE4* влияет на риск развития БА у пациентов с аМСИ: по данным одной из работ, деменция развивается у 53% *APOE4+* пациентов с аМСИ и у 22% больных, не имеющих этого аллеля [23]. Наличие *APOE4* ассоциируется с неблагоприятными исходами при инсульте, ЧМТ и травме спинного мозга и является фактором риска когнитивного снижения после химиотерапии, при рассеянном склерозе, ВИЧ-инфекции [30, 50]. Так, показано, что у *APOE4+* пациентов отмечаются более низкие результаты по шкалам зрительной памяти и пространственного мышления при оценке через 8 лет после химиотерапии по поводу рака молочной железы или лимфомы [4]. Кроме того, в подгруппе здоровых пожилых носителей *APOE4* (средний возраст 66 лет), имеющих низ-

кий (в пределах нормы) уровень долговременной памяти, отмечается более длительное негативное воздействие на долговременную память после приема анксиолитика лоразепама [47].

Со времени обнаружения связи между полиморфизмами *APOE* и риском БА интенсивно изучается роль кодируемого этим геном белка в нормальном метаболизме ЦНС (участие в обмене липидов, влияние на метаболизм амилоида-бета [A β], нейропротективные, эндотелиотропные, иммуномодулирующие функции) и значение нарушений его функций у носителей *APOE4* в патогенезе БА. В следующем разделе будут представлены современные данные о нормальных функциях белка ApoE в ЦНС.

Синтез и функции ApoE в центральной нервной системе

В ЦНС ApoE является наиболее распространенным аполипопротеином и обеспечивает наибольший вклад в местный обмен липидов и холестерина. Всего же в ЦНС на значимом уровне экспрессируются 8 из 22 известных липопротеинов. Средний уровень ApoE в ЦНС составляет $0,3 \pm 0,2$ мг/дл [27]. Главным источником ApoE в ЦНС выступают астроциты (так, у мышей 75% астроцитов экспрессируют ApoE), меньшая часть продуцируется микроглией (у мышей – около 10% микроглии после введения каината), клетками эндими, олигодендроцитами, гладкими миоцитами сосудов ЦНС [52]. Повышение синтеза ApoE происходит в ответ на активацию рецепторов LXR (печеночные X-рецепторы) и RXR (ретиноидные X-рецепторы), сигнализирующую о повышении уровня холестерина, а также в ответ на действие транскрипционного фактора NF- κ B, участвующего в запуске воспалительного ответа. *In vivo* синтез ApoE индуцируется в ответ на повреждение нервной системы: так, при травме периферического нерва продукция ApoE местными резидентными макрофагами повышается в 100–200 раз. По современным представлениям, повышение синтеза ApoE оказывает при повреждении ЦНС нейропротективное действие и стимулирует аксональную регенерацию. В частности, ApoE участвует в перераспределении липидного материала поврежденных аксонов к регенерирующим нервным волокнам [58]. Кроме того, ApoE участвует в местной активации астроцитов, происходящей в ответ на повреждение и способствующей оптимальной нейрогенерации [17].

ApoE может синтезироваться и нейронами ЦНС, однако лишь в условиях повреждения, например, при эксайтотоксическом или гипоксическом воздействии [59]. Так, у крыс через 30 мин после экспериментально вызванного субдурального кровоизлияния ApoE обнаруживается в нейронах головного мозга, и детектируемые

уровни белка сохраняются через 2 и 4 часа. Аналогичный эффект отмечается при ишемическом воздействии: через 72 часа после транзиторной окклюзии сонных артерий у крыс ApoE обнаруживается в перикарионах и отростках пирамидных клеток гиппокампа [28]. В последние годы появились данные, что экспрессия ApoE в нейронах контролируется специфичным для этих клеток вариантом мРНК, *ApoE13* mRNA (мРНК ApoE с сохранением интрона 3), обнаруживаемым в основном в нейронах коры больших полушарий и гиппокампа. В нормальных условиях *ApoE13* mRNA локализуется почти исключительно в ядрах клеток, и трансляция белка происходит на очень низком уровне. Однако повреждающие воздействия способствуют вырезанию интрона 3 из *ApoE13* mRNA, после чего она может перемещаться из ядра в цитоплазму и подвергаться трансляции [60].

Большая часть синтезируемого в ЦНС ApoE входит в состав липопротеиновых частиц, схожих с липопротеинами высокой плотности и содержащих фосфолипиды и холестерол [34]. Эти частицы содержатся также в спинномозговой жидкости, где уровень ApoE составляет около 5 мкг/мл. Имеются данные, что метаболизм липопротеинов в ЦНС включает цикл изменений белкового и липидного состава, сравнимый с аналогичным циклом существования липопротеинов плазмы [61]. ApoE в составе липопротеиновых частиц присоединяет холестерол, взаимодействуя с клеточным рецептором ABCA1, экспрессируемым микроглией, астроцитами и нейронами. В дальнейшем холестерол транспортируется к другим клеткам, захватывается с помощью рецепторов LDLR, LRP1, VLDLR, LR8/ApoER-2 и LRP2 и может использоваться нейронами при синаптогенезе и аксональной регенерации [39]. Обмена синтезированным ApoE между ЦНС и периферическими тканями не происходит [27].

ApoE также обладает эндотелиотропными функциями: взаимодействуя с рецептором эндотелиальных клеток LR8/ApoER-2, он индуцирует такие эффекты, как синтез NO-синтазы, повышение миграционной способности эндотелиоцитов и уменьшение адгезии моноцитов к эндотелию. Однако изоформа ApoE4 обладает сниженной функциональной активностью и выступает антагонистом рецептора LR8/ApoER-2. С этим может быть связан повышенный риск атеросклероза и сердечно-сосудистых расстройств, характерный для носителей *APOE4* [52].

Еще одна недавно описанная функция ApoE – влияние на гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Проницаемость ГЭБ повышена у мышей, нокаутных по *APOE*, и у трансгенных мышей-носителей

АРОЕ4. Повышение проницаемости ГЭБ у этих мышей происходит за счет активации провоспалительного пути «циклоспорин А – NF-κB – матриксная металлопротеиназа 9» в перicyтах сосудов ГЭБ [14]. В условиях повышенной проницаемости ГЭБ увеличивается влияние периферического воспаления на иммунный ответ в ЦНС, что может способствовать развитию нейровоспаления и усиливать нейродегенеративные изменения у лиц, предрасположенных к БА.

К другим описанным функциям АроЕ относятся влияние на окислительный стресс, влияние на стабильность микротрубочек нейронов, влияние на синаптическую пластичность, влияние на апоптоз [8, 19, 35, 36, 41].

АроЕ и болезнь Альцгеймера

В начале 90-х гг. было обнаружено, что белок АроЕ в ЦНС имеет свойство накапливаться в амилоидных бляшках. В 1993 г. показано, что наличие аллеля *АРОЕ4* – фактор риска развития БА [39].

В настоящее время известно, что наличие аллеля *АРОЕ4* усиливает и ускоряет формирование нерастворимых отложений Аβ в мозге при когнитивных нарушениях, а также у здоровых лиц. В частности, у здоровых носителей *АРОЕ4* среднего и пожилого возраста, а также у пациентов с болезнью Паркинсона, имеющих этот аллель, ПЭТ-исследования показывают увеличение отложений Аβ в ЦНС [5, 11, 31]. При МС1 *АРОЕ4* также ассоциируется с более выраженной амилоидной нагрузкой [11].

Эксперименты на трансгенных животных, предрасположенных к БА, показывают, что носительство *АРОЕ4* ускоряет образование амилоидных бляшек и развитие дистрофии прилежащей к бляшкам паренхимы ЦНС. Кроме того, как показано на мышцах, при наличии аллеля *АРОЕ4* образующиеся амилоидные бляшки имеют тенденцию к локализации не в паренхиме, а поблизости от стенок артериол (периваскулярно) [26]. Согласно недавно полученным данным, у человека периваскулярный характер локализации амилоидных отложений является независимым фактором риска БА (относительный риск 6,26 у лиц с выраженными периваскулярными отложениями Аβ по сравнению с теми, у кого они отсутствуют или незначительны) [10].

Механизмы влияния изоформы АроЕ4 на формирование амилоидных бляшек и на нейротоксическое действие Аβ в настоящее время изучаются. Частично они связаны с нарушением у носителей полиморфизма регуляции метаболизма Аβ. Показано *in vitro*, что АроЕ, как свободный, так и входящий в состав липопротеинов, связывает Аβ, при этом прочность образуемого комплекса уменьшается в ряду

АроЕ2 > АроЕ3 > АроЕ4 [15, 51]. Образование комплекса с АроЕ способствует клиренсу внеклеточного амилоида, облегчая его эндоцитоз микроглией и астроцитами ЦНС посредством взаимодействия АроЕ с мембранными рецепторами-мусорщиками LRP1. По данным, полученным на мышцах, клиренс Аβ из интерстициальной жидкости ЦНС у носителей *АРОЕ4* замедлен [16]. Кроме влияния АроЕ на эндоцитоз амилоида, эти различия могут быть связаны с особенностями транспорта Аβ через ГЭБ в зависимости от изоформы АроЕ. Показано, что АроЕ замедляет транспорт растворимых форм Аβ через ГЭБ, причем наиболее сильный эффект оказывает АроЕ4, а наиболее слабый – АроЕ2 [27]. Также изоформы АроЕ различаются по способности стимулировать транспорт в лизосомы амилоида, захваченного клетками микроглии, и его последующий протеолиз. Изоформа АроЕ4 в меньшей степени стимулирует эти процессы [30].

Однако изоформа *АноЕ4* участвует в патогенезе БА не только за счет сниженной функциональной активности, но и за счет вовлечения неактивных у носителей *АноЕ3* механизмов. По данным исследований *in vitro*, связываясь с Аβ, АроЕ4 способствует образованию и стабилизации его формы, наиболее токсичной для нейронов – олигомерных амилоидных фибрилл [24]. После инактивации разлагающего Аβ фермента неприлизина у мышечных, экспрессирующих АроЕ4, (в отличие от мышечных, экспрессирующих АроЕ3) отмечается повышение экспрессии рецептора LRP1 нейронами области СА1 гиппокампа, и в этой же области у них имеет место накопление Аβ [25]. Поскольку белок АроЕ4 не влияет на уровень экспрессии mRNA LRP1, вероятно, речь идет о посттранскрипционной регуляции.

Роль иммуномодулирующего действия АроЕ в патогенезе хронической нейродегенерации при болезни Альцгеймера

Влияние АроЕ на врожденный иммунитет

Патогенез БА, согласно современным представлениям, в значительной степени обусловлен нарушением регуляции иммунного ответа в ЦНС [46]. Отмечается патологическая активация микроглии (специализированных макрофагов ЦНС), при которой нейроны подвергаются токсическому действию свободных радикалов и нарушается эффективный захват амилоидных отложений микроглией. Избыточная активация микроглии может поддерживаться системным воспалением за счет нескольких механизмов: активного транспорта провоспалительных цитокинов через ГЭБ, активации окончаний *nervus vagus*, модулирующего воспалительный ответ в ЦНС, синтеза медиаторов воспаления клетками ГЭБ (см., например, обзор [38]). В связи

с этим представляет интерес вопрос о влиянии на системный иммунный ответ и иммунный ответ в ЦНС различных изоформ ApoE.

Показано, что ApoE модулирует воспалительную активацию мононуклеарных фагоцитов. Трансгенная экспрессия ApoE мышинными макрофагами снижает поляризацию макрофагов в сторону провоспалительного фенотипа M1, характеризуемого продукцией цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF α (в больших концентрациях токсичны для нейронов), и повышает их поляризацию в сторону противовоспалительного фенотипа M2, характеризуемого продукцией цитокинов IL-4, IL-10, оказывающих нейропротективный эффект. Механизмы этого воздействия ApoE подробно не изучены, но, по некоторым данным, связаны с регуляцией фосфорилирования внутриклеточных киназ семейства p38 MAPK при связывании ApoE с мембранными рецепторами-мусорщиками LRP1 [22].

Для изоформы ApoE4 характерна сниженная иммунорегуляторная активность [9]. Так, показано в исследованиях на культурах клеток и *in vivo* на грызунах, что экспрессия *APOE4* ассоциируется с повышением выраженности воспалительного ответа макрофагов [29, 55]. Трансгенные мышинные макрофаги, экспрессирующие эту изоформу белка, характеризуются при стимуляции липополисахаридом (ЛПС), более высокой продукцией провоспалительного цитокина TNF α и сниженной продукцией противовоспалительного IL-10, синтезируют большее количество гем-1-оксигеназы (белка, ассоциируемого с окислительным стрессом) и демонстрируют большую активацию транскрипционного фактора NF- κ B, чем экспрессирующие ApoE3 макрофаги [29]. Кроме того, макрофаги и клетки микроглии *APOE4+* мышей более активно, чем в контрольной группе, отвечают на стимуляцию провоспалительными цитокинами синтезом медиатора воспаления оксида азота (NO) [18, 54]. Также показано, что клетки мышинной микроглии, экспрессирующие ApoE4, *in vitro* секретуют более высокий уровень провоспалительных цитокинов и оказывают более выраженное цитотоксическое действие на мышинные нейроны, чем при экспрессии ApoE3 (промежуточный уровень воспалительной активации) и ApoE2 (наименьший уровень воспалительной активации) [33]. Эффект аллеля *APOE4* на активацию микроглии является дозозависимым (сильнее у гомозиготных, чем у гетерозиготных носителей) и сопровождается усилением экспрессии мРНК транскрипционного фактора NF- κ B [45, 53].

In vivo у трансгенных мышей-носителей *APOE4* при введении ЛПС отмечается более выраженное повышение уровня провоспалитель-

ных цитокинов TNF α и IL-6 [32]. Также для них по сравнению с мышами-носителями *APOE3* характерен повышенный уровень летальности при моделировании сепсиса методом перевязки и пункции слепой кишки [55].

У людей-носителей аллеля ApoE4 (генотип *ApoE3/ApoE4*) отмечаются аналогичные изменения врожденного иммунитета. Так, полученные от них макрофаги характеризуются повышенной продукцией NO в ответ на стимуляцию [18]. Кроме того, при введении носителям ApoE4 ЛПС внутривенно отмечается более высокая лихорадка, большее повышение TNF α и большее повышение IL-6 на ранних сроках. У пациентов с тяжелым сепсисом наличие аллеля ApoE4 ассоциируется с большей выраженностью коагулопатии [27]. В одном исследовании с небольшой выборкой изучалась спонтанная и индуцированная фитогемагглютинином А продукция провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови у пациентов с БА. У носителей *APOE4* по сравнению с теми, кто не имел этого аллеля, был показан повышенный уровень продукции IL-1 β [44].

Другой аспект иммуномодулирующих функций ApoE связан с тем, что этот белок, связывая липидные антигены, способствует их рецептор-зависимому эндоцитозу антиген-представляющими клетками (АПК), в результате которого антигены попадают в CD1-содержащие эндосомы [13, 20]. В дальнейшем в комплексе с CD1 они презентуются на поверхности АПК для распознавания инвариантными рецепторами НКТ-клеток. Таким образом, секреция ApoE АПК выступает в качестве одного из механизмов оценки антигенного состава среды. Предполагается, что ApoE-зависимая активация НКТ-клеток играет роль в патогенезе атеросклероза [37] и, следовательно, может влиять и на риск БА, вероятность развития которой возрастает при атеросклерозе сосудов ЦНС.

Влияние ApoE на адаптивный (гуморальный и клеточный) иммунитет

Нормальное функционирование механизмов гуморального иммунитета препятствует формированию отложений A β в ЦНС и развитию хронического нейровоспаления. Особое значение при этом принадлежит антителам класса IgG, специфичным к A β , которые *in vitro* способны угнетать агрегацию A β и его цитотоксическое действие, а при моделировании БА на мышах их введение улучшает память и другие когнитивные функции [56]. Такие антитела присутствуют в естественном репертуаре IgG, хотя у пациентов с БА их уровень снижен [57]. Помимо воздействия на клиренс амилоида, антитела класса IgG оказывают иммуномодулирующее действие.

У предрасположенных к БА мышей с сопутствующим комбинированным иммунодефицитом, включающим дефицит гуморального иммунитета (мышь Rag-5xfAD), отмечаются признаки нейровоспаления (выраженная активация микроглии с увеличением продукции провоспалительных цитокинов и уменьшением фагоцитарной функции), а также более чем двукратное увеличение отложения Аβ в ЦНС. Внутривенное введение IgG улучшает у этих мышей клиренс амилоидных отложений и уменьшает проявления нейродегенерации [31]. Показано, что IgG способны частично проникать через ГЭБ.

Эти данные служат патогенетическим обоснованием применения внутривенного введения нормального человеческого иммуноглобулина (ВВИГ) при БА. Терапия ВВИГ отличается значительно большей безопасностью по сравнению с введением моноклональных антител, специфичных к Аβ. Представляет интерес изучение репертуара антител к Аβ и других особенностей гуморального иммунитета при различных фенотипах БА и, в частности, при БА у носителей *APOE4*.

Имеющиеся в настоящее время данные о влиянии изоформы ApoE4 на гуморальный иммунный ответ недостаточны и получены в основном в экспериментах на мышах. У этих животных генотип по *APOE* влияет на уровень и соотношение подтипов иммуноглобулинов в ЦНС: мыши *APOE4+* имеют достоверно более низкий уровень общего IgG и антител подкласса IgG2b в мозге, чем мыши *APOE3+* [62]. У человека различий по содержанию IgG в ЦНС и сыворотке крови в зависимости от генотипа по ApoE не было показано. Однако у *APOE4+* пациентов с БА, в отличие от не имеющих этого аллеля, в метаанализе клинических исследований отмечено положительное влияние на когнитивные функции от применения ВВИГ [48].

Влияние ApoE на клеточный адаптивный ответ является, по имеющимся данным, в основном супрессирующим. Показано, что ApoE угнетает митоген- и антиген-стимулированную пролиферацию Т-клеток *in vitro*. *In vivo* у мышей, нокаутных по ApoE, отмечается более выраженное повышение плазменного уровня Th1-цитокинов IFNγ и IL-12 в ответ на введение ЛПС и других

иммуностимуляторов [6]. При этом для угнетающего действия на Th1-ответ достаточно фрагмента молекулы ApoE, содержащего рецептор-связывающий участок 133-149 [32].

В исследованиях показано, что CD4⁺Т-клетки (Т-хелперы), специфичные к эпитопам Аβ, оказывают защитное действие при БА. Так, у мышей их внутривенное введение улучшает когнитивные функции, уменьшает число амилоидных бляшек в головном мозге и увеличивает способность микроглии к фагоцитозу Аβ [21, 22, 42]. По мере старения у человека отмечается уменьшение числа специфичных к Аβ CD4⁺ клеток, что может после некоторого латентного периода способствовать когнитивному снижению и развитию БА. При этом у носительниц аллеля *APOE4* двукратное снижение в крови числа естественных специфичных к Аβ CD4⁺ клеток наступает в среднем на 10 лет раньше (в возрасте 45-52 лет), чем у женщин, не имеющих данного аллеля [12]. Эти данные представляют особый интерес в свете того факта, что у женщин аллель *APOE4* в большей степени повышает риск БА, чем у мужчин, причем наиболее ярко это различие проявляется у лиц в возрасте старше 70 лет [7, 43]. Следует, впрочем, отметить, что оно характерно лишь для гетерозиготных носителей *APOE4*, в то время как у гомозиготных мужчин и женщин повышение риска БА является приблизительно равнозначным [49]. Можно предположить, что больший риск БА – у женщин – гетерозиготных носительниц *APOE4* частично обусловлен особенностями возрастной динамики специфичных к Аβ CD4⁺ клеток. Другое возможное объяснение – повышенный кардиоваскулярный риск у мужчин-носителей *APOE4*, в связи с которым не исключено, что для таких мужчин, достигающих старшей возрастной группы, характерно наличие дополнительных генетических факторов, уменьшающих риск сердечно-сосудистых заболеваний и, возможно, риск БА. Однако проверка этой гипотезы не проводилась.

Заключение

Генетический полиморфизм *APOE4* является фактором риска БА с поздним началом и ряда других заболеваний ЦНС, носители полиморфизма имеют повышенный риск когнитивного

ТАБЛИЦА 1. АЛЛЕЛИ ApoE У ЧЕЛОВЕКА

TABLE 1. ApoE ALLELES IN HUMANS

Аллели ApoE ApoE alleles	112	158	Средняя частота Mean prevalence
<i>APOE2</i>	Cys	Cys	5-10%
<i>APOE3</i>	Cys	Arg	60-70%
<i>APOE4</i>	Arg	Arg	15-20%

снижения при инфекциях и травмах ЦНС, лекарственных интоксикациях. В рамках современных представлений о патогенезе БА, нарушение нейроиммунных взаимодействий у носителей аллеля *APOE4* может выступать важным компонентом в механизмах формирования у них предрасположенности к БА (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). Так, хорошо изучены особенности фенотипа и ответа на активационные стимулы макрофагов и клеток микроглии при естественной или индуцированной в эксперименте экспрессии изоформы ApoE4, свидетельствующие о повышенной чувствительности этих клеток системы врожденного иммунитета к воспалительной активации у носителей данного генетического варианта. Имеются данные о повышенном нейротоксическом действии микроглии, экспрессирующей ApoE4, в экспериментальных моделях нейродегенерации. Эти изменения укладываются в рамки представлений о склонности к развитию хронического нейровоспаления, связанного с повышенной чувствительностью клеток микроглии к активационным стимулам, у лиц, имеющих повышенный риск БА. Их патогенетическую значимость необходимо рассматривать в комплексе с влиянием ApoE4 на метаболизм A β , способствующим образованию токсичных для нейронов и вызывающих воспалительную активацию микроглии

олигомеров амилоида и формированию периваскулярных амилоидных бляшек в ЦНС, а также с воздействием ApoE4 на проницаемость гематоэнцефалического барьера, неблагоприятным для клиренса A β из ЦНС.

Сведения о влиянии ApoE на адаптивный иммунитет являются фрагментарными и получены в большей степени на животных и с помощью *in vitro* моделей. Имеющиеся данные, приведенные в настоящем обзоре, свидетельствуют о нарушении клеточных и гуморальных механизмов адаптивного иммунного ответа на A β у *APOE4*+ лиц, что может способствовать патогенезу БА и влиять на эффективность пассивной и активной иммунотерапии этого заболевания, а также на вероятность побочных эффектов иммунотерапии.

Таким образом, носители генетического полиморфизма *APOE4* имеют ряд особенностей иммунного ответа, которые играют роль в формировании у них предрасположенности к БА. Дальнейшее комплексное изучение влияния изоформы ApoE4 на показатели иммунитета у пациентов, входящих в группы риска по развитию БА, в частности у больных амнестическим мягким когнитивным снижением, представляется важным для поиска новых методов прогнозирования течения когнитивных расстройств и разработки индивидуализированных подходов к их терапии.

Список литературы / References

1. Воевода М.И., Шахтшнейдер Е.В., Максимов В.Н., Куликов И.В., Ромащенко А.Г. Полиморфизм гена аполипопротеина E и атеросклероз // Атеросклероз, 2008. Т. 4, № 1. С. 11-26. [Voevoda M.I., Schakhtschneider E.V., Maksimov V.N., Kulikov I.V., Romaschenko A.G. Polymorphism of apolipoprotein E gene and atherosclerosis. *Ateroskleroz = Atherosclerosis*, 2008, Vol. 4, no. 1, pp. 11-26. (In Russ.)]
2. Глотов А.С., Вашукова Е.С., Канаева М.Д., Двоглазова М.О., Данилова М.М., Пашкин М.М., Марочкина Е.Ю., Бикмуллина Д.Р., Глебова М.А., Махрова И.А., Образцова Г.И., Глотов О.С., Зайнулина М.С., Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Исследование ассоциации полиморфизма генов APOE, LPL и NOS3 с риском сосудистой патологии у детей и беременных женщин // Экологическая генетика, 2011. Т. IX, № 4. С. 25-34. [Glotov A.S., Vashukova E.S., Kanaeva M.D., Dvoeglazova M.O., Danilova M.M., Marochkina E.Yu., Bikmullina D.R., Glebova M.A., Makhrova I.A., Obratsova G.I., Glotov O.S., Zainulina M.S., Ivashchenko T.E., Baranov V.S. Association study of APOE, LPL and NOS3 polymorphisms with the risk of common cardio pathology in children and pregnant women. *Ekologicheskaya genetika = Ecological Genetics*, 2011, Vol. IX, no. 4, pp. 25-34. (In Russ.)]
3. Григорьева И.Н., Никитенко Т.М., Шахтшнейдер Е.В., Куликов И.В., Воевода М.И. Полиморфизм гена ApoE и литогенность желчи у женщин с желчнокаменной болезнью // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2009. № 8. С. 56-60. [Grigorieva I.N., Nikitenko T.M., Shahtshneider E.V., Kulikov I.V., Voevoda M.I. Polymorphism of ApoE gene and bile lithogenicity in women with cholelithiasis. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2009, no. 8, pp. 56-60. (In Russ.)]
4. Ahles T.A., Saykin A.J., Noll W.W., Furstenberg C.T., Guerin S., Cole B., Mott L.A. The relationship of APOE genotype to neuropsychological performance in long-term cancer survivors treated with standard dose chemotherapy. *Psychooncology*, 2003, Vol. 12, no. 6, pp. 612-619.
5. Akhtar R.S., Xie S.X., Chen Y.J., Rick J., Gross R.G., Nasrallah I.M., van Deerlin V.M., Trojanowski J.Q., Chen-Plotkin A.S., Hurtig H.I., Siderowf A.D., Dubroff J.G., Weintraub D. Regional brain amyloid- β accumulation associates with domain-specific cognitive performance in Parkinson disease without dementia. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 5, e0177924. doi: 10.1371/journal.pone.0177924.
6. Ali K., Middleton M., Puré E., Rader D.J. Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response *in vivo*. *Circ. Res.*, 2005, Vol. 97, no. 9, pp. 922-927.

7. Altmann A., Tian L., Henderson V.W., Greicius M.D. Alzheimer's disease neuroimaging initiative investigators. Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Ann. Neurol.*, 2014, Vol. 75, no. 4, pp. 563-573.
8. Arai H., Kashiwagi S., Nagasaka Y., Uchida K., Hoshii Y., Nakamura K. Oxidative modification of apolipoprotein E in human very-low-density lipoprotein and its inhibition by glycosaminoglycans. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, Vol. 367, no. 1, pp. 1-8.
9. Baitsch D., Bock H.H., Engel T., Telgmann R., Müller-Tidow C., Varga G., Bot M., Herz J., Robenek H., von Eckardstein A., Nofer J.R. Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011, Vol. 31, no. 5, pp. 160-168.
10. Banerjee G., Kim H.J., Fox Z., Jäger H.R., Wilson D., Charidimou A., Na H.K., Na D.L., Seo S.W., Werring D.J. MRI-visible perivascular space location is associated with Alzheimer's disease independently of amyloid burden. *Brain*, 2017, Vol. 140, no. 4, pp. 1107-1116.
11. Bangen K.J., Clark A.L., Werhane M., Edmonds E.C., Nation D.A., Evangelista N., Libon D.J., Bondi M.W., Delano-Wood L. Alzheimer's disease neuroimaging initiative. Cortical amyloid burden differences across empirically-derived mild cognitive impairment subtypes and interaction with APOE ϵ 4 Genotype. *J. Alzheimers Dis.*, 2016, Vol. 52, no. 3, pp. 849-861.
12. Begum A.N., Cunha C., Sidhu H., Alkam T., Scolnick J., Rosario E.R., Ethell D.W. Women with the Alzheimer's risk marker ApoE4 lose A β -specific CD4(+) T cells 10-20 years before men. *Transl. Psychiatry*, 2014, no. 4, e414. doi: 10.1038/tp.2014.51.
13. Borg N.A., Wun K.S., Kjer-Nielsen L., Wilce M.C., Pellicci D.G., Koh R., Besra G.S., Bharadwaj M., Godfrey D.I., McCluskey J., Rossjohn J. CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature*, 2007, Vol. 448, no. 7149, pp. 44-49.
14. Bell R.D., Winkler E.A., Singh I., Sagare A.P., Deane R., Wu Z., Holtzman D.M., Betsholtz C., Armulik A., Sallstrom J., Berk B.C., Zlokovic B.V. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature*, 2012, Vol. 485, no. 7399, pp. 512-516.
15. Carter D.B. The interaction of amyloid-beta with ApoE. *Subcell Biochem.*, 2005, Vol. 38, pp. 255-272.
16. Castellano J.M., Kim J., Stewart F.R., Jiang H., deMattos R.B., Patterson B.W., Fagan A.M., Morris J.C., Mawuenyega K.G., Cruchaga C., Goate A.M., Bales K.R., Paul S.M., Bateman R.J., Holtzman D.M. Human ApoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci. Transl. Med.*, 2011, Vol. 3, no. 89, 89ra57. doi: 10.1126/scitranslmed.3002156.
17. Champagne D., Rochford J., Poirier J. Effect of apolipoprotein E deficiency on reactive sprouting in the dentate gyrus of the hippocampus following entorhinal cortex lesion: role of the astroglial response. *Exp. Neurol.*, 2005, Vol. 194, no. 1, pp. 31-42.
18. Colton C.A., Brown C.M., Cook D., Needham L.K., Xu Q., Czapiga M., Saunders A.M., Schmechel D.E., Rasheed K., Vitek M.P. APOE and the regulation of microglial nitric oxide production: a link between genetic risk and oxidative stress. *Neurobiol. Aging.*, 2002, Vol. 23, no. 5, pp. 777-785.
19. Elliott D.A., Kim W.S., Jans D.A., Garner B. Apoptosis induces neuronal apolipoprotein-E synthesis and localization in apoptotic bodies. *Neurosci. Lett.*, 2007, Vol. 416, no. 2, pp. 206-210.
20. Elzen P., Garg S., León L., Brigl M., Leadbetter E.A., Gumperz J.E., Dascher C.C., Cheng T.Y., Sacks F.M., Illarionov P.A., Besra G.S., Kent S.C., Moody D.B., Brenner M.B. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature*, 2005, Vol. 437, no. 7060, pp. 906-910.
21. Ethell D.W., Shippey D., Cao C., Cracchiolo J.R., Runfeldt M., Blake B., Arendash G.W. Abeta-specific T-cells reverse cognitive decline and synaptic loss in Alzheimer's mice. *Neurobiol. Dis.*, 2006, Vol. 23, no. 2, pp. 351-361.
22. Fisher Y., Nemirovsky A., Baron R., Monsonego A. T cells specifically targeted to amyloid plaques enhance plaque clearance in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, 2010, Vol. 5, no. 5, e10830. doi: 10.1371/journal.pone.0010830.
23. Fleisher A. S., Sowell B.B., Taylor C., Gamst A.C., Petersen R.C., Thal L.J. Alzheimer's disease cooperative study. Clinical predictors of progression to Alzheimer disease in amnesic mild cognitive impairment. *Neurology*, 2007, Vol. 68, no. 19, pp. 1588-1595.
24. Garai K., Verghese P.B., Baban B., Holtzman D.M., Frieden C. The binding of apolipoprotein E to oligomers and fibrils of amyloid- β alters the kinetics of amyloid aggregation. *Biochemistry*, 2014, Vol. 53, no. 40, pp. 6323-6331.
25. Gilat-Frenkel M., Boehm-Cagan A., Liraz O., Xian X., Herz J., Michaelson D.M. Involvement of the Apoer2 and Lrp1 receptors in mediating the pathological effects of ApoE4 *in vivo*. *Curr. Alzheimer Res.*, 2014, Vol. 11, no. 6, pp. 549-557.
26. Hawkes C.A., Sullivan P.M., Hands S., Weller R.O., Nicoll J.A., Carare R.O. Disruption of arterial perivascular drainage of amyloid- β from the brains of mice expressing the human APOE ϵ 4 allele. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 7, e41636. doi: 10.1371/journal.pone.0041636.
27. Holtzman D.M., Herz J., Bu G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2012, Vol. 2, no. 3, a006312. doi: 10.1101/cshperspect.a006312.
28. Horsburgh K., Nicoll J.A. Selective alterations in the cellular distribution of apolipoprotein E immunoreactivity following transient cerebral ischaemia in the rat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1996, Vol. 22, no. 4, pp. 342-349.
29. Jofre-Monseny L., Loboda A., Wagner A.E., Huebbe P., Boesch-Saadatmandi C., Jozkowicz A., Minihane A.M., Dulak J., Rimbach G. Effects of ApoE genotype on macrophage inflammation and heme oxygenase-1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, Vol. 357, no. 1, pp. 319-324.

30. Li J., Kanekiyo T., Shinohara M., Zhang Y., La Du M.J., Xu H., Bu G. Differential regulation of amyloid- β endocytic trafficking and lysosomal degradation by apolipoprotein E isoforms. *J. Biol. Chem.*, 2012, Vol. 287, no. 53, pp. 44593-44601.
31. Lim Y.Y., Williamson R., Laws S.M. Effect of APOE genotype on amyloid deposition, brain volume, and memory in cognitively normal older individuals. *J. Alzheimers Dis.*, 2017, Vol. 58, no. 4, pp. 1293-1302.
32. Lynch J.R., Tang W., Wang H., Vitek M.P., Bennett E.R., Sullivan P.M., Warner D.S., Laskowitz D.T. APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, no. 49, pp. 48529-48533.
33. Maezawa I., Nivison M., Montine K.S., Maeda N., Montine T.J. Neurotoxicity from innate immune response is greatest with targeted replacement of E4 allele of apolipoprotein E gene and is mediated by microglial p38MAPK. *FASEB J.*, 2006, Vol. 20, no. 6, pp. 797-799.
34. Mahley R.W. Central nervous system lipoproteins: ApoE and regulation of cholesterol metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2016, Vol. 36, no. 7, pp. 1305-1315.
35. Mahley R.W., Nathan B.P., Pitas R.E., Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1996, Vol. 777, pp. 139-145.
36. Mahley R.W., Rall S.C. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.*, 2000, no. 1, pp. 507-537.
37. Major A.S., Wilson M.T., McCaleb J.L., Ru Su Y., Stanic A.K., Joyce S., van Kaer L., Fazio S., Linton M.F. Quantitative and qualitative differences in proatherogenic NKT cells in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, Vol. 24, no. 12, pp. 2351-2357.
38. Malashenkova I., Krynskiy S., Khailov N., Kazanova G., Velichkovsky B., Didkovsky N. The role of cytokines in memory consolidation. *Biology Bulletin Reviews*, 2016, Vol. 6, no. 2, pp. 126-140.
39. Mayeux R., Stern Y., Ottman R., Tatemichi T.K., Tang M.X., Maestre G., Ngai C., Tycko B., Ginsberg H. The apolipoprotein epsilon 4 allele in patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 1993, Vol. 34, no. 5, pp. 752-754.
40. Michaud T.L., Su D., Siahpush M., Murman D.L. The risk of incident mild cognitive impairment and progression to dementia considering mild cognitive impairment subtypes. *Dement. Geriatr. Cogn. Dis. Extra*, 2017, Vol. 7, no. 1, pp. 15-29.
41. Miyata M., Smith J.D. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and β -amyloid peptides. *Nat. Genet.*, 1996, Vol. 14, no. 1, pp. 55-61.
42. Monsonogo A., Nemirovsky A., Harpaz I. CD4 T cells in immunity and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Immunology*, 2013, Vol. 139, no. 4, pp. 438-446.
43. Mortensen E.L., Høgh P. A gender difference in the association between APOE genotype and age-related cognitive decline. *Neurology*, 2001, Vol. 57, no. 1, pp. 89-95.
44. Olgiate P., Politis A., Malitas P., Albani D., Dusi S., Polito L., de Mauro S., Zisaki A., Piperi C., Stamouli E., Mailis A., Batelli S., Forloni G., De Ronchi D., Kalofoutis A., Liappas I., Serretti A. APOE epsilon-4 allele and cytokine production in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, 2010, Vol. 25, no. 4, pp. 338-344.
45. Ophir G., Amariglio N., Jacob-Hirsch J., Elkon R., Rechavi G., Michaelson D.M. Apolipoprotein E4 enhances brain inflammation by modulation of the NF-kappaB signaling cascade. *Neurobiol. Dis.*, 2005, Vol. 20, no. 3, pp. 709-718.
46. Perry V.H., Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin. Immunopathol.*, 2013, Vol. 35, pp. 601-612.
47. Pomara N., Willoughby L., Wesnes K., Greenblatt D.J., Sidtis J.J. Apolipoprotein E epsilon4 allele and lorazepam effects on memory in high-functioning older adults. *Arch. Gen. Psychiatry*, 2005, Vol. 62, no. 2, pp. 209-216.
48. Relkin N. Clinical trials of intravenous immunoglobulin for Alzheimer's disease. *J. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 34, Suppl. 1, pp. S74-S79.
49. Riedel B.C., Thompson P.M., Brinton R.D. Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2016, Vol. 160, pp. 134-147.
50. Shi J., Tu J.L., Gale S.D., Baxter L., Vollmer T.L., Campagnolo D.I., Tyry T.M., Zhuang Y., Kuniyoshi S.M. APOE ϵ 4 is associated with exacerbation of cognitive decline in patients with multiple sclerosis. *Cogn. Behav. Neurol.*, 2011, Vol. 24, no. 3, pp. 128-133.
51. Tai L.M., Mehra S., Shete V., Estus S., Rebeck G.W., Bu G., LaDu MJ. Soluble apoE/A β complex: mechanism and therapeutic target for APOE4-induced AD risk. *Mol. Neurodegener.*, 2014, Vol. 9, p. 2.
52. Ulrich V., Konaniah E.S., Herz J., Gerard R.D., Jung E., Yuhanna I.S., Ahmed M., Hui D.Y., Mineo C., Shaul P.W. Genetic variants of ApoE and ApoER2 differentially modulate endothelial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, no. 37, pp. 13493-13498.
53. Vitek M.P., Brown C.M., Colton C.A. APOE genotype-specific differences in the innate immune response. *Neurobiol. Aging*, 2009, Vol. 30, pp. 1350-1360.
54. Vitek M.P., Snell J., Dawson H., Colton C.A. Modulation of nitric oxide production in human macrophages by apolipoprotein-E and amyloid-beta peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, Vol. 240, no. 2, pp. 391-394.
55. Wang H., Christensen D.J., Vitek M.P., Sullivan P.M., Laskowitz D.T. APOE genotype affects outcome in a murine model of sepsis: implications for a new treatment strategy. *Anaesth. Intensive Care*, 2009, Vol. 37, no. 1, pp. 38-45.

56. Wang T., Xie X.X., Ji M., Wang S.W., Zha J., Zhou W.W., Yu X.L., Wei C., Ma S., Xi Z.Y., Pang G.L., Liu R.T. Naturally occurring autoantibodies against A β oligomers exhibited more beneficial effects in the treatment of mouse model of Alzheimer's disease than intravenous immunoglobulin. *Neuropharmacology*, 2016, Vol. 105, pp. 561-576.
57. Weksler M.E., Relkin N., Turkenich R., LaRusse S., Zhou L., Szabo P. Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp. Gerontol.*, 2002, Vol. 37, no. 7, pp. 943-948.
58. White F., Nicoll J.A., Horsburgh K. Alterations in ApoE and ApoJ in relation to degeneration and regeneration in a mouse model of entorhinal cortex lesion. *Exp. Neurol.*, 2001, Vol. 169, no. 2, pp. 307-318.
59. Xu Q., Bernardo A., Walker D., Kanegawa T., Mahley R.W., Huang Y. Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J. Neurosci.*, 2006, Vol. 26, no. 19, pp. 4985-4994.
60. Xu Q., Walker D., Bernardo A., Brodbeck J., Balestra M.E., Huang Y. Intron-3 retention/splicing controls neuronal expression of apolipoprotein E in the CNS. *J. Neurosci.*, 2008, Vol. 28, no. 6, pp. 1452-1459.
61. Yu C., Youmans K.L., LaDu M.J. Proposed mechanism for lipoprotein remodeling in the brain. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2010, Vol. 1801, no. 8, pp. 819-823.
62. Zhou Y., Zhao W., Al-Muhtasib N., Rebeck G.W. APOE genotype alters immunoglobulin subtypes in knock-in mice. *J. Alzheimers Dis.*, 2015, Vol. 46, no. 2, pp. 365-374.

Авторы:

Малашенкова И.К. — к.м.н., начальник лаборатории иммунологии и вирусологии, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»; лаборатория клинической иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России», Москва, Россия

Крынский С.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»; лаборатория клинической иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России», Москва, Россия

Мамошина М.В. — студент, лаборатория иммунологии и вирусологии, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»; ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва, Россия

Дидковский Н.А. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России», Москва, Россия

Authors:

Malashenkova I.K., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunology and Virology, National Research Center "Kurchatov Institute"; Laboratory of Clinical Immunology, Federal Clinical Research Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Krynskiy S.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology and Virology, National Research Center "Kurchatov Institute"; Laboratory of Clinical Immunology, Federal Clinical Research Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Mamoshina M.V., Student, Laboratory of Immunology and Virology, National Research Center "Kurchatov Institute"; Moscow Institute of Physics and Technology (The State University), Moscow, Russian Federation

Didkovskiy N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Clinical Immunology, Federal Clinical Research Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Поступила 11.08.2017
Принята к печати 25.09.2017

Received 11.08.2017
Accepted 25.09.2017

КЛЕТочНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ – СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Лежнин Ю.Н., Христиченко А.Ю., Ратникова Н.М., Кравченко Ю.Е., Чумаков С.П.

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

Резюме. Выяснение механизмов врожденного иммунитета, отвечающих за защиту от возникновения злокачественных опухолей, способствует разработке новых подходов к терапии рака, основанных на активации иммунной системы пациента. Ранее иммунотерапия рака базировалась на подходах к активации иммунных механизмов противоопухолевой защиты путем разного рода неспецифических иммуностимуляторов, введения цитокинов и прочих белковых факторов, а также создания противораковых вакцин на основе опухолевых клеток. Новые данные о разнообразии взаимодействий между иммунными и опухолевыми клетками, позволяют использовать для терапии рака и препараты на основе самих иммунных клеток. В частности, активно испытывается эффективность трансплантации противоопухолевых иммунных клеток, экспансия активных популяций иммунных клеток *ex vivo*, приемы, приводящие к повышению их противоопухолевой активности и специфичности. На стадии разработки находятся подходы к нацеливанию иммунных клеток на определенные раковые антигены, конверсии супрессирующего действия клеток опухолевого микроокружения в противоопухолевое, а также к использованию иммунных клеток для подавления развития опухолевой инфраструктуры. В обзоре оцениваются перспективы развития клеточной иммунотерапии опухолей и области их применения.

Ключевые слова: клеточная иммунотерапия, терапевтические антитела, адаптивная иммунотерапия, дендритноклеточные вакцины, химерные рецепторы

CELLULAR IMMUNOTHERAPY: A MODERN APPROACH TO TREATMENT OF ONCOLOGICAL DISEASES

Lezhnin Yu.N., Khristichenko A.Yu., Ratnikova N.M., Kravchenko Yu.E., Chumakov S.P.

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Abstract. Our understanding of anticancer immune surveillance currently serves as a basis for development of novel therapies that utilize patient's own immune system as an anticancer agent. Previously, cancer immunotherapy mostly included non-specific immunomodulating agents, cytokines, or cancer cell-based

Адрес для переписки:

Чумаков Степан Петрович
ФГБУН «Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук
117997, Россия, Москва, ГСП-7,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: 8 (915) 006-69-68.
E-mail: stepan@chumakov.email

Address for correspondence:

Chumakov Stepan P.
Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
117997, Russian Federation, Moscow,
Miklukho-Maklaya str., 16/10.
Phone: 7 (915) 006-69-68.
E-mail: stepan@chumakov.email

Образец цитирования:

Ю.Н. Лежнин, А.Ю. Христиченко, Н.М. Ратникова,
Ю.Е. Кравченко, С.П. Чумаков «Клеточная
иммунотерапия – современный подход к лечению
онкологических заболеваний» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 3. С. 313–340.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-313-340

© Чумаков С.П. и соавт., 2018

For citation:

Yu.N. Lezhnin, A.Yu. Khristichenko, N.M. Ratnikova,
Yu.E. Kravchenko, S.P. Chumakov "Cellular immunotherapy:
a modern approach to treatment of oncological diseases", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,
Vol. 20, no. 3, pp. 313–340.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-313-340

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-313-340

tumor vaccines. Emerging understanding of diverse interactions between the immune system and cancer cells allows to develop novel, more effective therapeutic approaches that target only specific populations of immune cells. Recent studies focus on testing efficiency of allogenic and autologous anticancer immunity, strategies for *ex vivo* expansion of these cells, and approaches to increase their anticancer activity and specificity. Most recent approaches focus on re-targeting immune cells to specific tumor antigens, shifting the balance of immunosuppressive tumor microenvironment towards immune stimulation and utilizing immune cells to target tumor architecture. This review is focused on the prospects of different immuno-therapeutic strategies.

Keywords: cellular immunotherapy, therapeutic antibodies, adoptive immunotherapy, cancer vaccine, chimeric antigen receptor

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» в рамках Соглашения № 14.607.21.0140 (уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60715X0140).

Введение

В середине 20-го века на стыке молекулярной биологии, биохимии, цитологии и иммунологии возник принципиально новый подход к лечению онкологических заболеваний — иммунотерапия. В основе этого метода лежит идея использования собственной иммунной системы пациента для борьбы с раком. Обычно иммунная система пациента не способна справиться с болезнью самостоятельно, поскольку раковые клетки вырабатывают механизмы защиты, позволяющие им уходить из-под ее контроля. Для успешной борьбы с новообразованием организму требуется усиление или перенаправление иммунного ответа. Для этих целей успешно разрабатывается ряд иммунотерапевтических подходов, таких как иммуномодулирующие воздействия, моноклональные антитела, а в последнее время также и иммунные клетки.

Использование иммунных клеток, или клеточная иммунотерапия — наиболее молодое и перспективное направление иммунотерапии. Оно заключается во введении пациенту популяций иммунных клеток, обладающих прямым противоопухолевым действием, либо модифицированных антигенпрезентирующих клеток, способных «обучить» собственные иммунные клетки пациента распознавать антигенные маркеры опухоли. Впервые такая разновидность иммунотерапии была применена в клинике в 2010 году компанией Dendreon Corporation, испытывавшей для лечения рака простаты свою вакцину на основе дендритных клеток [175]. Сейчас для клеточной иммунотерапии, помимо дендритных клеток, начинают испытываться и приемы с использованием макрофагов, Т-хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и других типов иммунных клеток. Ис-

пользуемые подходы условно можно разделить на терапию с применением клеток врожденного либо адаптивного иммунитета. Благодаря современным технологиям и новым открытиям, клеточная иммунотерапия быстро совершенствуется и демонстрирует многообещающие результаты в лечении различных типов онкопатологий.

Терапия с использованием клеток врожденного иммунитета

Механизмы врожденного иммунитета служат в качестве первой линии защиты от развития злокачественных заболеваний, осуществляя постоянный контроль организма за качеством клеток. В основе этих механизмов лежит распознавание нехарактерных для нормальных клеток черт (паттернов) и выбраковки на их основе измененных и потенциально опасных клеток. Врожденный иммунитет достаточно эффективно справляется с ограниченным числом возникающих дефектных клеток, но может оказаться неспособным бороться с уже возникшими массами опухолевых клеток.

Натуральные киллеры (НК-клетки)

Распознавание и уничтожение натуральными киллерами клеток-мишеней зависит от баланса между сигналами, поступающими от активирующих и ингибирующих рецепторов на поверхности НК-клетки [18, 120]. К активирующим рецепторам НК-клеток относятся цитотоксические (NKp46, NKp30 и NKp44), иммуноглобулин-подобные (KIR-2DS и KIR-3DS) и лектиновые рецепторы С-типа (CD94/NKG2C, NKG2D, NKG2E/H, NKG2F). Ингибирующие рецепторы представлены иммуноглобулин-подобными (KIR-2DL и KIR-3DL) и лектиновыми рецепторами С-типа (CD94/NKG2A/B). При контакте с нормальной клеткой, ингибирующие рецепторы связываются с молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса (MHC I) и предотвращают или подавляют активацию натуральных киллеров. Трансформированные клетки обычно экспрессируют мало молекул MHC I, что вызывает активацию НК-клеток. Кроме этого, стрессы, повреждения ДНК и патологическая трансформация клеток приводят к экспрессии на поверхности белков и рецепторов (NKG2DL, BAT3, AICL, CD155, CD112,

CD48 и др), которые также распознаются активными рецепторами и стимулируют процесс выбраковки [104, 105, 179].

Натуральные киллеры могут уничтожать клетки двумя способами – путем выброса цитотоксических белков или секрецией лигандов мембранных рецепторов, стимулирующих самоуничтожение клеток. В первом случае, после распознавания клетки-мишени, происходит выброс содержимого внутриклеточных гранул натурального киллера, содержащих перфорин и гранзимы. Перфорин встраивается в мембрану-клетки мишени и образует трансмембранные поры, через которые в клетку проникают гранзимы. Попадая в цитоплазму, гранзимы, являющиеся сериновыми протеазами, вызывают каспазо-зависимый и каспазо-независимый апоптоз [79]. Второй способ проявления цитотоксичности натуральных киллеров использует секрецию молекул суперсемейства фактора некроза опухоли (TNF) – Fas-лиганда и TRAIL. На поверхности клеток эти лиганды связываются с соответствующими «рецепторами смерти» и запускают процесс апоптоза [79, 166] (рис. 1). Примечательно, что НК-клетки также секретируют гамма-интерферон ($IFN\gamma$), который стимулирует процесс адаптивного иммунного ответа, приводя к существенному усилению противоопухолевого действия [126].

Проведение иммунотерапии НК-клетками осложняется тем, что опухолевые клетки часто вырабатывают защитные механизмы, позволяющие им ускользать от узнавания натуральными киллерами. Примеры этому включают частое снижение экспрессии молекул адгезии и лигандов для цитотоксических рецепторов, а также увеличение секреции таких иммуносупрессирующих факторов, как IL-10 и TGF- β [29, 179]. Зачастую также наблюдается снижение числа и цитотоксической активности натуральных киллеров, уменьшение экспрессии активирующих и увеличение ингибирующих рецепторов на поверхности НК-клеток [162]. Поскольку на практике у онкологических больных активность НК часто угнетена, что способствует прогрессии заболевания, задачей иммунотерапии является восстановление и усиление функциональности НК-клеток.

Аутологичные НК-клетки

Для иммунотерапии натуральными киллерами чаще всего используют собственные (аутологичные) НК-клетки пациента. Эффект терапии можно усилить за счет экспансии клеток *ex vivo* для последующей трансплантации пациенту. Также экспансию НК-клеток можно активизировать непосредственно в организме пациента введением цитокинов, стимулирующих их пролиферативную активность, таких как IL-2, IL-12,

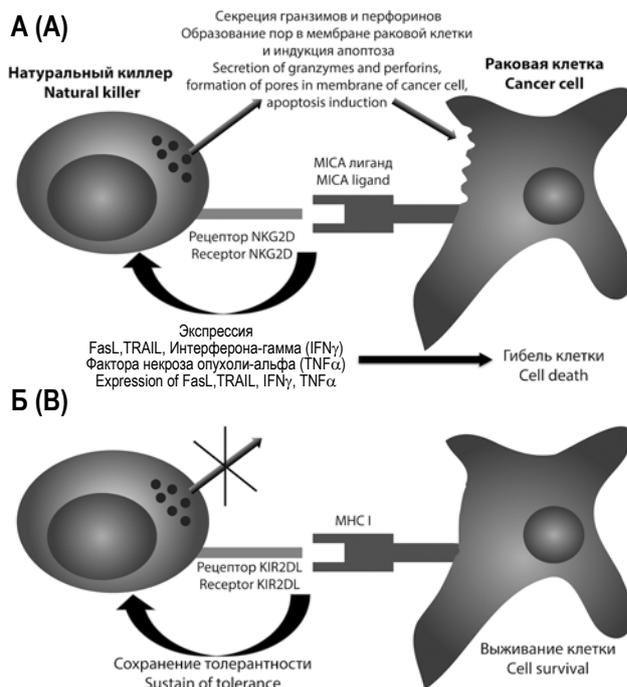


Рисунок 1. (А) Активация натурального киллера в ответ на распознавание MICA лиганда активационным рецептором NKG2D. В результате активации происходит синтез и секреция гранзимов и перфоринов, а также ряда факторов, которые запускают механизмы клеточного апоптоза. (Б) Формирование толерантности натурального киллера по отношению к раковой клетке в ответ на взаимодействие ингибирующего рецептора KIR2DL с молекулами MHC I, экспрессирующимися на поверхности раковой клетки

Figure 1. (A) Activation of NK cell following interaction between MICA ligand and activation receptor NKG2D. As a result of this process, NK cell starts to synthesize and secrete granzymes and perforins, along with other proteins that induce apoptosis of tumor cell. (B) Sustaining tolerance of NK cell towards cancer cell after interaction of inhibitory receptor KIR2DL with MHC I molecules that are expressed on the surface of cancer cells

IL-15, IL-18, IL-21 [42, 155]. Введение цитокинов может вызвать осложнения, например, большие дозы IL-2 могут привести к увеличению числа регуляторных Т-лимфоцитов (T_{reg}), подавляющих активность НК-клеток [155]. Кроме того, передозировка IL-2 вызывает синдром повышенной проницаемости сосудов, болезнь Кларксона. Сейчас в экспериментальной медицине активнее применяют IL-15, хорошо зарекомендовавший себя при лечении рака легких, но и в этом случае для достижения результата требуются значительные дозы препарата, зачастую негативно сказывающиеся на здоровье пациентов [90]. Более безопасно экспансировать НК-клетки *in vivo* можно введением комбинации небольших доз нескольких цитокинов, к примеру, GM-CSF, $IFN\alpha$, IL-2 и IL-15 [162].

Наряду с трудностями при проведении экспансии аутологичных НК-клеток, их применение также сопряжено с рядом проблем. При взаимодействии с нормальными клетками, экспонирующими молекулы МНСI, НК-клетки связывают их своими ингибирующими KIR-рецепторами и утрачивают цитотоксическую активность. Многие опухолевые клетки теряют способность экспрессировать МНСI, что делает их чувствительными к НК-терапии, однако некоторые сохраняют экспрессию МНСI, что ограничивает возможности терапии этого типа. Восстановить цитотоксический потенциал НК-клеток в этом случае можно за счет блокирования ингибирующих KIR-рецепторов моноклональными антителами. На сегодняшний день уже существует ряд антител к KIR-рецепторам, например, моноклональные антитела 1-7F9 (IPH2101) (и основанный на них препарат Lirilumab) способны блокировать KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 рецепторы, препятствуя их взаимодействию с молекулами рецепторов класса МНСI – HLA-C. Анти-KIR антитела способствуют распознаванию и уничтожению натуральными киллерами опухолевых клеток, экспрессирующих HLA-C [7] в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Например, введенные в трансгенных мышей линии Rag1KO спленоциты, экспрессирующие HLA-Cw3, удаляются иммунной системой животных через 20 часов после введения дозы антитела 1-7F9 [156]. Отбирают антитела обычно к определенным подсемействам ингибирующих KIR-рецепторов [23, 69]. Такие антитела позволяют активировать натуральные киллеры исключительно против опухолевых клеток, экспрессирующих тот или иной аллотип HLA [123]. Моноклональные антитела 1-7F9 уже прошли первую фазу клинических испытаний на пациентах с острым миелоидным лейкозом (AML). Результаты указывают на безопасность препарата, а также долгосрочность (более двух недель) эффективного блокирования KIR-рецепторов при однократном введении дозы [140].

Аллогенные НК-клетки

Для терапевтических целей можно также использовать аллогенные НК клетки, полученные от другого человека [147]. Существует мнение, что аллогенные НК клетки могут даже быть предпочтительными. Некоторые KIR-рецепторы аллогенных НК-клеток донора и молекулы МНСI (HLA для лейкоэмических клеток) реципиента не совпадают, что позволяет обойти проблему применения аутологичных НК-клеток, которые часто не могут распознавать и убивать опухолевые клетки из-за полного соответствия их ингибирующих рецепторов молекулам МНСI опухоли [148]. Безопасность и эффективность

применения аллогенных натуральных киллеров подтверждена клиническими испытаниями на пациентах с метастатической меланомой, почечной карциномой и острым миелоидным лейкозом [121]. Возникновение реакции «трансплантат против хозяина» – основного осложнения этого метода – можно предотвратить, подобрав донора с аналогичным набором некоторых молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС). В таком случае трансплантированные клетки воспринимаются иммунной системой реципиента как родственные, не вызывая острой реакции отторжения, что позволяет им циркулировать в кровеносной системе хозяина достаточное время для оказания терапевтического эффекта [47]. Чем выше процент «тканевой совместимости» вводимых клеток, тем меньше вероятность отторжения и дольше время циркуляции [102], при этом избыточная совместимость может привести к отсутствию терапевтического эффекта, поскольку набор антигенов опухолевых клеток пациента будет восприниматься только ингибирующими KIR-рецепторами НК-клеток донора. Для подбора оптимального уровня идентичности применяются методы HLA-типирования высокого разрешения [92]. Чаще всего используют «гаплоидентичных» или близкородственных доноров аллогенных НК-клеток. Дополнительно усилить противоопухолевый эффект терапии можно за счет экспансии НК-клеток *ex vivo* с использованием IL-15 [121].

Для проведения НК-клеточной иммунотерапии могут использоваться и линейные натуральные киллеры, полученные от пациентов с НК-клеточной лимфомой. Некоторые линии таких клеток представляют собой функционально-активные НК-клетки с высоким противоопухолевым потенциалом. Одна из наиболее широко используемых линий НК-клеток – NK-92 [87]. Клетки этой линии проявляют противоопухолевый эффект *in vivo* после стимуляции цитокиновым коктейлем, полученным от активированных мононуклеарных клеток [152], и уже используются в клинических испытаниях в виде облученных и непролиферирующих препаратов. NK-92 не экспрессируют Fc-рецептор CD16 и не способны проявлять антителозависимую цитотоксичность. Чтобы восстановить это свойство, создаются трансгенные варианты с введенным CD16 и экспрессирующие IL-2, что также позволяет им восстанавливать запасы цитотоксических гранул и усиливает противоопухолевую активность. Экспрессия CD16 позволяет использовать NK-92 вместе с моноклональными антителами для нацеливания на опухолевые клетки [77]. NK-92 обладают и недостатками – они латентно заражены EBV и достаточно сложны в культивации [173].

Помимо NK-92, в качестве линейных клеточных иммунотерапевтиков исследуются линии YT [58], NKL (одна из немногих EBV-негативных линий натуральных киллеров) [75], линии HANK-1, KHYG-1, NK-YS, NKG, IMC-1 и SNK-6 [89].

Генетическая модификация NK-клеток

Трансгенные NK-клетки, экспрессирующие IL-2, IL-12 или IL-15, могут использоваться в качестве альтернативы цитокиновой терапии, которая нередко приводит к развитию осложнений. Такие клетки обладают способностью к самоактивации за счет стабильной экспрессии стимулирующих цитокинов. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что трансгенные NK-клетки обладают высокой пролиферативной активностью и жизнеспособностью [75, 147, 167]. Для преодоления супрессии NK-клеток факторами опухолевого микроокружения в них экспрессируют доминантно-негативный вариант рецептора TGFbeta 2 типа, что предотвращает подавление экспрессии активирующих рецепторов под действием этого фактора [194].

Натуральные киллеры можно перепрограммировать для повышения специфичности распознавания опухолевых клеток. Для этого применяют химерные иммуноглобулин-подобные T-клеточные рецепторы, содержащие одноцепочечный вариабельный фрагмент моноклонального антитела в качестве антигенсвязывающей области. Таким образом могут быть получены рецепторы (и NK-клетки), специфичные к любому опухолевому антигену. На сегодняшний день уже испытаны химерные рецепторы к HER2/neu, SEA и CD33 [153]. Натуральные киллеры с химерными рецепторами показывают высокую избирательность действия, что существенно повышает эффективность противораковой терапии [26, 153].

Клетки линии NK-92 применяют в качестве носителей химерных рецепторов против CD19 для лечения B-клеточных лимфом, устойчивых к цитотоксическому действию немодифицированных NK-92 [129, 142], а также рецепторов против CD5 для лечения T-клеточных лейкозов (Toll) и периферических T-клеточных лимфом [20]. Испытываются варианты NK-92, экспрессирующие анти-ErbB2 CAR для терапии глиобластом [196], химерные рецепторы к gp100/HLA-A2 для терапии меланом [197], к GD2 для лечения нейробластом [40], к CS1 и CD138 для терапии множественной миеломы [26, 74], к PSCA против рака простаты [172]. Также созданы модификации с рецепторами к CD38, ErbCAM, EBVNA, экспрессирующие цитокины IL-2 и IL-15 [150]. В настоящее время проводятся клинические испытания NK-92, экспрессирующих CD16 и IL-2 (NCT03027128), CAR к CD33

для терапии АМЛ (NCT02944162), к CD19 для терапии B-клеточных лейкозов и лимфом, (NCT02892695), к CD7 против T-клеточных лейкозов и лимфом (NCT02742727).

В таблице 1 приведены некоторые примеры клинического применения натуральных киллеров.

Макрофаги

Для клеточной терапии можно использовать и миелоидные компоненты системы врожденного иммунитета. Из них особенно примечательна популяция мононуклеарных фагоцитов (макрофагов), представляющих исключительно важную составляющую неспецифического иммунитета. Несмотря на весомый вклад в поддержание иммунитета, макрофаги также обладают парадоксальной способностью стимулировать процессы роста, инвазии и метастазирования опухоли [134]. Высокая концентрация опухоль-ассоциированных макрофагов более чем в 80% случаев коррелирует с высокой злокачественностью и негативным прогнозом развития заболевания [178]. Это объясняется способностью макрофагов изменять свои свойства в ответ на сигналы, поступающие от опухолевых клеток. Макрофаги подразделяются на несколько фенотипически различных субтипов. По совокупности признаков, макрофаги делят на две популяции: классически-активированные (M1-макрофаги) и альтернативно-активированные (M2-макрофаги). M1-макрофаги стимулируются Th1-клетками за счет секреции IFN γ и IL-2 или в ответ на появление таких агентов, как бактериальный липополисахарид (LPS) или фактор некроза опухоли альфа (TNF α) [112]. M1-макрофаги секретируют цитокины провоспалительного профиля, такие как TNF α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, и участвуют в защите организма от бактерий и вирусов, а также в формировании противоопухолевого ответа [41]. В отличие от M1-макрофагов, M2-макрофаги регулируют противовоспалительные процессы, стимулируют ангиогенез, репарацию и ремоделирование тканей, что может помогать опухолевому росту [193]. Популяция M2-макрофагов гетерогенна и включает несколько подтипов: M2a, M2b и M2c. M2a-макрофаги формируются в ответ на секрецию IL-4 и IL-13 опухолевыми клетками. Формированию M2b-макрофагов способствуют иммунные комплексы или антагонист рецептора IL-1 (IL-1ra). M2c-макрофаги образуются под действием IL-10, трансформирующего ростового фактора бета (TGF- β) и глюкокортикоидов [116]. M2-макрофаги могут дифференцироваться из M1-субтипа либо из особой популяции неклассических моноцитов [46, 51], причем тип предшественника не влияет на фенотипические признаки и функции [99].

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ

TABLE 1. CLINICAL TRIALS OF NATURAL KILLER-BASED THERAPEUTICS

Стимуляция, манипуляции, тип опухоли, количество пациентов Therapeutic strategy, tumor type, number of patients	Результаты Results
Аутологичные НК-клетки Autologous NK cells	
<p>Трансплантация клеток после стимуляции цитокинами и экспансии <i>ex vivo</i>: IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, обработка блокирующим антителом – type I IFN: KIR Ab</p> <p>Глиома (9 пациентов), метастазирующая почечная карцинома (10 пациентов), метастазирующий РМЖ (5 пациентов)</p> <p>Transplantation of NK cells stimulated with IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, treated with blocking mab type I IFN: KIR Ab and expanded <i>ex vivo</i></p> <p>Glioma (9 patients), metastatic renal carcinoma (10 patients), metastatic breast cancer (5 patients)</p>	<p>Глиома: у 33% пациентов – положительный ответ на терапию [10]</p> <p>Почечная карцинома: у большинства пациентов – регрессия опухоли и снижение болевых ощущений. Выживаемость: 24 месяца – 50% пациентов, 56 месяцев – 25% пациентов [61]</p> <p>РМЖ: положительный ответ наблюдался у одного пациента [35]</p> <p>Glioma: positive response to treatment in 33% of patients [10]</p> <p>Renal carcinoma: tumor regression and decreased pain syndrome in most patients, survival: 50% in 24 months, 25% in 56 months [61]</p> <p>Breast cancer: one patient showed positive response to treatment [35]</p>
Аллогенные НК-клетки Allogeneic NK cells	
<p>Трансплантация клеток после активации и экспансии <i>ex vivo</i>: IL-15, гидрокортизон</p> <p>Введение нестимулированных клеток донора</p> <p>Метастазирующая меланома (10 пациентов), почечная карцинома (6 пациентов), острый миелобластный лейкоз (57 пациентов), немелкоклеточный рак легких (15 пациентов)</p> <p>Transplantation of NK cells stimulated with IL-15 and expanded <i>ex vivo</i> with hydrocortisone</p> <p>Transplantation of unstimulated donor cells</p> <p>Metastatic melanoma (10 patients), Renal carcinoma (6 patients), AML (57 patients), NSCLC (15 patients)</p>	<p>Острый миелобластный лейкоз: 5-летняя выживаемость после терапии аутологичными НК-клетками – 5%, после терапии аллогенными НК-клетками – 60% [147]</p> <p>Немелкоклеточный рак легких: снижение прогрессии заболевания у половины пациентов [71]</p> <p>Меланома: у 4 пациентов – остановка прогрессии и стабилизация состояния в течение 20-21 месяца после терапии [121]</p> <p>Почечная карцинома: стабилизация состояния у 2 пациентов в течение 4-9 месяцев после терапии [121]</p> <p>AML: 5-year survival after therapy with autologous NK cells – 5%, after therapy with allogeneic NK cells – 60% [147]</p> <p>NSLC: decreased tumor progression in half of patients [71]</p> <p>Melanoma: tumor progression halted in 4 patients for 20-21 months after therapy [121]</p> <p>Renal carcinoma: 2 patients demonstrated stable disease for 4-9 months after therapy [121]</p>

M2-макрофаги, образовавшиеся под действием IL-4, IL-13 и CSF-1, которые секретируют раковые клетки, помогают в дальнейшем росту и распространению опухоли [57, 127]. IL4-индуцированные M2-макрофаги секретируют клеточные протеазы (катепсины В и S), что стимулирует рост, инвазию и метастазирование рака поджелудочной железы [49]. Исследования метастазирующего рака молочной железы показали, что опухолевые клетки могут секретировать цитокин CCL2 – мощный фактор хемотаксиса макрофагов, который в норме вызывает их миграцию в область воспаления. Макрофаги, привлеченные CCL2 в опухоль, секретируют фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), который увеличивает проницаемость сосудов и облегчает метастазирование опухолевых клеток в легкие и дру-

гие органы [139]. Для создания терапевтических схем с использованием макрофагов необходимо учитывать их двойственную роль в процессах опухолеобразования и ликвидации опухолевых клеток.

Современные методы противораковой иммунотерапии с помощью макрофагов можно разделить на две группы. В первую группу входят препараты, подавляющие пролиферацию и миграцию M2-макрофагов в опухоль. В этом контексте макрофаги рассматриваются не как средство, а как мишень терапии. К этой группе относится проходящее вторую фазу клинических испытаний моноклональное антитело CNTO 888 для лечения рака простаты, блокирующее хемокиновый рецептор CCL2 [132]. Кроме антител, существуют и блокаторы дифференцировки моноцитов

и М1-макрофагов в М2-макрофаги. Препараты бутилгидроксианизол, ТЕМРО, апоцинин и N-ацетил-L-цистеин препятствуют накоплению O_2 и других активных радикалов, которые необходимы для активации киназы ERK, направляющей дифференцировку моноцитов в М2-макрофаги [198]. Эффективность применения таких препаратов ограничивается невозможностью их точной доставки в очаги опухолеобразования. Помимо ингибиторов АФК, для смещения баланса между М1/М2-макрофагами в пользу М1-популяции можно использовать цитокиновую терапию, например, введение коктейля из IL-2, IFN γ и GM-CSF в организм будет стимулировать дифференцировку моноцитов в М1-макрофаги [32]. Некоторые препараты способны направленно подавлять дифференцировку моноцитов в М2-макрофаги, например, Yondelis (Trabectedin) – трис-тетрагидроизохинолиновый алкалоид из *Ecteinascidia turbinata*, способен связываться с ДНК, блокировать клеточный цикл и запускать p53-независимый апоптоз опухолевых клеток, при этом направленно подавляя экспрессию CCL2 и IL-4, что предотвращает переход моноцитов в опухоль-ассоциированные М2-макрофаги [4]. Yondelis оказывает антипролиферативное действие *in vitro* и *in vivo* в экспериментальных моделях опухолей человека, включая саркому, рак молочной железы, мелкоклеточный рак легкого, рак яичников и меланому [6, 16, 32, 109], препарат уже прошел клинические испытания и доступен для терапии.

Вторая группа объединяет способы клеточной терапии с помощью макрофагов. Были созданы трансгенные макрофаги, экспрессирующие цитохром P450 2B6 под контролем промотора, активирующегося в ответ на гипоксию. В опухоли часто возникает нехватка кислорода из-за недостаточной васкуляризации, поэтому модифицированные макрофаги начинают экспрессировать терапевтический ген после попадания в опухолевый очаг. Цитохром P450 2B6 необходим для расщепления циклофосамида до активных производных, таким образом, введение трансгенных макрофагов приводит к более направленному действию химиотерапии и позволяет использовать более высокие дозировки без развития осложнений [52]. Пока что экспериментальных работ по применению макрофагов, активированных или модифицированных *ex vivo*, достаточно мало, а клинических примеров нет вовсе. Это связано со сложностью получения классически-активированных макрофагов и поддержания их в этом состоянии после введения пациенту.

Дендритные клетки

Дендритные клетки (ДК), представляющие антигены Т-лимфоцитам, играют важную роль в иммунном ответе. ДК подразделяют на плазматоцитоподобные и миелоидные. Первые имеют

лимфоидное происхождение, активно секретируют интерфероны I типа, необходимые для созревания миелоидных ДК, активируют созревание Th1-лимфоцитов, а также стимулируют NK-клетки и макрофаги в процессе развития иммунного ответа [176]. Миелоидные ДК происходят от миелоидного предшественника и представляют антигенные детерминанты в комплексе с МНСI и МНСII цитотоксическим ($CD8^+$) и хелперным ($CD4^+$) Т-лимфоцитам. Миелоидные ДК могут мигрировать в лимфоидные органы, где активируют пролиферацию и дифференцировку антигенспецифичных Т-лимфоцитов, именно их чаще всего используют для клеточной терапии.

Клеточная терапия дендритными клетками используется для представления опухолевых антигенов эффекторным лимфоцитам ($CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеткам, а также В-клеткам). Разработано множество эффективных методик выделения и культивации ДК *ex vivo*. В процессе культивирования на дендритные клетки можно загрузить различные формы опухолевых антигенов, а затем ввести активированные клетки обратно пациенту [70, 200] (рис. 2). Эффективность такой иммунотерапии зависит не только от дендритных клеток, но и от образующихся в организме антигенспецифичных цитотоксических $CD8^+$ Т-лимфоцитов, непосредственно распознающих и уничтожающих опухолевые клетки. Роль введенных ДК сводится к индукции превращения наивных $CD8^+$ Т-клеток в цитотоксические.

Существует два различных способа для загрузки опухолевых антигенов на поверхности дендритных клеток *ex vivo*. Классический способ заключается в культивировании ДК с отдельными опухолевыми белками или пептидами, либо с цельным лизатом раковых клеток, и обработкой цитокинами, например, IL-4 и GM-CSF, стимулирующими созревание ДК [70, 128, 200]. Загрузку антигенов в ДК можно проводить при помощи виросом – наночастиц, содержащих фрагменты белка вируса гриппа, гемагглютинин и нейраминидазу, для обеспечения иммуногенных свойств. ДК захватывают виросомы путем клатрин-опосредованного эндоцитоза, фагоцитоза и макропиноцитоза, их содержимое направляется в позднюю эндосому, вследствие чего происходит сильная активация $CD4^+$ Т-клеток и выпуск IFN γ . Эффективность поглощения виросом гораздо выше, чем у традиционных липосом, и протекает быстрее (30 минут против 18 часов), поскольку использует рецептор-опосредованный эндоцитоз [8].

Другой способ заключается в генетической модификации дендритных клеток для экспрессии на их поверхности опухоль-ассоциированных антигенов. Преимущество этого способа состоит

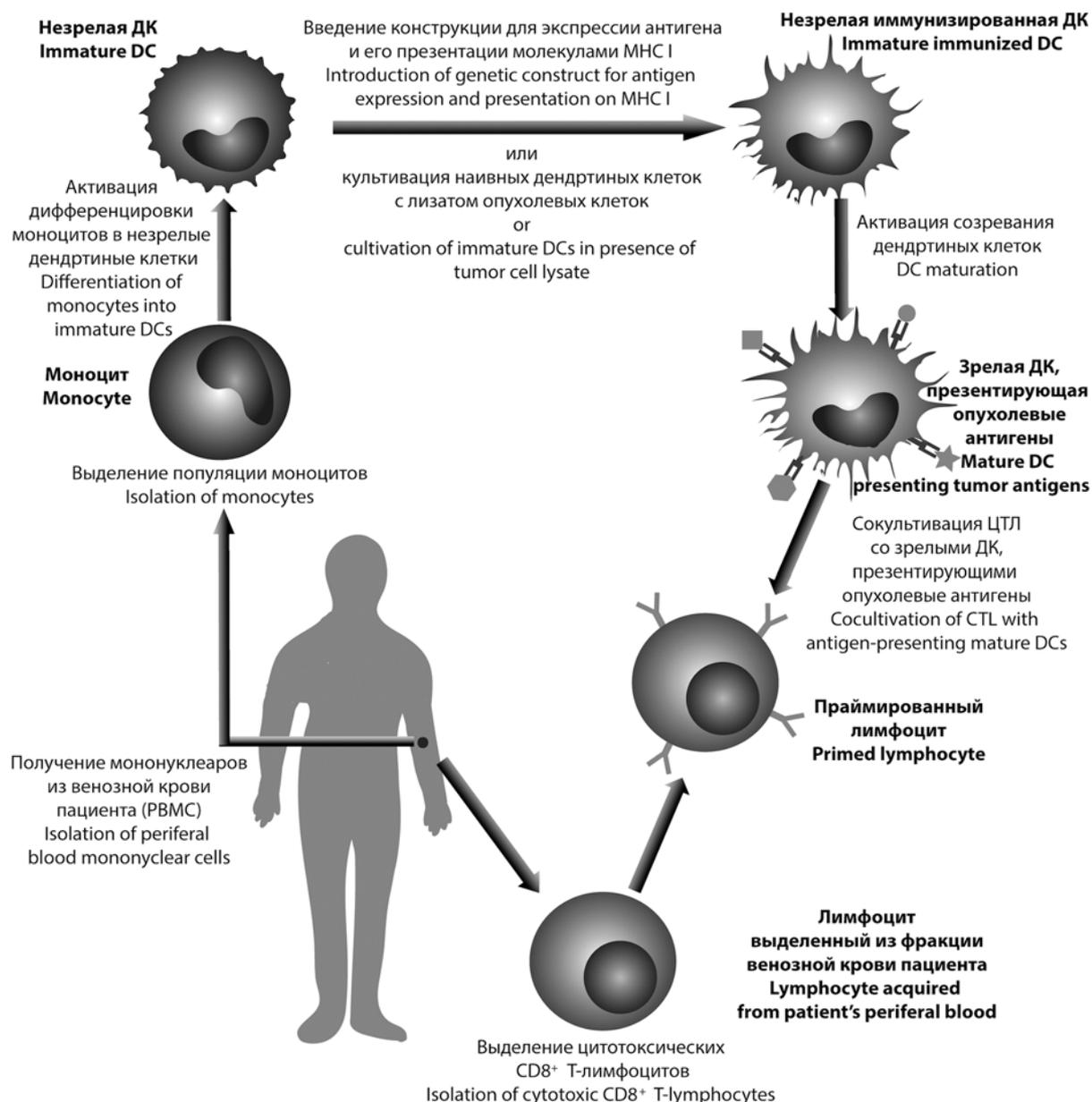


Рисунок 2. Пример *in vitro* созревания цитотоксических Т-лимфоцитов за счет кокультивации со зрелыми дендритными клетками, презентующими опухолевый антиген или целый спектр антигенов

Примечание. Дендритные клетки дифференцируются из моноцитов, выделенных из периферической крови, при культивации в питательной среде с добавлением IL-4 и GM-CSF. Зрелые дендритные клетки, презентующие опухолевые антигены, формируются при добавлении в среду активационного фактора, например, LPS. Дальнейшая передача антигена наивным CD8⁺ цитотоксическим Т-лимфоцитам происходит во время кокультивации ДК с наивными CD8⁺ Т-лимфоцитами, выделенными из периферической крови пациента. Затем активированные цитотоксические Т-лимфоциты вводятся обратно пациенту.

Figure 2. *In vitro* preparation of cytotoxic T lymphocytes by co-cultivation with mature dendritic cells presenting tumor antigens

Note. Dendritic cells are differentiated from monocytes acquired from peripheral blood by cultivation in presence of IL-4 and GM-CSF. Mature antigen-presenting DCs are formed by cultivation with LPS. Subsequently, antigen is presented during co-cultivation to naïve CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes that were isolated from patient's peripheral blood, later, activated CTLs are infused back into patient's bloodstream.

в стабильной экспрессии целевого антигена и его лучшей представленности на молекулах МНС I и МНС II. Такой подход позволяет экспрессировать на поверхности клетки определенный набор антигенов, в то время как загрузка клеточного лизата приводит к презентации многочислен-

ных антигенов, большей частью не специфичных для опухолевых клеток [11, 81].

Опухоль-ассоциированные регуляторные Т-клетки (T_{reg}) фенотипа CD4⁺/CD25⁺ могут препятствовать действию ДК за счет экспрессируемого на них белка CTLA-4. T_{reg} способны фор-

мировать кластеры вокруг ДК, а CTLA-4 может взаимодействовать с рецепторами CD80/CD86 на ДК, что приводит к понижению их экспрессии и подавлению секреции провоспалительных цитокинов TNF α и IL-12. Терапевтическое блокирование CTLA-4 восстанавливает ДК-опосредованный иммунный ответ [21].

Незрелые ДК, инфильтрировавшие в опухоль, обладают толерогенными свойствами и могут играть иммуносупрессивную роль. Инфильтрация незрелыми ДК способствует микроокружение опухоли за счет секреции различных факторов (IL-10, IL-6, PIGF-1, CCL3, TGF- β 1, VEGF-A, IDO, аргиназы [22]). На поверхности незрелых ДК присутствует рецептор PD-1, который подавляет активность CD8⁺ эффекторных Т-клеток [103]. Иммуносупрессорные ДК можно перепрограммировать в иммуностимуляторные введением микроРНК miR-155 [30]. Другой механизм подавления ДК опухолевыми клетками заключается в индукции экспрессии в ДК белка Satb1 (Special AT-rich sequence-binding protein-1). Такие ДК начинают активно секретировать IL-6 и галектин-1. Подавление Satb1 восстанавливает противоопухолевый фенотип ДК [169]. В условиях гипоксии, характерной для опухолевой ткани, в ДК может усиливаться экспрессия фактора ХВР1, обеспечивающего адаптацию, в результате чего они также теряют свою противоопухолевую активность. Процесс может быть обращен подавлением экспрессии ХВР1 [31].

Активное введение дендритно-клеточных вакцин в клиническую практику требует разработки более эффективных методов терапии. Для этого применяются адъюванты, усиливающие действие введенных ДК за счет формирования депо, индукции цитокинов и хемокинов, увеличения поглощения антигена, улучшения созревания АПК и представления антигена. В качестве адъювантов применяют соли алюминия MF59, AS03, AF03 и AS04. Также противоопухолевая и иммуномодуляторная активность была показана для полисахарида каррагенана, регулирующего созревание и функции ДК через TLR4 [100], полисахарида APS [76]. Проходит клинические испытания адъювант KLN (keyhole limpet hemocyanin), усиливающий неспецифический CD4⁺ иммунный ответ за счет CD8⁺Т-клеток [54]. Интересный способ активирования ДК предложен для лечения глиом [101], где в качестве активатора ДК использовали аденовирусный вектор, кодирующий гены белков *erhginA1*, энтеротоксина PE38 и GM-CSF, в результате чего подавляется ангиогенез в опухоли. Введением удалось стимулировать не только местный противоопухолевый иммунитет, но и вызвать системный иммуно-терапевтический эффект. В качестве адъюванта

могут также применяться антитела к рецептору CD69, который негативно регулирует иммунный ответ. Совместное введение с ДК приводит к снижению объема опухоли и повышению уровня пролиферации и активности Т-клеток в опытах *in vivo* [184].

Дендритно-клеточные вакцины пока остаются дорогостоящим методом лечения. Для снижения стоимости лечения было предложено использовать синтетические аналоги антиген-презентирующих клеток на основе полимеров. При использовании таких препаратов большую роль могут играть параметры мультивалентности, зависящие от длины полимера и плотности посаженных антител. Следствием введения таких иАПК может быть долговременное поддержание Т-клеточного иммунитета. иАПК могут быть созданы из липосом, нанотрубочек, полимерных шариков, и общей чертой для них является наличие трех компонентов, в которые входят молекулы главного комплекса гистосовместимости, костимулирующие молекулы на поверхности ДК (например, антитело к CD3, переключающий Т-клеточный рецептор) и цитокины [56].

Проводившиеся в течение последних 20 лет исследования дендритно-клеточных вакцин показали их высокую безопасность и эффективность. В таблице 2 перечислены некоторые перспективные препараты на основе ДК, которые уже применяются либо проходят клинические испытания.

Терапия с использованием клеток адаптивного иммунитета

Т-клеточная иммунотерапия

Т-лимфоциты составляют от 70 до 80% всех лимфоцитов и играют ключевую роль в иммунном ответе, поэтому Т-клеточная терапия активно используется для лечения онкопатологий. Т-лимфоциты способны распознавать специфические опухолевые антигены [84], кроме того, Т-клетки быстро пролиферируют, способны к длительному персистированию и просты в культивации *in vitro* [119], поэтому их применение часто оказывается предпочтительнее использования дендритных клеток и натуральных киллеров.

Для проведения Т-клеточной терапии лимфоциты пациента выделяют из мононуклеарной фракции крови, экспандируют *ex vivo* и вводят обратно. Могут применяться и аллогенные (донорские) цитотоксические Т-лимфоциты, обладающие сходным набором лейкоцитарных антигенов [113]. Экспансию *in vitro* проводят в среде с добавлением стимулирующих цитокинов, например IL-2 и IL-15, что повышает количество зрелых цитотоксических CD8⁺Т-клеток [114]. Полученные таким способом клоны CD8⁺Т-

ТАБЛИЦА 2. ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ АНТИГЕН-АКТИВИРОВАННЫХ ДК

TABLE 2. THERAPEUTICS BASED ON ANTIGEN-ACTIVATED DCs

Тип обработки ДК DC treatment	Вид опухоли и результаты Tumor type and results	Результаты клинических исследований Results of clinical trials
Стимуляция цитокинами Cytokine stimulation		
GM-CSF–IL-4 ДК из моноцитов + с/без добавления в среду HLA-A*0201 пептида GM-CSF–IL-4 DCs from primary monocytes with/without addition of HLA-A*0201 peptide	Метастазирующий рак простаты Metastatic prostate cancer	Впервые продемонстрирована способность ДК вызывать специфический иммунный ответ в отношении опухолевого антигена [126] First demonstration of ability of DCs to induce immune response against specific tumor antigen [126]
+ опухолевые пептиды опухолевые лизаты + tumor peptides, tumor total lysate	Карцинома почек и злокачественная глиома IV стадия меланомы Melanoma stage IV, renal carcinoma, malignant glioma	Протестирована загрузка смеси опухолевых антигенов на ДК, у 70% пациентов развился иммунный ответ Показана безопасность и биоактивность вакцин на ДК [64, 128, 192] First test of <i>in vitro</i> loading of multiple tumor antigens on DCs, 70% of patients showed immune response to tumor First proof of safety and bioactivity of DC-based cancer vaccines [64, 128, 192]
+ составной белок (PA2024), образованный из GM-CSF и фосфатазы предстательной железы [154] дополнительное введение в организм IL-2 [185] + complex protein (PA2024), consisting of GM-CSF and PSAP [154] additional treatment with IL-2 [185]	Рак простаты Prostate cancer	
Загрузка пептидных антигенов в ДК WT1, MUC1 и CA125 [91, 93] Loading with peptide antigens WT1, MUC1 and CA125 [91, 93]	IV стадия карциномы почек Renal carcinoma stage IV	
Загрузка ДК пептидами-производными p53 [163] Стимуляция некротическими опухолевыми клетками и TNFα [19] Loading with p53-derived peptides [163] Stimulation with necrotic tumor cells and TNF α [19]	Рак яичников, рак поджелудочной железы, толстого кишечника, рак груди, рак легких, немелкоклеточный рак легкого Ovarian, pancreatic, colon, breast cancers, NSCLC	
Стимуляция клетками аденокарциномы, гиперэкспрессирующими маркеры Her-2/neu, CEA, Mage 2, WT-1¹⁵ и survivin [63] Стимуляция цитокинами и химическое слияние ДК и клеток меланомы [144] Загрузка белком Id [171] Загрузка белками опухолевого лизата [25, 86, 111, 180, 190] Stimulation with cancer cells expressing Her-2/neu, CEA, Mage 2, WT-1 ¹⁵ and survivin [63] Cytokine stimulation, fusion of DCs with melanoma cells [144] Loading with Id [171] Loading with total tumor lysate [25, 86, 111, 180, 190]	В-клеточная лимфома Т-клеточная лимфома, глиобластома, глиома, астроцитомы, рак желчного пузыря B cell lymphoma, T cell lymphoma, glioblastoma, glioma, astrocytoma, gallbladder cancer	

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Тип обработки ДК DC treatment	Вид опухоли и результаты Tumor type and results	Результаты клинических исследований Results of clinical trials
Аутологичные ДК в сочетании с ОК-432 Autologous DCs combined with ОК-432	Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	Результатов нет NCT00795977 No results NCT00795977
Аутологичные ДК в сочетании с Hiltonol Autologous DCs combined with Hiltonol	Солидная опухоль Solid tumors	Исследования продолжаются NCT01734564 On-going trials NCT01734564
Загрузка ДК опухолевым лизатом с комбинированием химиотерапии Epirubicin + Ciclofosfamide и Docetaxel Loading with total tumor lysate combined with therapy with Epirubicin + Ciclofosfamide and Docetaxel	HER2-негативный рак груди HER2-negative breast cancer	Результатов нет NCT01431196 No results NCT01431196
Загрузка аутологичными антигенами опухолевого лизата Loading with authologous antigens from tumor lysate	Колоректальный рак Colorectal cancer	Исследования не продолжаются Trial concluded
Загрузка антигенов из клеток лизата ли- нии HepG2 [130] Loading with antigens from HepG2 cell line [130]	Гепатоклеточная карци- нома Hepatocellular carcinoma	Стабилизация течения заболевания у 28% больных в периоде от 6 до 16 месяцев, средняя выживаемость – 128 дней 28% of patients showed stable disease in peroid of 6 to 16 months, with median survival of 128 days
Загрузка антигенами лизата саркомы мягких тканей Loading with total tumor lysate from soft tissue sarcoma	Саркома мягких тканей Soft tissue sarcoma	Выживаемость 6 месяцев без про- грессирования NCT01883518 Survival for 6 month without disease progression NCT01883518
Трансфекция ДК Аутологичной опухолевой РНК DCs transfected with authologous tumor RNA	Рак кишечника Colon cancer	
Поксвирусами, кодирующими MUC1 и CEA [124] DCs transfected with poxvectors encoding MUC1 and CEA [124]	Рак толстого кишечника Colon cancer	Двухлетняя выживаемость без реци- дивов Two-year survival without disease relapse
Цитоплазматическая трансдукция ДК плазмидами рСТР, кодирующими антиге- ны AFP, MAGE-1 и glypican-3 (GPC3) [164] Transduction of DCs with plasmids рСТР expressing antigens AFP, MAGE-1 and glypican-3 (GPC3) [164]	Прогрессирующая гепа- токлеточная карцинома Progressing hepatocellular carcinoma	Хорошая переносимость и индукция противоопухолевого иммунного от- вета, клинический ответ только у од- ного из пяти пациентов Safe and well-tolerated, T cell responses against tumor antigens, clinical response in 1 out of 5 patients

лимфоцитов, нацеленные против антигенов MART1MelanA и gp100, трансплантировались пациентам с метастатической меланомой. Лечение привело к регрессии опухоли у 8 из 10 пациентов [191]. Терапия CD8⁺Т-клетками пациентов, перенесших удаление гепатоцеллюлярной карциномы, привела к снижению вероятности возникновения рецидивов на 18% [165].

Длительное время считалось, что для Т-клеточной терапии достаточно только CD8⁺Т-лим-

фоцитов. Однако хронический воспалительный процесс, сопровождающий рост опухоли, преобразует иммунную систему: увеличивается уровень IL-17 [95], возрастает количество и активность регуляторных Т-клеток [188] и миелоидных супрессорных клеток [27]. Эффективность Т-клеточной терапии также зависит от количества и соотношения провоспалительных и супрессорных клеток [118]. Для ее повышения используют комбинацию цитотоксических и CD4⁺Т-хелперных

(Th) клеток [53]. В зависимости от подтипа, CD4⁺T-лимфоциты регулируют иммунный ответ, секретируя различные цитокины, активация Т-хелперов происходит после распознавания Т-клеточным рецептором антигена, связанного с МНСII. Для Т-клеточной терапии чаще всего применяют Th1-клетки, которые вырабатывают IFN γ и IL-2, что стимулирует пролиферацию и созревание CD8⁺T-лимфоцитов [108]. Th2-клетки секретируют IL-4, IL-5 и IL-6, необходимые для дифференцировки В-клеток и синтеза ими антител. Третий подтип, Th17, секретирует большие количества провоспалительного цитокина IL-17 и также активно участвует формировании противоопухолевого ответа [2, 59, 98]. Было показано, что Th17-лимфоциты эффективнее подавляют развитие меланомы, чем наивные (Th0) и Th1-клетки [115, 125].

Наивные Т-лимфоциты приобретают специфичность после контакта с антигенпрезентирующими клетками, несущими опухолевый антиген. Такой контакт можно провести *ex vivo*, за счет кокультивации Th0-лимфоцитов вместе со зрелыми дендритными клетками [161]. Т-клеточная терапия с использованием этого метода особенно эффективна за счет точного нацеливания Т-лимфоцитов на трансформированные клетки [143]. Существует масса успешных примеров применения такой терапии: в работе [140] показано, что кокультивирование цитокин-активированных ДК и наивных Т-лимфоцитов приводит к образованию большого количества CD3⁺/CD8⁺T-лимфоцитов, а их противоопухолевый эффект выше, чем оказываемый цитокин-активированными Т-лимфоцитами. В другой работе CD8⁺T-лимфоциты кокультивировали с дендритными клетками, до этого содержащимися в среде с тотальным лизатом опухолевых клеток РМЖ MCF7 и MDA-MB231, экспрессирующих антиген MUC1. Было показано, что наибольшей представленностью на ДК обладает эпитоп MUC1 M1,2. После кокультивации наибольшее количество CD8⁺T-лимфоцитов оказались специфичными именно этому эпитопу. Помимо появления специфических цитотоксических клеток, была зарегистрирована переориентация наивных Th0-лимфоцитов в Th1, что дополнительно усиливает терапевтический эффект [9]. Клинические исследования показали, что введение кокультивированных *in vitro* ДК, ЦТЛ и цитокин-индуцированных Т-клеток пациентам с первичным раком печени, холангиокарциномой, раком легкого, желудка или толстого кишечника, привело к изменению иммунного статуса: снизилось количество регуляторных Т-клеток, а в некоторых случаях повысилось количество цитотоксических Т-лимфоцитов. Дополнительно подтвердило по-

зитивный терапевтический эффект и снижение концентрации опухолевых маркеров в сыворотке крови у большинства пациентов [183].

Для Т-клеточной иммунотерапии можно использовать CD8⁺T-лимфоциты, генетически модифицированные *ex vivo*. Специфичность Т-клеток «переопределяют», вводя в них новые гены Т-клеточного рецептора (TCR) [36]. Изначально для этого использовали кДНК α - и β -цепей Т-клеточного рецептора [14, 28], однако такой подход оказался недостаточно эффективным и нередко приводил к образованию гибридных TCRов за счет слияния эндогенных и трансдуцированных α - и β -цепей и последующему возникновению реакции «трансплантат против хозяина» [3]. В настоящее время для переопределения специфичности Т-лимфоцитов в основном используются химерные рецепторы (рис. 3). CAR способны распознавать любые антигены, а не только представленные в комплексе с МНС. Это позволяет преодолеть проблему слабой экспрессии молекул МНС в некоторых типах опухолевых клеток, что делает их «невидимыми» для обычных цитотоксических Т-лимфоцитов [174, 199]. Помимо белковых антигенов, химерные рецепторы способны распознавать ганглиозиды и протеогликаны, присутствующие на поверхности опухолевых клеток [1, 110, 145]. Эндогенные Т-клеточные рецепторы в модифицируемых клетках при этом могут быть быстро и эффективно подавлены при помощи CrispR/CAS9 [141].

CAR состоит из трех доменов: внутриклеточного эндодомена, трансмембранной части и внеклеточного эктодомена. Эктодомен состоит из одноцепочечного вариабельного фрагмента антитела (scFv) и спейсерной области, соединяющей scFv с трансмембранным доменом. Спейсер должен быть достаточно подвижен, чтобы антигенсвязывающий домен мог свободно ориентироваться для захвата антигена. Для этого обычно используют шарнирную область IgG1 или IgG4, реже применяют шарнирные домены IgD и CD8 [65, 186].

Трансмембранная часть эндодомена представляет собой гидрофобную альфа-спираль, в зависимости от ее структуры различается эффективность включения рецептора в мембрану клетки [137]. В качестве этой области CAR используют трансмембранные домены рецепторов CD3 ζ , CD4, CD8 и CD28 [66, 80, 122, 157, 168].

Эндодомен необходим для запуска активирующего сигнала в Т-лимфоците после связывания антигена. В первом поколении CAR для этого используется ζ -цепь CD3, что проводит активацию Т-лимфоцита через молекулы комплекса CD3-ТКР-CD4(CD8) [149]. Распознавание анти-

генов этими рецепторами приводит к увеличению секреции противоопухолевых цитокинов и повышению пролиферативной активности CAR-T-лимфоцитов [5, 39, 72]. Самые ранние клинические испытания CAR первого поколения проводились на пациентах с гематологическими типами онкопатологий. Все испытания продемонстрировали отсутствие какого-либо выраженного терапевтического эффекта. Результаты характеризовались полным отсутствием экспансии (пролиферации) введенных модифицированных Т-клеток, а также сравнительно коротким периодом их жизни, даже когда проводилась предварительная лимфодеплеция (снижение общего количества Т-лимфоцитов, направленное на удаление регуляторных Т-клеток) [73, 170]. Аналогичный эффект наблюдался в клинических испытаниях CAR-рецепторов 1-поколения, специфичных к таким опухолевым маркерам, как карбоангидраза IX (CAIX), CD171, фолатный рецептор альфа (FR- α) и GD2, которые характерны ряду солидных типов рака. Более того, при испытании CAIX-специфичного рецептора у двух пациентов (из 3-х) развилась невирусная форма гепатита, в связи с высокой экспрессией CAIX в клетках желчных протоков [85, 96, 97, 110, 138].

В рецепторах второго и третьего поколений увеличение пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на активацию CAR достигается путем включения дополнительных костимуляторных доменов в цитоплазматическую область рецептора. Наиболее часто в качестве костимуляторных доменов используются сигнальные последовательности рецептора CD28 и рецепторов семейства TNF α 4-1BB (CD137) и OX40 (CD134). Испытания Т-клеточных препаратов с такими CAR на мышинной ксенографтной модели показали их высокую эффективность [12, 136]. Также в некоторых случаях могут использоваться последовательности рецепторов DAP10 и ICOS (CD278) [38, 55, 67, 107, 117, 158, 159]. Так, например, использование популяции CAR-специфичных T_H17-лимфоцитов для терапии некоторых типов онкопатологий требует замены классического сигнального домена рецептора CD28 на сигнальный домен ICOS. Замена CD28 на ICOS приводит к повышению пролиферативной активности T_H17 лимфоцитов, а также к увеличению выработки таких цитокинов, как IL-21, IL-17, IFN γ [55]. В состав CAR также вводят последовательность IL-12, чья экспрессия должна запускаться в ответ на активацию химерного рецептора после контакта с антигеном. Благодаря накоплению IL-12, к опухоли будут привлекаться клетки врожденного иммунитета, которые смогут атаковать также раковые клетки, не экспрессирующие целевой антиген [24, 131].

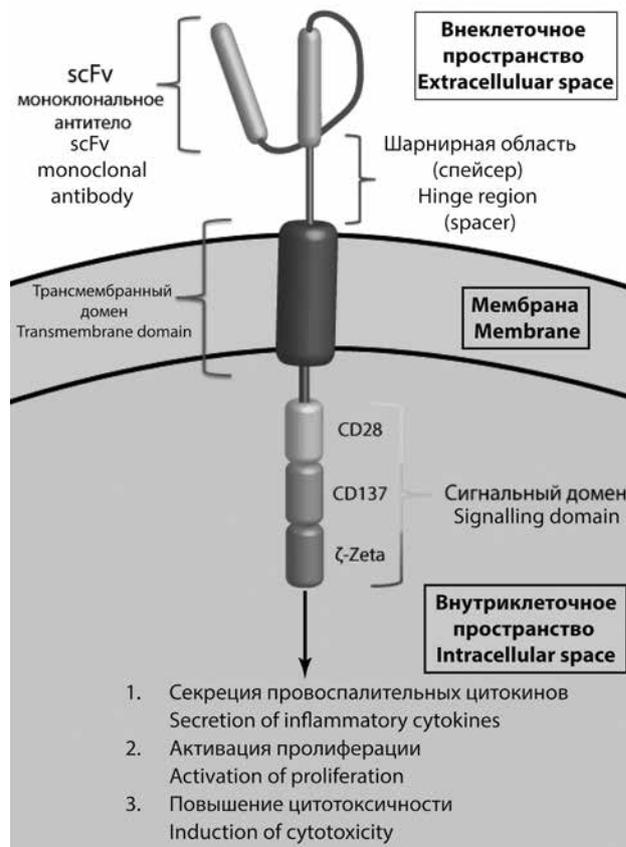


Рисунок 3. Структура CAR третьего поколения

Примечание. В качестве эндомена используется сочетание сигнальных доменов от различных клеточных рецепторов (CD28, CD137, CD3 ζ), что обеспечивает более полный цитотоксический ответ Т-клетки. В качестве антигенраспознающего домена используется антиген-специфичное моноклональное антитело, благодаря чему цитотоксический Т-лимфоцит может быть активирован практически к любому опухоль-ассоциированному антигену.

Figure 3. Structure of third-generation CAR

Endodomain consists of three signaling domains from different receptors (CD28, CD137, CD3 ζ), which allows to fully activate cytotoxic T-cell. Single-chain variable fragment of antigen-specific monoclonal antibody is used as antigen-binding domain, which allows to target CTLs towards virtually any tumor associated antigen.

В случае использования технологии химерных рецепторов специфичность и безопасность терапии напрямую зависит от выбора молекулы-мишени, экспрессирующейся на поверхности опухолевой клетки. Однако любой известный на сегодняшний день опухоль-ассоциированный антиген экспрессируется и на других типах клеток. В результате подобной терапии могут наблюдаться значительные побочные эффекты. Для повышения специфичности действия CAR-T-клеток разрабатываются многокомпонентные схемы, в которых активация Т-клетки

происходит только под действием сочетания нескольких сигналов (т.н. AND-gate). Для этого одновременно экспрессируют два типа химерных рецепторов, специфичных к различным опухолю-ассоциированным антигенам, при этом цитоплазматическая область одного из рецепторов представлена сигнальным доменом CD3 ζ (CD247), а другой рецептор имеет лишь костимулирующие домены, характерные для второго поколения CAR [88, 187]. Основным недостатком таких систем заключается в неполной репрессии Т-клеток в присутствии одного из антигенов, а также неполной активации в ответ на связывание пары антигенов из-за несоординированной экспрессии химерных рецепторов. Более специфичное действие AND-gate было показано для системы, в которой контакт с первым антигеном активирует транскрипционный фактор, запускающий экспрессию полноценного CAR против второго опухолевого антигена [146].

Нацеливание Т-клеток на опухолевый антиген нередко вызывает экспансию антиген-негативных опухолевых клонов и возникновение устойчивости к терапии. Для увеличения широты действия разрабатывают химерные рецепторы, нацеленные одновременно на два и более опухолевых антигена. Активация Т-клеток в этом случае наступает при контакте с любым из целевых антигенов (т.н. OR-gate). Внеклеточная часть таких рецепторов состоит из нескольких scFv, соединенных подвижными пептидными линкерами [50, 195].

Для предотвращения неспецифической активации Т-клеток могут применяться ингибирующие химерные рецепторы – iCAR. В качестве внутриклеточной части в iCAR вводят ингибиторные сигнальные домены на основе PD1 или CTLA4, соединенные с антигенраспознающим внеклеточным участком. Лигирование iCAR и соответствующего антигена приводит к обратимой супрессии Т-клеток [43]. Применение iCAR в паре с обычным химерным рецептором, исходя из логики наименования, будет представлять собой NOT-gate.

Для более тонкого контроля над цитотоксическим действием CAR-Т-лимфоцитов была предложена система ON-switch – разновидность AND-gate. Химерный рецептор экспрессируется в виде двух независимых последовательностей: антигенраспознающего участка, соединенного с внутриклеточным костимуляторным доменом и доменом гетеродимеризации FKBP, и лишеного внеклеточной части сигнального домена рецептора CD3 ζ , слитого с доменом гетеродимеризации FRB. Для активации связавшихся с опухолевым антигеном CAR-Т-клеток необходимо присутствие малой молекулы рапамицина, запу-

скающей гетеродимеризацию двух цепей и формирующей активный химерный рецептор. Варьируя дозу рапамицина (или его функционального аналога AP21967) и режим его введения, можно регулировать активность CAR-Т-лимфоцитов, что позволяет избежать развития побочных эффектов от быстрого введения больших количеств активных иммунных клеток и следующего за этим массивного лизиса опухоли [189].

Альтернативой применению ON-switch может быть использование негативной регуляции – «суицидального» гена (conditional suicide gene) iCasp9 – индуцибельной формы каспазы-9, активирующейся под действием димеризующего агента AP1903, что вызывает быстрый апоптоз модифицированных лимфоцитов [44]. Также используют системы тетрациклиновой регуляции (Tet on-off system) для управления экспрессией химерного рецептора без повреждения CAR-Т-клеток [133, 151].

Клинические исследования показали эффективность терапии при помощи CAR-Т-клеток гематологических неоплазий, при этом солидные опухоли отвечают на такое лечение хуже. Возможно, текущие результаты не полностью раскрывают терапевтический потенциал химерных рецепторов, поскольку исследования проводятся на поздних стадиях заболевания, после исчерпания стандартных терапевтических методов, когда организм пациента сильно ослаблен. Даже в этих случаях терапия последними поколениями CAR-Т-клеток редко приводит к развитию осложнений, что подтверждает высокую степень безопасности такого лечения.

Современные проблемы иммунотерапии рака

Накопление фундаментальных знаний о причинах возникновения онкологических заболеваний и механизмах иммунологического надзора позволили существенно расширить арсенал имеющихся способов терапии онкопатологий. Нерешенными остаются некоторые важные вопросы, препятствующие созданию унифицированных и эффективных терапевтических методик. Один из них – проблема поиска специфичных раковых антигенов, в максимальной степени характерных для того или иного типа опухолей. Пока что для этого не существует универсального и быстрого способа, имеется лишь сравнительно скромный список антигенов, относительно специфичных для некоторых типов опухолей, и обнаружение каждого из них – результат сложных фундаментальных исследований. Другая проблема состоит в достаточно медленном внедрении иммунотерапевтических протоколов лечения и проведения клинических испытаний. По большей части клинические испытания проводятся после всех стандартных методов лечения

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ХИМЕРНЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

TABLE 3. CLINICAL TRIALS OF DIFFERENT TYPES OF CHIMERIC RECEPTORS

Антиген Antigen	Тип опухоли Tumor type	Поколение рецептора/ структура сигнального домена CAR generation/ signalling domain	Фаза клинических испытаний CT phase	Результат/ссылки (идентификатор клинического исследования) CT result/ID
CD19	В-ОЛЛ (острый В-лимфобластный лейкоз) B-ALL	CD28-CD3 ζ	Фаза II Phase II	В первой фазе клинических испытаний наблюдался полный ответ на терапию у 14 из 16 пациентов NCT02535364 [34] During phase I 14 out of 16 patients achieved complete response to treatment NCT02535364 [34]
	CD19 ⁺ Лейкозы CD19 ⁺ Leukemia	4-1BB-CD3 ζ	Фаза I/II Phase I/II	9 пациентов. У 1 из 2 пациентов с дополнительным курсом химиотерапии наблюдался полный ответ с частичным восстановлением экстрамедуллярных поражений. У 4 из 7 пациентов без дополнительного курса химиотерапии наблюдался частичный ответ с восстановлением экстрамедуллярных тканей NCT02028455 NCT01864889 [33] Total of 9 patients, 1 out of 2 which received conditioning chemotherapy achieved full response with partial regression of extramedullary lesions. 4 out of 7 patients without chemotherapy achieved partial response and some regression of extramedullary lesions
	В-клеточная лимфома B cell lymphoma	CD27-CD28-41BB-CD3 ζ	Фаза I Phase I	NCT02247609
CD20	CD20 ⁺ В-клеточная лимфома CD20 ⁺ B cell lymphoma	CD28-CD3 ζ ,	Фаза I Phase I	NCT02965157 NCT02737085 NCT00621452
		CD28-CD137-CD3 ζ	Доклиника Pre-clinical	У двух из четырех пациентов наблюдалась стабилизация заболевания в течение 12 и 24 месяцев. У одного пациента наблюдался частичный ответ 2 out of 4 patients achieved stable disease for 12 and 24 months. 1 patient achieved partial response NCT00621452
CD30	CD30 ⁺ лимфомы CD30 ⁺ lymphoma	CD28-CD3 ζ	Доклиника/ Фаза I Pre-clinical/ Phase I	NCT03049449 NCT02259556 [68]

Таблица 3 (продолжение)
Table 3 (continued)

Антиген Antigen	Тип опухоли Tumor type	Поколение рецептора/ структура сигнального домена CAR generation/ signalling domain	Фаза клинических испытаний CT phase	Результат/ссылки (идентификатор клинического исследования) CT result/ID
CD22	CD22⁺В-клеточная лимфома CD22 ⁺ B cell lymphoma	4-1BB-CD3 ζ	Фаза I Phase I	NCT02315612 [60]
CD33	ОМЛ AML	4-1BB-CD3 ζ	Фаза I/II Phase I/II	1 пациент. Заметное снижение количества бластных клеток костного мозга через 2 недели после инфузии. Через 9 недель наблюдалось постепенное прогрессирование заболевания NCT02958397 NCT01864902 [83, 182] 1 patient, marked decrease of bone marrow blasts 2 weeks after therapy, slow disease progression after 9 weeks. NCT02958397 NCT01864902 [83, 182]
CD38	Множественная миелома Multiple myeloma	4-1BB-CD3 ζ	Доклиника Pre-clinical	[37]
CD44v6	ОМЛ, множественная миелома AML, multiple myeloma	CD28-CD3 ζ	Доклиника Pre-clinical	[17]
CD123	ОМЛ, Множественная миелома AML, multiple myeloma	4-1BB-CD3 ζ	Доклиника Pre-clinical	[48]
CEA	Рак печени, толстой кишки Hepatic cancer, colon cancer	CD28-CD3 ζ	Фаза I Phase I	У 3 пациентов (с дополнительным введением IL-2) из 6 наблюдалось 37% снижение количества СЕА-положительных клеток. Данные биопсии продемонстрировали усиление процессов некроза и фиброза в метастазах печени у 4 из 6 пациентов NCT02349724 NCT02416466 [82, 181] 3 patients who received additional treatment with IL-2 achieved decreased by 37% CEA-positive cell counts. Biopsy confirmed necrosis and fibrosis in liver metastasis in 4 out of 6 patients NCT02349724 NCT02416466 [82, 181]

Таблица 3 (продолжение)
Table 3 (continued)

Антиген Antigen	Тип опухоли Tumor type	Поколение рецептора/ структура сигнального домена CAR generation/ signalling domain	Фаза клинических испытаний CT phase	Результат/ссылки (идентификатор клинического исследования) CT result/ID
EGFRvIII	Глиобластома Glioblastoma	CD28-41BB- CD3 ζ	Доклиника/ Фаза I Pre-clinical/ Phase I	NCT02209376 [78]
ERBB2/ HER2	HER2⁺ метастатиче- ские типы рака HER2 ⁺ metastatic breast cancer	CD28-CD3 ζ	Фаза I/II Phase I/II	У 17 из 19 пациентов наблюдалось стабильное течение заболевания от 12 до 14 недель после проведения терапии NCT00924287 17 out of 19 patients achieved stable disease for 12 to 14 weeks after therapy NCT00924287
Двойной рецептор HER2/ IL-13Rα2 HER2/ IL-13R α 2 dual receptor	Глиобластома Glioblastoma	CD28-CD3 ζ	Доклиника Pre-clinical	[62]
IL13R α 2	Глиома Glioma	CD3 ζ	Case report	Частичный ответ на терапию на- блюдался у 2 пациентов из 3. Анализ опухолевой ткани одного из пациен- тов показал полное удаление всех IL-13Rα2 положительных клеток. Маг- нитно-резонансная томография вто- рого пациента показала увеличение объема некротизированных тканей опухоли NCT00730613 [13] 2 out of 3 patients achieved partial response to therapy. Reduced overall IL-13R α 2 expression within the tumor following treatment in 1 patient, MRI indicated increase in tumor necrotic volume in another patient NCT00730613 [13]
GD2	Остеосаркома, нейробластома, меланома Osteosarcoma, neuroblastoma, melanoma	OX40-CD28- CD3 ζ	Фаза I Phase I	У 3 из 11 пациентов с активно про- грессирующим заболеванием на- блюдалась полная ремиссия. У всех пациентов наблюдалось достаточно долгое персистирование модифици- рованных Т-клеток в организме NCT00085930 NCT02107963 3 out of 11 patients with progressing disease achieved complete remission, all patients demonstrated prolonged circulation of modified T cells NCT00085930 NCT02107963

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

Антиген Antigen	Тип опухоли Tumor type	Поколение рецептора/ структура сигнального домена CAR generation/ signalling domain	Фаза клинических испытаний CT phase	Результат/ссылки (идентификатор клинического исследования) CT result/ID
GD2- iCasp9 + iCAR PD1	Меланома Melanoma	OX40-CD28- CD3 ζ	Доклиника Pre-clinical	[45]
GD3	Меланома Melanoma	CD28-CD3 ζ	Доклиника Pre-clinical	[106]
Тп гликоформа MUC1 MUC1 Tn- Glycoform	Т-клеточный лейкоз, рак поджелудочной железы T cell leukemia, pancreatic cancer	4-1BB-CD3 ζ	Доклиника Pre-clinical	[135]
MUC16	Рак яичника Ovarian cancer	CD28-CD3 ζ	Фаза I/II Phase I/II	[94]
Meso- thelin	Аденокарцинома поджелудочной железы Pancreatic adenocarcinoma	Не указано n/a	Фаза I Phase I	NCT01897415
	Рак яичника, злокачественная мезотелиома Ovarian cancer, malignant mesothelioma	CD28-41BB- CD3 ζ	Доклиника Pre-clinical	[15]
ROR1	Лимфосаркома, В-клеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) Lymphosarcoma, B cell leukemia, ALL	CD28-CD3 ζ	Фаза I Phase I	NCT02706392
L1-CAM (CD171)	Нейробластома Neuroblastoma	41BB-CD3 ζ	Фаза I Phase I	NCT02311621
	Ганглионейробластома Ganglioneuro- blastoma	CD28-41BB- CD3 ζ		

на пациентах, находящихся на терминальных стадиях заболевания. В результате даже наиболее успешные иммунотерапевтические подходы оказываются малоэффективны, что смазывает картину всего исследования. В будущем, при внедрении иммунотерапевтических подходов в практику, важной проблемой станет и экономическая сторона лечения. Большинство методов клеточной терапии требуют проведения сложных и дорогостоящих манипуляций с клетками, что делает их труднодоступными для большинства пациентов. Вопрос о том, может ли иммунотера-

пия когда-нибудь вытеснить другие стандартные методы лечения онкологических заболеваний, пока остается открытым.

Заключение

Недавно войдя в клиническую практику и еще пребывая на стадии становления в качестве терапевтического подхода, клеточная иммунотерапия демонстрирует высокую эффективность при лечении различных видов опухолей. Совершенствование имеющихся и создание новых методов клеточной терапии позволит определить

оптимальные стратегии терапии для разных типов онкопатологий. Пока существует множество нерешенных проблем, в том числе связанных со способностью опухоли к самостоятельному перепрограммированию клеток иммунной системы и созданию микроокружения, благоприятствующего росту и инвазии. Решение этих проблем

потребуется не только разработки лучших методов получения клеточных популяций *ex vivo*, но и расширения наших знаний о механизмах взаимодействия опухолевых клеток с иммунной системой. Выполнение этих задач делает клеточную иммунотерапию наиболее эффективным и безопасным способом противораковой терапии.

Список литературы / References

1. Abken H., Hombach A., Heuser C., Reinhold U. A novel strategy in the elimination of disseminated melanoma cells: chimeric receptors endow T cells with tumor specificity. *Recent Results Cancer Res.*, 2001, Vol. 158, pp. 249-264.
2. Aggarwal S., Gurney A.L. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, Vol. 71, no. 1, pp. 1-8.
3. Aggen D.H., Chervin A.S., Schmitt T.M., Engels B., Stone J.D., Richman S.A., Piepenbrink K.H., Baker B.M., Greenberg P.D., Schreiber H., Kranz D.M. Single-chain ValphaVbeta T-cell receptors function without mispairing with endogenous TCR chains. *Gene Ther.*, 2012, Vol. 19, no. 4, pp. 365-374.
4. Allavena P., Signorelli M., Chieppa M., Erba E., Bianchi G., Marchesi F., Olimpico C.O., Bonardi C., Garbi A., Lissoni A., de Braud F., Jimeno J., D'Incalci M. Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. *Cancer Res.*, 2005, Vol. 65, no. 7, pp. 2964-2971.
5. Altenschmidt U., Klundt E., Groner B. Adoptive transfer of *in vitro*-targeted, activated T lymphocytes results in total tumor regression. *J. Immunol.*, 1997, Vol. 159, no. 11, pp. 5509-5515.
6. Avila-Arroyo S., Nunez G.S., Garcia-Fernandez L.F., Galmarini C.M. Synergistic effect of trabectedin and olaparib combination regimen in breast cancer cell lines. *J. Breast Cancer*, 2015, Vol. 18, no. 4, pp. 329-338.
7. Benson D.M., Jr., Bakan C.E., Zhang S., Collins S.M., Liang J., Srivastava S., Hofmeister C.C., Efebera Y., Andre P., Romagne F., Blery M., Bonnafous C., Zhang J., Clever D., Caligiuri M.A., Farag S.S. IPH2101, a novel anti-inhibitory KIR antibody, and lenalidomide combine to enhance the natural killer cell versus multiple myeloma effect. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 24, pp. 6387-6391.
8. Blom R.A., Amacker M., Moser C., van Dijk R.M., Bonetti R., Seydoux E., Hall S.R., von Garnier C., Blank F. Virosome-bound antigen enhances DC-dependent specific CD4⁺ T cell stimulation, inducing a Th1 and Treg profile *in vitro*. *Nanomedicine (London, England)*, 2017, Vol. 13, no. 5, pp. 1725-1737.
9. Bohnenkamp H.R., Coleman J., Burchell J.M., Taylor-Papadimitriou J., Noll T. Breast carcinoma cell lysate-pulsed dendritic cells cross-prime MUC1-specific CD8⁺ T cells identified by peptide-MHC-class-I tetramers. *Cell, Immunol.*, 2004, Vol. 231, no. 1-2, pp. 112-125.
10. Boiardi A., Silvani A., Ruffini P.A., Rivoltini L., Parmiani G., Broggi G., Salmaggi A. Loco-regional immunotherapy with recombinant interleukin-2 and adherent lymphokine-activated killer cells (A-LAK) in recurrent glioblastoma patients. *Cancer Immunol Immunother.*, 1994, Vol. 39, no. 3, pp. 193-197.
11. Breckpot K., Dullaers M., Bonehill A., van Meirvenne S., Heirman C., de Greef C., van der Bruggen P., Thielemans K. Lentivirally transduced dendritic cells as a tool for cancer immunotherapy. *J. Gene Med.*, 2003, Vol. 5, no. 8, pp. 654-667.
12. Bridgeman J.S., Hawkins R.E., Bagley S., Blaylock M., Holland M., Gilham D.E. The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 12, pp. 6938-6949.
13. Brown C.E., Badie B., Barish M.E., Weng L., Ostberg J.R., Chang W.C., Naranjo A., Starr R., Wagner J., Wright C., Zhai Y., Bading J.R., Ressler J.A., Portnow J., D'Apuzzo M., Forman S.J., Jensen M.C. Bioactivity and safety of IL13Ralpha2-redirection chimeric antigen receptor CD8⁺ T cells in patients with recurrent glioblastoma. *Clin. Cancer Res.*, 2015, Vol. 21, no. 18, pp. 4062-4072.
14. Calogero A., Hospers G.A., Kruse K.M., Schrier P.I., Mulder N.H., Hooijberg E., de Leij L.F. Retargeting of a T cell line by anti MAGE-3/HLA-A2 alpha beta TCR gene transfer. *Anticancer Res.*, 2000, Vol. 20, no. 3A, pp. 1793-1799.
15. Carpenito C., Milone M.C., Hassan R., Simonet J.C., Lakhani M., Suhoski M.M., Varela-Rohena A., Haines K.M., Heitjan D.F., Albelda S.M., Carroll R.G., Riley J.L., Pastan I., June C.H. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 9, pp. 3360-3365.
16. Cassier P.A., Dufresne A., Blay J.Y., Fayette J. Trabectedin and its potential in the treatment of soft tissue sarcoma. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2008, Vol. 4, no. 1, pp. 109-116.
17. Casucci M., Nicolis di Robilant B., Falcone L., Camisa B., Norelli M., Genovese P., Gentner B., Gullotta F., Ponzoni M., Bernardi M., Marcatti M., Saudemont A., Bordignon C., Savoldo B., Ciceri F., Naldini L., Dotti G., Bonini C., Bondanza A. CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Blood*, 2013, Vol. 122, no. 20, pp. 3461-3472.

18. Cerwenka A., Lanier L.L. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat. Rev. Immunol.*, 2001, Vol. 1, no. 1, pp. 41-49.
19. Chang G.C., Lan H.C., Juang S.H., Wu Y.C., Lee H.C., Hung Y.M., Yang H.Y., Whang-Peng J., Liu K.J. A pilot clinical trial of vaccination with dendritic cells pulsed with autologous tumor cells derived from malignant pleural effusion in patients with late-stage lung carcinoma. *Cancer*, 2005, Vol. 103, no. 4, pp. 763-771.
20. Chen K.H., Wada M., Pinz K.G., Liu H., Lin K.W., Jares A., Firor A.E., Shuai X., Salman H., Golightly M., Lan F., Senzel L., Leung E.L., Jiang X., Ma Y. Preclinical targeting of aggressive T-cell malignancies using anti-CD5 chimeric antigen receptor. *Leukemia*, 2017, Vol. 31, no. 10, pp. 2151-2160.
21. Chen X., Du Y., Hu Q., Huang Z. Tumor-derived CD4⁺CD25⁺regulatory T cells inhibit dendritic cells function by CTLA-4. *Pathology, Research and Practice*, 2017, Vol. 213, no. 3, pp. 245-249.
22. Chiba S., Baghdadi M., Akiba H., Yoshiyama H., Kinoshita I., Dosaka-Akita H., Fujioka Y., Ohba Y., Gorman J.V., Colgan J.D., Hirashima M., Uede T., Takaoka A., Yagita H., Jinushi M. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 9, pp. 832-842.
23. Childs R.W., Carlsten M. Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2015, Vol. 14, no. 7, pp. 487-498.
24. Chmielewski M., Kopecky C., Hombach A.A., Abken H. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res.*, 2011, Vol. 71, no. 17, pp. 5697-5706.
25. Cho D.Y., Yang W.K., Lee H.C., Hsu D.M., Lin H.L., Lin S.Z., Chen C.C., Harn H.J., Liu C.L., Lee W.Y., Ho L.H. Adjuvant immunotherapy with whole-cell lysate dendritic cells vaccine for glioblastoma multiforme: a phase II clinical trial. *World Neurosurg.*, 2012, Vol. 77, no. 5-6, pp. 736-744.
26. Chu J., Deng Y., Benson D.M., He S., Hughes T., Zhang J., Peng Y., Mao H., Yi L., Ghoshal K., He X., Devine S.M., Zhang X., Caligiuri M.A., Hofmeister C.C., Yu J. CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance *in vitro* and *in vivo* antitumor activity against human multiple myeloma. *Leukemia*, 2014, Vol. 28, no. 4, pp. 917-927.
27. Clark C.E., Hingorani S.R., Mick R., Combs C., Tuveson D.A., Vonderheide R.H. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res.*, 2007, Vol. 67, no. 19, pp. 9518-9527.
28. Clay T.M., Custer M.C., Sachs J., Hwu P., Rosenberg S.A., Nishimura M.I. Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 163, no. 1, pp. 507-513.
29. Costello R.T., Sivori S., Marcenaro E., Lafage-Pochitaloff M., Mozziconacci M.J., Reviron D., Gastaut J.A., Pende D., Olive D., Moretta A. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2002, Vol. 99, no. 10, pp. 3661-3667.
30. Cubillos-Ruiz J.R., Baird J.R., Tesone A.J., Rutkowski M.R., Scarlett U.K., CamPOSECO-JACOBS A.L., Anadon-Arnillas J., Harwood N.M., Korc M., Fiering S.N., Sempere L.F., Conejo-Garcia J.R. Reprogramming tumor-associated dendritic cells *in vivo* using miRNA mimetics triggers protective immunity against ovarian cancer. *Cancer Res.*, 2012, Vol. 72, no. 7, pp. 1683-1693.
31. Cubillos-Ruiz J.R., Silberman P.C., Rutkowski M.R., Chopra S., Perales-Puchalt A., Song M., Zhang S., Bettigole S.E., Gupta D., Holcomb K., Ellenson L.H., Caputo T., Lee A.H., Conejo-Garcia J.R., Glimcher L.H. ER stress sensor XBP1 controls anti-tumor immunity by disrupting dendritic cell homeostasis. *Cell*, 2015, Vol. 161, no. 7, pp. 1527-1538.
32. D'Incalci M., Badri N., Galmarini C.M., Allavena P. Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment. *Br. J. Cancer*, 2014, Vol. 111, no. 4, pp. 646-650.
33. Dai H., Zhang W., Li X., Han Q., Guo Y., Zhang Y., Wang Y., Wang C., Shi F., Zhang Y., Chen M., Feng K., Wang Q., Zhu H., Fu X., Li S., Han W. Tolerance and efficacy of autologous or donor-derived T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors in adult B-ALL with extramedullary leukemia. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 4, no. 11, e1027469. doi: 10.1080/2162402X.2015.1027469.
34. Davila M.L., Riviere I., Wang X., Bartido S., Park J., Curran K., Chung S.S., Stefanski J., Borquez-Ojeda O., Olszewska M., Qu J., Wasielewska T., He Q., Fink M., Shinglot H., Youssif M., Satter M., Wang Y., Hosey J., Quintanilla H., Halton E., Bernal Y., Bouhassira D.C., Arcila M.E., Gonen M., Roboz G.J., Maslak P., Douer D., Frattini M.G., Giralto S., Sadelain M., Brentjens R. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.*, 2014, Vol. 6, no. 224, pp. 224ra225.
35. de Magalhães-Silverman M., Donnerberg A., Lembersky B., Elder E., Lister J., Rybka W., Whiteside T., Ball E. Posttransplant adoptive immunotherapy with activated natural killer cells in patients with metastatic breast cancer. *J. Immunother.*, 2000, Vol. 23, no. 1, pp. 154-160.
36. Dembic Z., Haas W., Weiss S., McCubrey J., Kiefer H., von Boehmer H., Steinmetz M. Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature*, 1986, Vol. 320, no. 6059, pp. 232-238.
37. Drent E., Groen R.W., Noort W.A., Themeli M., Lammerts van Bueren J.J., Parren P.W., Kuball J., Sebestyen Z., Yuan H., de Bruijn J., van de Donk N.W., Martens A.C., Lokhorst H.M., Mutis T. Pre-clinical evaluation of CD38 chimeric antigen receptor engineered T cells for the treatment of multiple myeloma. *Haematologica*, 2016, Vol. 101, no. 5, pp. 616-625.

38. Duong C.P., Westwood J.A., Berry L.J., Darcy P.K., Kershaw M.H. Enhancing the specificity of T-cell cultures for adoptive immunotherapy of cancer. *Immunotherapy*, 2011, Vol. 3, no. 1, pp. 33-48.
39. Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, Vol. 90, no. 2, pp. 720-724.
40. Esser R., Muller T., Stefes D., Kloess S., Seidel D., Gillies S.D., Aperlo-Iffland C., Huston J.S., Uherek C., Schonfeld K., Tonn T., Huebener N., Lode H.N., Koehl U., Wels W.S. NK cells engineered to express a GD2-specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2012, Vol. 16, no. 3, pp. 569-581.
41. Fairweather D., Cihakova D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J. Autoimmun.*, 2009, Vol. 33, no. 3-4, pp. 222-230.
42. Farag S.S., Caligiuri M.A. Cytokine modulation of the innate immune system in the treatment of leukemia and lymphoma. *Adv. Pharmacol.*, 2004, Vol. 51, pp. 295-318.
43. Fedorov V.D., Themeli M., Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci. Transl. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 215, pp. 215ra172.
44. Gargett T., Brown M.P. The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front. Pharmacol.*, 2014, Vol. 5, p. 235.
45. Gargett T., Yu W., Dotti G., Yvon E.S., Christo S.N., Hayball J.D., Lewis I.D., Brenner M.K., Brown M.P. GD2-specific CAR T Cells undergo potent activation and deletion following antigen encounter but can be protected from activation-induced cell death by PD-1 blockade. *Mol. Ther.*, 2016, Vol. 24, no. 6, pp. 1135-1149.
46. Geissmann F., Jung S., Littman D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 2003, Vol. 19, no. 1, pp. 71-82.
47. Geller M.A., Miller J.S. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 2011, Vol. 3, no. 12, pp. 1445-1459.
48. Gill S., Tasian S.K., Ruella M., Shestova O., Li Y., Porter D.L., Carroll M., Danet-Desnoyers G., Scholler J., Grupp S.A., June C.H., Kalos M. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood*, 2014, Vol. 123, no. 15, pp. 2343-2354.
49. Gocheva V., Wang H.W., Gadea B.B., Shree T., Hunter K.E., Garfall A.L., Berman T., Joyce J.A. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes and Development*, 2010, Vol. 24, no. 3, pp. 241-255.
50. Grada Z., Hegde M., Byrd T., Shaffer D.R., Ghazi A., Brawley V.S., Corder A., Schonfeld K., Koch J., Dotti G., Heslop H.E., Gottschalk S., Wels W.S., Baker M.L., Ahmed N. TanCAR: a novel bispecific chimeric antigen receptor for cancer immunotherapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2013, Vol. 2, e105. doi: 10.1038/mtna.2013.32.
51. Grage-Griebenow E., Flad H.D., Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J. Leukoc. Biol.*, 2001, Vol. 69, no. 1, pp. 11-20.
52. Griffiths L., Binley K., Iqbal S., Kan O., Maxwell P., Ratcliffe P., Lewis C., Harris A., Kingsman S., Naylor S. The macrophage – a novel system to deliver gene therapy to pathological hypoxia. *Gene Ther.*, 2000, Vol. 7, no. 3, pp. 255-262.
53. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 2010, Vol. 140, no. 6, pp. 883-899.
54. Gross S., Erdmann M., Haendle I., Volland S., Berger T., Schultz E., Strasser E., Dankerl P., Janka R., Schliep S., Heinzerling L., Sotlar K., Coulie P., Schuler G., Schuler-Thurner B. Twelve-year survival and immune correlates in dendritic cell-vaccinated melanoma patients. *JCI Insight*, 2017, Vol. 2, no. 8, pii: 91438. doi: 10.1172/jci.insight.91438.
55. Guedan S., Chen X., Madar A., Carpenito C., McGettigan S.E., Frigault M.J., Lee J., Posey A.D., Jr., Scholler J., Scholler N., Bonneau R., June C.H. ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 7, pp. 1070-1080.
56. Hammink R., Mandal S., Eggermont L.J., Nootboom M., Willems P.H., Tel J., Rowan A.E., Figdor C.G., Blank K.G. Controlling T-cell activation with synthetic dendritic cells using the multivalency effect. *ACS Omega*, 2017, Vol. 2, no. 3, pp. 937-945.
57. Hao N.B., Lu M.H., Fan Y.H., Cao Y.L., Zhang Z.R., Yang S.M. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, Vol. 2012, 948098. doi: 10.1155/2012/948098.
58. Harnack U., Johnen H., Pecher G. Natural killer cell line YT exerts cytotoxicity against CD86⁺ myeloma cells. *Anticancer Res.*, 2011, Vol. 31, no. 2, pp. 475-479.
59. Harrington L.E., Hatton R.D., Mangan P.R., Turner H., Murphy T.L., Murphy K.M., Weaver C.T. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.*, 2005, Vol. 6, no. 11, pp. 1123-1132.
60. Haso W., Lee D.W., Shah N.N., Stetler-Stevenson M., Yuan C.M., Pastan I.H., Dimitrov D.S., Morgan R.A., FitzGerald D.J., Barrett D.M., Wayne A.S., Mackall C.L., Orentas R.J. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 7, pp. 1165-1174.
61. Hayakawa M., Hatano T., Ogawa Y., Gakiya M., Ogura H., Osawa A. Treatment of advanced renal cell carcinoma using regional arterial administration of lymphokine-activated killer cells in combination with low doses of rIL-2. *Urol Int.*, 1994, Vol. 53, no. 3, pp. 117-124.

62. Hegde M., Mukherjee M., Grada Z., Pignata A., Landi D., Navai S.A., Wakefield A., Fousek K., Bielamowicz K., Chow K.K., Brawley V.S., Byrd T.T., Krebs S., Gottschalk S., Wels W.S., Baker M.L., Dotti G., Mamonkin M., Brenner M.K., Orange J.S., Ahmed N. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13Ralpha2 mitigate tumor antigen escape. *J. Clin. Invest.*, 2016, Vol. 126, no. 8, pp. 3036-3052.
63. Hirschowitz E.A., Foody T., Kryscio R., Dickson L., Sturgill J., Yannelli J. Autologous dendritic cell vaccines for non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2004, Vol. 22, no. 14, pp. 2808-2815.
64. Holtl L., Rieser C., Papesh C., Ramoner R., Herold M., Klocker H., Radmayr C., Stenzl A., Bartsch G., Thurnher M. Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells. *J. Urol.*, 1999, Vol. 161, no. 3, pp. 777-782.
65. Hombach A., Hombach A.A., Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther.*, 2010, Vol. 17, no. 10, pp. 1206-1213.
66. Hombach A.A., Heiders J., Foppe M., Chmielewski M., Abken H. OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4(+) T cells. *Oncoimmunology*, 2012, Vol. 1, no. 4, pp. 458-466.
67. Hombach A.A., Abken H. Of chimeric antigen receptors and antibodies: OX40 and 41BB costimulation sharpen up T cell-based immunotherapy of cancer. *Immunotherapy*, 2013, Vol. 5, no. 7, pp. 677-681.
68. Hombach A.A., Gorgens A., Chmielewski M., Murke F., Kimpel J., Giebel B., Abken H. Superior therapeutic index in lymphoma therapy: CD30(+) CD34(+) hematopoietic stem cells resist a chimeric antigen receptor T-cell attack. *Mol. Ther.*, 2016, Vol. 24, no. 8, pp. 1423-1434.
69. Houot R., Kohrt H.E., Marabelle A., Levy R. Targeting immune effector cells to promote antibody-induced cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Trends Immunol.*, 2011, Vol. 32, no. 11, pp. 510-516.
70. Hsu F.J., Benike C., Fagnoni F., Liles T.M., Czerwinski D., Taidi B., Engleman E.G., Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.*, 1996, Vol. 2, no. 1, pp. 52-58.
71. Iliopoulou E.G., Kountourakis P., Karamouzis M.V., Doufexis D., Ardavanis A., Baxevas C.N., Rigatos G., Papamichail M., Perez S.A. A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2010, Vol. 59, no. 12, pp. 1781-1789.
72. Imai C., Mihara K., Andreansky M., Nicholson I.C., Pui C.H., Geiger T.L., Campana D. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2004, Vol. 18, no. 4, pp. 676-684.
73. Jensen M.C., Popplewell L., Cooper L.J., DiGiusto D., Kalos M., Ostberg J.R., Forman S.J. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2010, Vol. 16, no. 9, pp. 1245-1256.
74. Jiang H., Zhang W., Shang P., Zhang H., Fu W., Ye F., Zeng T., Huang H., Zhang X., Sun W., Man-Yuen Sze D., Yi Q., Hou J. Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells. *Mol. Oncol.*, 2014, Vol. 8, no. 2, pp. 297-310.
75. Jiang W., Zhang J., Tian Z. Functional characterization of interleukin-15 gene transduction into the human natural killer cell line NKL. *Cytotherapy*, 2008, Vol. 10, no. 3, pp. 265-274.
76. Jing X.N., Qiu B., Wang J.F., Wu Y.G., Wu J.B., Chen D.D. *In vitro* anti-tumor effect of human dendritic cells vaccine induced by astragalus polysaccharin: an experimental study. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2014, Vol. 34, no. 9, pp. 1103-1107.
77. Jochems C., Hodge J.W., Fantini M., Fujii R., Morillon Y.M., 2nd, Greiner J.W., Padget M.R., Tritsch S.R., Tsang K.Y., Campbell K.S., Klingemann H., Boissel L., Rabizadeh S., Soon-Shiong P., Schlom J. An NK cell line (haNK) expressing high levels of granzyme and engineered to express the high affinity CD16 allele. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 52, pp. 86359-86373.
78. Johnson L.A., Scholler J., Ohkuri T., Kosaka A., Patel P.R., McGettigan S.E., Nace A.K., Dentchev T., Thekkat P., Loew A., Boesteanu A.C., Cogdill A.P., Chen T., Fraietta J.A., Kloss C.C., Posey A.D., Jr., Engels B., Singh R., Ezell T., Idamakanti N., Ramones M.H., Li N., Zhou L., Plesa G., Seykora J.T., Okada H., June C.H., Brogdon J.L., Maus M.V. Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma. *Sci. Transl. Med.*, 2015, Vol. 7, no. 275, pp. 275ra222.
79. Kagi D., Ledermann B., Burki K., Seiler P., Odermatt B., Olsen K.J., Podack E.R., Zinkernagel R.M., Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, 1994, Vol. 369, no. 6475, pp. 31-37.
80. Kahlon K.S., Brown C., Cooper L.J., Raubitschek A., Forman S.J., Jensen M.C. Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells. *Cancer Res.*, 2004, Vol. 64, no. 24, pp. 9160-9166.
81. Kaplan J.M., Yu Q., Piraino S.T., Pennington S.E., Shankara S., Woodworth L.A., Roberts B.L. Induction of antitumor immunity with dendritic cells transduced with adenovirus vector-encoding endogenous tumor-associated antigens. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 163, no. 2, pp. 699-707.

82. Katz S.C., Burga R.A., McCormack E., Wang L.J., Mooring W., Point G.R., Khare P.D., Thorn M., Ma Q., Stainken B.F., Assanah E.O., Davies R., Espat N.J., Junghans R.P. Phase I Hepatic immunotherapy for metastases study of intra-arterial chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy for CEA⁺ liver metastases. *Clin. Cancer Res.*, 2015, Vol. 21, no. 14, pp. 3149-3159.
83. Kenderian S.S., Ruella M., Shestova O., Klichinsky M., Aikawa V., Morrisette J.J., Scholler J., Song D., Porter D.L., Carroll M., June C.H., Gill S. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2015, Vol. 29, no. 8, pp. 1637-1647.
84. Kennedy R., Celis E. Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol. Rev.*, 2008, Vol. 222, pp. 129-144.
85. Kershaw M.H., Westwood J.A., Parker L.L., Wang G., Eshhar Z., Mavroukakis S.A., White D.E., Wunderlich J.R., Canevari S., Rogers-Freezer L., Chen C.C., Yang J.C., Rosenberg S.A., Hwu P. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2006, Vol. 12, no. 20, Pt 1, pp. 6106-6115.
86. Khan J.A., Yaqin S. Successful immunological treatment of gallbladder cancer in India--case report. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 2006, Vol. 7, no. 9, pp. 719-724.
87. Klingemann H., Boissel L., Toneguzzo F. Natural killer cells for immunotherapy – advantages of the NK-92 cell line over blood NK cells. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 91.
88. Kloss C.C., Condomines M., Cartellieri M., Bachmann M., Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat. Biotechnol.*, 2013, Vol. 31, no. 1, pp. 71-75.
89. Kobayashi E., Kishi H., Ozawa T., Hamana H., Nakagawa H., Jin A., Lin Z., Muraguchi A. A chimeric antigen receptor for TRAIL-receptor 1 induces apoptosis in various types of tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, Vol. 453, no. 4, pp. 798-803.
90. Kobayashi H., Dubois S., Sato N., Sabzevari H., Sakai Y., Waldmann T.A., Tagaya Y. Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 2, pp. 721-727.
91. Kobayashi M., Chiba A., Izawa H., Yanagida E., Okamoto M., Shimodaira S., Yonemitsu Y., Shibamoto Y., Suzuki N., Nagaya M., DC-vaccine study group at the Japan Society of Innovative Cell Therapy (J-SICT). The feasibility and clinical effects of dendritic cell-based immunotherapy targeting synthesized peptides for recurrent ovarian cancer. *J. Ovarian Res.*, 2014, Vol. 7, p. 48.
92. Kogler G., Enczmann J., Rocha V., Gluckman E., Wernet P. High-resolution HLA typing by sequencing for HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ in 122 unrelated cord blood/patient pair transplants hardly improves long-term clinical outcome. *Bone Marrow Transplant*, 2005, Vol. 36, no. 12, pp. 1033-1041.
93. Koido S., Homma S., Okamoto M., Takakura K., Mori M., Yoshizaki S., Tsukinaga S., Odahara S., Koyama S., Imazu H., Uchiyama K., Kajihara M., Arakawa H., Misawa T., Toyama Y., Yanagisawa S., Ikegami M., Kan S., Hayashi K., Komita H., Kamata Y., Ito M., Ishidao T., Yusa S., Shimodaira S., Gong J., Sugiyama H., Ohkusa T., Tajiri H. Treatment with chemotherapy and dendritic cells pulsed with multiple Wilms' tumor 1 (WT1)-specific MHC class I/II-restricted epitopes for pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2014, Vol. 20, no. 16, pp. 4228-4239.
94. Koneru M., O'Ceirbhail R., Pendharkar S., Spriggs D.R., Brentjens R.J. A phase I clinical trial of adoptive T cell therapy using IL-12 secreting MUC-16(ecto) directed chimeric antigen receptors for recurrent ovarian cancer. *J. Transl. Med.*, 2015, Vol. 13, p. 102.
95. Kryczek I., Banerjee M., Cheng P., Vatan L., Szeliga W., Wei S., Huang E., Finlayson E., Simeone D., Welling T.H., Chang A., Coukos G., Liu R., Zou W. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 6, pp. 1141-1149.
96. Lamers C.H., Sleijfer S., Vulto A.G., Kruit W.H., Kliffen M., Debets R., Gratama J.W., Stoter G., Oosterwijk E. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J. Clin. Oncol.*, 2006, Vol. 24, no. 13, e20-2.
97. Lamers C.H., Sleijfer S., van Steenbergen S., van Elzakker P., van Krimpen B., Groot C., Vulto A., den Bakker M., Oosterwijk E., Debets R., Gratama J.W. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol. Ther.*, 2013, Vol. 21, no. 4, pp. 904-912.
98. Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W.M., Mattson J., Basham B., Sedgwick J.D., McClanahan T., Kastelein R.A., Cua D.J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 201, no. 2, pp. 233-240.
99. Lee H.W., Choi H.J., Ha S.J., Lee K.T., Kwon Y.G. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, Vol. 1835, no. 2, pp. 170-179.
100. Li J., Aipire A., Li J., Zhu H., Wang Y., Guo W., Li X., Yang J., Liu C. lambda-Carrageenan improves the antitumor effect of dendritic cell-based vaccine. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 18, pp. 29996-30007.
101. Li M., Wang B., Wu Z., Zhang J., Shi X., Cheng W., Han S. A novel recombinant protein of ephrinA1-PE38/GM-CSF activate dendritic cells vaccine in rats with glioma. *Tumour Biol.*, 2015, Vol. 36, no. 7, pp. 5497-5503.
102. Lim O., Jung M.Y., Hwang Y.K., Shin E.C. Present and future of allogeneic natural killer cell therapy. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, p. 286.

103. Lim T.S., Chew V., Sieow J.L., Goh S., Yeong J.P., Soon A.L., Ricciardi-Castagnoli P. PD-1 expression on dendritic cells suppresses CD8⁺ T cell function and antitumor immunity. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 3, e1085146.
104. Ljunggren H.G., Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today*, 1990, Vol. 11, no. 7, pp. 237-244.
105. Ljunggren H.G., Malmberg K.J. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 5, pp. 329-339.
106. Lo A.S., Ma Q., Liu D.L., Junghans R.P. Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/T-cell receptor zeta designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2010, Vol. 16, no. 10, pp. 2769-2780.
107. Long A.H., Haso W.M., Shern J.F., Wanhainen K.M., Murgai M., Ingaramo M., Smith J.P., Walker A.J., Kohler M.E., Venkateshwara V.R., Kaplan R.N., Patterson G.H., Fry T.J., Orentas R.J., Mackall C.L. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat. Med.*, 2015, Vol. 21, no. 6, pp. 581-590.
108. Loo J.C., McGilveray I.J., Jordan N., Moffat J., Brien R. Dose-dependent pharmacokinetics of prednisone and prednisolone in man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1978, Vol. 30, no. 11, p. 736.
109. Lopez-Guerrero J.A., Romero I., Poveda A. Trabectedin therapy as an emerging treatment strategy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer. *Chin. J. Cancer*, 2015, Vol. 34, no. 1, pp. 41-49.
110. Louis C.U., Savoldo B., Dotti G., Pule M., Yvon E., Myers G.D., Rossig C., Russell H.V., Diouf O., Liu E., Liu H., Wu M.F., Gee A.P., Mei Z., Rooney C.M., Heslop H.E., Brenner M.K. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 23, pp. 6050-6056.
111. Maier T., Tun-Kyi A., Tassis A., Jungius K.P., Burg G., Dummer R., Nestle F.O. Vaccination of patients with cutaneous T-cell lymphoma using intranodal injection of autologous tumor-lysate-pulsed dendritic cells. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 7, pp. 2338-2344.
112. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, 2002, Vol. 23, no. 11, pp. 549-555.
113. Marcus A., Waks T., Eshhar Z. Redirected tumor-specific allogeneic T cells for universal treatment of cancer. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 4, pp. 975-983.
114. Marks M.H., Rosen P.S. Adult orthodontics: periodontic and cosmetic enhancements. *Compendium (Yardley, PA)*, 1991, Vol. 12, no. 8, pp. 584, 586, 588 *passim*.
115. Martin-Orozco N., Muranski P., Chung Y., Yang X.O., Yamazaki T., Lu S., Hwu P., Restifo N.P., Overwijk W.W., Dong C. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*, 2009, Vol. 31, no. 5, pp. 787-798.
116. Martinez F.O., Helming L., Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 27, pp. 451-483.
117. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Bunin N.J., Chew A., Gonzalez V.E., Zheng Z., Lacey S.F., Mahnke Y.D., Melenhorst J.J., Rheingold S.R., Shen A., Teachey D.T., Levine B.L., June C.H., Porter D.L., Grupp S.A. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2014, Vol. 371, no. 16, pp. 1507-1517.
118. McHugh R.S., Shevach E.M. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2002, Vol. 110, no. 5, pp. 693-702.
119. Michie C.A., McLean A., Alcock C., Beverley P.C. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*, 1992, Vol. 360, no. 6401, pp. 264-265.
120. Miller J.S. The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. *Exp. Hematol.*, 2001, Vol. 29, no. 10, pp. 1157-1168.
121. Miller J.S., Soignier Y., Panoskaltsis-Mortari A., McNearney S.A., Yun G.H., Fautsch S.K., McKenna D., Le C., Defor T.E., Burns L.J., Orchard P.J., Blazar B.R., Wagner J.E., Slungaard A., Weisdorf D.J., Okazaki I.J., McGlave P.B. Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 8, pp. 3051-3057.
122. Milone M.C., Fish J.D., Carpenito C., Carroll R.G., Binder G.K., Teachey D., Samanta M., Lakhil M., Gloss B., Danet-Desnoyers G., Campana D., Riley J.L., Grupp S.A., June C.H. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. *Mol. Ther.*, 2009, Vol. 17, no. 8, pp. 1453-1464.
123. Moretta A., Vitale M., Bottino C., Orengo A.M., Morelli L., Augugliaro R., Barbaresi M., Ciccone E., Moretta L. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J. Exp. Med.*, 1993, Vol. 178, no. 2, pp. 597-604.
124. Morse M.A., Niedzwiecki D., Marshall J.L., Garrett C., Chang D.Z., Aklilu M., Crocenzi T.S., Cole D.J., Dessureault S., Hobeika A.C., Osada T., Onaitis M., Clary B.M., Hsu D., Devi G.R., Bulusu A., Annecharico R.P., Chadaram V., Clay T.M., Lyerly H.K. A randomized phase II study of immunization with dendritic cells modified

with poxvectors encoding CEA and MUC1 compared with the same poxvectors plus GM-CSF for resected metastatic colorectal cancer. *Ann. Surg.*, 2013, Vol. 258, no. 6, pp. 879-886.

125. Muranski P., Boni A., Antony P.A., Cassard L., Irvine K.R., Kaiser A., Paulos C.M., Palmer D.C., Touloukian C.E., Ptak K., Gattinoni L., Wrzesinski C., Hinrichs C.S., Kerstann K.W., Feigenbaum L., Chan C.C., Restifo N.P. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 2, pp. 362-373.

126. Murphy G., Tjoa B., Ragde H., Kenny G., Boynton A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate*, 1996, Vol. 29, no. 6, pp. 371-380.

127. Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 11, pp. 723-737.

128. Nestle F.O., Aljagac S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G., Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.*, 1998, Vol. 4, no. 3, pp. 328-332.

129. Oelsner S., Friede M.E., Zhang C., Wagner J., Badura S., Bader P., Ullrich E., Ottmann O.G., Klingemann H., Tonn T., Wels W.S. Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma. *Cytotherapy*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 235-249.

130. Palmer D.H., Midgley R.S., Mirza N., Torr E.E., Ahmed F., Steele J.C., Steven N.M., Kerr D.J., Young L.S., Adams D.H. A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009, Vol. 49, no. 1, pp. 124-132.

131. Pegram H.J., Lee J.C., Hayman E.G., Imperato G.H., Tedder T.F., Sadelain M., Brentjens R.J. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 18, pp. 4133-4141.

132. Pienta K.J., Machiels J.P., Schrijvers D., Alekseev B., Shkolnik M., Crabb S.J., Li S., Seetharam S., Puchalski T.A., Takimoto C., Elsayed Y., Dawkins F., de Bono J.S. Phase 2 study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 (CCL2), in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Invest. New Drugs*, 2013, Vol. 31, no. 3, pp. 760-768.

133. Pluta K., Luce M.J., Bao L., Agha-Mohammadi S., Reiser J. Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. *J. Gene Med.*, 2005, Vol. 7, no. 6, pp. 803-817.

134. Pollard J.W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 2004, Vol. 4, no. 1, pp. 71-78.

135. Posey A.D., Jr., Schwab R.D., Boesteanu A.C., Steentoft C., Mandel U., Engels B., Stone J.D., Madsen T.D., Schreiber K., Haines K.M., Cogdill A.P., Chen T.J., Song D., Scholler J., Kranz D.M., Feldman M.D., Young R., Keith B., Schreiber H., Clausen H., Johnson L.A., June C.H. Engineered CAR T cells targeting the cancer-associated Tn-glycoform of the membrane Mucin MUC1 control adenocarcinoma. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 6, pp. 1444-1454.

136. Pule M., Finney H., Lawson A. Artificial T-cell receptors. *Cytotherapy*, 2003, Vol. 5, no. 3, pp. 211-226.

137. Pule M.A., Straathof K.C., Dotti G., Heslop H.E., Rooney C.M., Brenner M.K. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol. Ther.*, 2005, Vol. 12, no. 5, pp. 933-941.

138. Pule M.A., Savoldo B., Myers G.D., Rossig C., Russell H.V., Dotti G., Huls M.H., Liu E., Gee A.P., Mei Z., Yvon E., Weiss H.L., Liu H., Rooney C.M., Heslop H.E., Brenner M.K. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat. Med.*, 2008, Vol. 14, no. 11, pp. 1264-1270.

139. Qian B.Z., Li J., Zhang H., Kitamura T., Zhang J., Campion L.R., Kaiser E.A., Snyder L.A., Pollard J.W. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, 2011, Vol. 475, no. 7355, pp. 222-225.

140. Qu H.Q., Zhou X.S., Zhou X.L., Wang J. Effect of DC-CIK cell on the proliferation, apoptosis and differentiation of leukemia cells. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2014, Vol. 7, no. 8, pp. 659-662.

141. Ren J., Zhang X., Liu X., Fang C., Jiang S., June C.H., Zhao Y. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 10, pp. 17002-17011.

142. Romanski A., Uherek C., Bug G., Seifried E., Klingemann H., Wels W.S., Ottmann O.G., Tonn T. CD19-CAR engineered NK-92 cells are sufficient to overcome NK cell resistance in B-cell malignancies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2016, Vol. 20, no. 7, pp. 1287-1294.

143. Rosenblatt J., Wu Z., Vasir B., Zarwan C., Stone R., Mills H., Friedman T., Konstantinopoulos P.A., Spentzos D., Ghebremichael M., Stevenson K., Neuberg D., Levine J.D., Joyce R., Tzachanis D., Boussiotis V., Kufe D., Avigan D. Generation of tumor-specific T lymphocytes using dendritic cell/tumor fusions and anti-CD3/CD28. *J. Immunother.*, 2010, Vol. 33, no. 2, pp. 155-166.

144. Rosenblatt J., Vasir B., Uhl L., Blotta S., Macnamara C., Somaiya P., Wu Z., Joyce R., Levine J.D., Dombagoda D., Yuan Y.E., Francoeur K., Fitzgerald D., Richardson P., Weller E., Anderson K., Kufe D., Munshi N., Avigan D. Vaccination with dendritic cell/tumor fusion cells results in cellular and humoral antitumor immune responses in patients with multiple myeloma. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 2, pp. 393-402.

145. Rossig C., Bollard C.M., Nuchtern J.G., Merchant D.A., Brenner M.K. Targeting of G(D2)-positive tumor cells by human T lymphocytes engineered to express chimeric T-cell receptor genes. *Int. J. Cancer*, 2001, Vol. 94, no. 2, pp. 228-236.
146. Roybal K.T., Rupp L.J., Morsut L., Walker W.J., McNally K.A., Park J.S., Lim W.A. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits. *Cell*, 2016, Vol. 164, no. 4, pp. 770-779.
147. Ruggeri L., Capanni M., Urbani E., Perruccio K., Shlomchik W.D., Tosti A., Posati S., Rogaia D., Frassoni F., Aversa F., Martelli M.F., Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 2002, Vol. 295, no. 5562, pp. 2097-2100.
148. Ruggeri L., Mancusi A., Perruccio K., Burchielli E., Martelli M.F., Velardi A. Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy. *J. Immunother.*, 2005, Vol. 28, no. 3, pp. 175-182.
149. Sadelain M., Brentjens R., Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.*, 2013, Vol. 3, no. 4, pp. 388-398.
150. Sahm C., Schonfeld K., Wels W.S. Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 9, pp. 1451-1461.
151. Sakemura R., Terakura S., Watanabe K., Julamanee J., Takagi E., Miyao K., Koyama D., Goto T., Hanajiri R., Nishida T., Murata M., Kiyoi H. A Tet-On inducible system for controlling CD19-chimeric antigen receptor expression upon drug administration. *Cancer Immunol. Res.*, 2016, Vol. 4, no. 8, pp. 658-668.
152. Samara P., Skopeliti M., Tsiatas M.L., Georgaki S., Gouloumis C., Voelter W., Dimopoulos A.M., Bamias A., Tsitsilonis O.E. A cytokine cocktail augments the efficacy of adoptive NK-92 cell therapy against mouse xenografts of human cancer. *Anticancer Res.*, 2016, Vol. 36, no. 7, pp. 3373-3382.
153. Schirrmann T., Pecher G. Specific targeting of CD33(+) leukemia cells by a natural killer cell line modified with a chimeric receptor. *Leuk. Res.*, 2005, Vol. 29, no. 3, pp. 301-306.
154. Sheikh N.A., Petrylak D., Kantoff P.W., Dela Rosa C., Stewart F.P., Kuan L.Y., Whitmore J.B., Trager J.B., Poehlein C.H., Frohlich M.W., Urdal D.L. Sipuleucel-T immune parameters correlate with survival: an analysis of the randomized phase 3 clinical trials in men with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013, Vol. 62, no. 1, pp. 137-147.
155. Smyth M.J., Cretney E., Kershaw M.H., Hayakawa Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol. Rev.*, 2004, Vol. 202, pp. 275-293.
156. Sola C., Andre P., Lemmers C., Fuseri N., Bonnafous C., Blery M., Wagtmann N.R., Romagne F., Vivier E., Ugolini S. Genetic and antibody-mediated reprogramming of natural killer cell missing-self recognition *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 31, pp. 12879-12884.
157. Song D.G., Ye Q., Carpenito C., Poussin M., Wang L.P., Ji C., Figini M., June C.H., Coukos G., Powell D.J. Jr. *In vivo* persistence, tumor localization, and antitumor activity of CAR-engineered T cells is enhanced by costimulatory signaling through CD137 (4-1BB). *Cancer Res.*, 2011, Vol. 71, no. 13, pp. 4617-4627.
158. Song D.G., Ye Q., Poussin M., Harms G.M., Figini M., Powell D.J., Jr. CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells *in vivo*. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 3, pp. 696-706.
159. Stephan M.T., Ponomarev V., Brentjens R.J., Chang A.H., Dobrenkov K.V., Heller G., Sadelain M. T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 12, pp. 1440-1449.
160. Street S.E., Cretney E., Smyth M.J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 1, pp. 192-197.
161. Sun J.B., Eriksson K., Li B.L., Lindblad M., Azem J., Holmgren J. Vaccination with dendritic cells pulsed *in vitro* with tumor antigen conjugated to cholera toxin efficiently induces specific tumoricidal CD8⁺ cytotoxic lymphocytes dependent on cyclic AMP activation of dendritic cells. *Clin. Immunol.*, 2004, Vol. 112, no. 1, pp. 35-44.
162. Sutlu T., Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J. Intern. Med.*, 2009, Vol. 266, no. 2, pp. 154-181.
163. Svane I.M., Pedersen A.E., Johansen J.S., Johnsen H.E., Nielsen D., Kamby C., Ottesen S., Balslev E., Gaarsdal E., Nikolajsen K., Claesson M.H. Vaccination with p53 peptide-pulsed dendritic cells is associated with disease stabilization in patients with p53 expressing advanced breast cancer; monitoring of serum YKL-40 and IL-6 as response biomarkers. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2007, Vol. 56, no. 9, pp. 1485-1499.
164. Tada F., Abe M., Hirooka M., Ikeda Y., Hiasa Y., Lee Y., Jung N.C., Lee W.B., Lee H.S., Bae Y.S., Onji M. Phase I/II study of immunotherapy using tumor antigen-pulsed dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.*, 2012, Vol. 41, no. 5, pp. 1601-1609.
165. Takayama T., Sekine T., Makuuchi M., Yamasaki S., Kosuge T., Yamamoto J., Shimada K., Sakamoto M., Hirohashi S., Ohashi Y., Kakizoe T. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet*, 2000, Vol. 356, no. 9232, pp. 802-807.
166. Takeda K., Hayakawa Y., Smyth M.J., Kayagaki N., Yamaguchi N., Kakuta S., Iwakura Y., Yagita H., Okumura K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat. Med.*, 2001, Vol. 7, no. 1, pp. 94-100.
167. Tam Y.K., Maki G., Miyagawa B., Hennemann B., Tonn T., Klingemann H.G. Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy. *Hum. Gene Ther.*, 1999, Vol. 10, no. 8, pp. 1359-1373.

168. Tammana S., Huang X., Wong M., Milone M.C., Ma L., Lefvine B.L., June C.H., Wagner J.E., Blazar B.R., Zhou X. 4-1BB and CD28 signaling plays a synergistic role in redirecting umbilical cord blood T cells against B-cell malignancies. *Hum. Gene Ther.*, 2010, Vol. 21, no. 1, pp. 75-86.
169. Tesone A.J., Rutkowski M.R., Brencicova E., Svoronos N., Perales-Puchalt A., Stephen T.L., Allegranza M.J., Payne K.K., Nguyen J.M., Wickramasinghe J., Tchou J., Borowsky M.E., Rabinovich G.A., Kossenkov A.V., Conejo-Garcia J.R. Satb1 overexpression drives tumor-promoting activities in cancer-associated dendritic cells. *Cell Rep.*, 2016, Vol. 14, no. 7, pp. 1774-1786.
170. Till B.G., Jensen M.C., Wang J., Chen E.Y., Wood B.L., Greisman H.A., Qian X., James S.E., Raubitschek A., Forman S.J., Gopal A.K., Pagel J.M., Lindgren C.G., Greenberg P.D., Riddell S.R., Press O.W. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 6, pp. 2261-2271.
171. Timmerman J.M., Czerwinski D.K., Davis T.A., Hsu F.J., Benike C., Hao Z.M., Taidi B., Rajapaksa R., Caspar C.B., Okada C.Y., van Beckhoven A., Liles T.M., Engleman E.G., Levy R. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood*, 2002, Vol. 99, no. 5, pp. 1517-1526.
172. Topfer K., Cartellieri M., Michen S., Wiedemuth R., Muller N., Lindemann D., Bachmann M., Fussel M., Schackert G., Temme A. DAP12-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 7, pp. 3201-3212.
173. Uphoff C.C., Denkmann S.A., Steube K.G., Drexler H.G. Detection of EBV, HBV, HCV, HIV-1, HTLV-I and -II, and SMRV in human and other primate cell lines. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010, Vol. 2010, e904767. doi: 10.1155/2010/904767.
174. Vago L., Perna S.K., Zanussi M., Mazzi B., Barlassina C., Stanghellini M.T., Perrelli N.F., Cosentino C., Torri F., Angius A., Forno B., Casucci M., Bernardi M., Peccatori J., Corti C., Bondanza A., Ferrari M., Rossini S., Roncarolo M.G., Bordignon C., Bonini C., Ciceri F., Fleischhauer K. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 2009, Vol. 361, no. 5, pp. 478-488.
175. Valone F.H., Small E., MacKenzie M., Burch P., Lacy M., Peshwa M.V., Laus R. Dendritic cell-based treatment of cancer: closing in on a cellular therapy. *Cancer J.*, 2001, Vol. 7, Suppl 2, pp. S53-61.
176. Vanbervliet B., Bendriss-Vermare N., Massacrier C., Homey B., de Bouteiller O., Briere F., Trinchieri G., Caux C. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, no. 5, pp. 823-830.
177. Vey N., Bourhis J.H., Boissel N., Bordessoule D., Prebet T., Charbonnier A., Etienne A., Andre P., Romagne F., Benson D., Dombret H., Olive D. A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. *Blood*, 2012, Vol. 120, no. 22, pp. 4317-4323.
178. Vlieger M.D., Megens P., van der Sluys J. Recording pulsations in echo-encephalography. *Medical and Biological Engineering*, 1974, Vol. 12, no. 4, pp. 503-509.
179. Waldhauer I., Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*, 2008, Vol. 27, no. 45, pp. 5932-5943.
180. Walker D.G., Laherty R., Tomlinson F.H., Chuah T., Schmidt C. Results of a phase I dendritic cell vaccine trial for malignant astrocytoma: potential interaction with adjuvant chemotherapy. *J. Clin. Neurosci.*, 2008, Vol. 15, no. 2, pp. 114-121.
181. Wang L., Ma N., Okamoto S., Amaishi Y., Sato E., Seo N., Mineno J., Takesako K., Kato T., Shiku H. Efficient tumor regression by adoptively transferred CEA-specific CAR-T cells associated with symptoms of mild cytokine release syndrome. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 9, e1211218. doi: 10.1080/2162402X.2016.1211218.
182. Wang Q.S., Wang Y., Lv H.Y., Han Q.W., Fan H., Guo B., Wang L.L., Han W.D. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Mol. Ther.*, 2015, Vol. 23, no. 1, pp. 184-191.
183. Wang Y., Xu Z., Zhou F., Sun Y., Chen J., Li L., Jin H., Qian Q. The combination of dendritic cells-cytotoxic T lymphocytes/cytokine-induced killer (DC-CTL/CIK) therapy exerts immune and clinical responses in patients with malignant tumors. *Exp. Hematol. Oncol.*, 2015, Vol. 4, p. 32.
184. Wei S.M., Pan H.L., Wang L., Yin G.L., Zhong K., Zhou Y., Yang S.J., Xin Z.L. Combination therapy with dendritic cell-based vaccine and anti-CD69 antibody enhances antitumor efficacy in renal cell carcinoma-bearing mice. *Turk. J. Med. Sci.*, 2017, Vol. 47, no. 2, pp. 658-667.
185. Wei Y.C., Sticca R.P., Li J., Holmes L.M., Burgin K.E., Jakubchak S., Bouton-Verville H., Williamson J., Meyer K., Evans L., Martin J., Stephenson J.J., Trocha S., Smith S., Wagner T.E. Combined treatment of dendritoma vaccine and low-dose interleukin-2 in stage IV renal cell carcinoma patients induced clinical response: A pilot study. *Oncol. Rep.*, 2007, Vol. 18, no. 3, pp. 665-671.
186. Wilkie S., Picco G., Foster J., Davies D.M., Julien S., Cooper L., Arif S., Mather S.J., Taylor-Papadimitriou J., Burchell J.M., Maher J. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 7, pp. 4901-4909.
187. Wilkie S., van Schalkwyk M.C., Hobbs S., Davies D.M., van der Stegen S.J., Pereira A.C., Burbridge S.E., Box C., Eccles S.A., Maher J. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J. Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 32, no. 5, pp. 1059-1070.
188. Woo E.Y., Chu C.S., Goletz T.J., Schlienger K., Yeh H., Coukos G., Rubin S.C., Kaiser L.R., June C.H. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, no. 12, pp. 4766-4772.

189. Wu C.Y., Roybal K.T., Puchner E.M., Onuffer J., Lim W.A. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science*, 2015, Vol. 350, no. 6258, aab4077. doi: 10.1126/science.aab4077.

190. Yamanaka R., Homma J., Yajima N., Tsuchiya N., Sano M., Kobayashi T., Yoshida S., Abe T., Narita M., Takahashi M., Tanaka R. Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial. *Clin. Cancer Res.*, 2005, Vol. 11, no. 11, pp. 4160-4167.

191. Yee C., Thompson J.A., Byrd D., Riddell S.R., Roche P., Celis E., Greenberg P.D. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: *in vivo* persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, Vol. 99, no. 25, pp. 16168-16173.

192. Yu J.S., Wheeler C.J., Zeltzer P.M., Ying H., Finger D.N., Lee P.K., Yong W.H., Incardona F., Thompson R.C., Riedinger M.S., Zhang W., Prins R.M., Black K.L. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, no. 3, pp. 842-847.

193. Yuan A., Hsiao Y.J., Chen H.Y., Chen H.W., Ho C.C., Chen Y.Y., Liu Y.C., Hong T.H., Yu S.L., Chen J.J., Yang P.C. Opposite effects of M1 and M2 macrophage subtypes on lung cancer progression. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 14273. doi: 10.1038/srep14273

194. Yvon E.S., Burga R., Powell A., Cruz C.R., Fernandes R., Barese C., Nguyen T., Abdel-Baki M.S., Bollard C.M. Cord blood natural killer cells expressing a dominant negative TGF-beta receptor: Implications for adoptive immunotherapy for glioblastoma. *Cytotherapy*, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 408-418.

195. Zah E., Lin M.Y., Silva-Benedict A., Jensen M.C., Chen Y.Y. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells. *Cancer Immunol. Res.*, 2016, Vol. 4, no. 6, pp. 498-508.

196. Zhang C., Burger M.C., Jennewein L., Genssler S., Schonfeld K., Zeiner P., Hattingen E., Harter P.N., Mittelbronn M., Tonn T., Steinbach J.P., Wels W.S. ErbB2/HER2-specific NK cells for targeted therapy of glioblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2016, Vol. 108, no. 5.

197. Zhang G., Liu R., Zhu X., Wang L., Ma J., Han H., Wang X., Zhang G., He W., Wang W., Liu C., Li S., Sun M., Gao B. Retargeting NK-92 for anti-melanoma activity by a TCR-like single-domain antibody. *Immunology and Cell Biology*, 2013, Vol. 91, no. 10, pp. 615-624.

198. Zhang Y., Choksi S., Chen K., Pobezinskaya Y., Linnoila I., Liu Z.G. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. *Cell Res.*, 2013, Vol. 23, no. 7, pp. 898-914.

199. Zhou G., Levitsky H. Towards curative cancer immunotherapy: overcoming posttherapy tumor escape. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, Vol. 2012, 124187. doi: 10.1155/2012/124187.

200. Zitvogel L., Mayordomo J.I., Tjandrawan T., DeLeo A.B., Clarke M.R., Lotze M.T., Storkus W.J. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J. Exp. Med.*, 1996, Vol. 183, no. 1, pp. 87-97.

Авторы:

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

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

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

Кравченко Ю.Е. — к.б.н., научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия

Чумаков С.П. — к.б.н., научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия

Authors:

Lezhnin Yu.N., Research Fellow, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Khrstichenko A. Yu., Research Fellow, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Ratnikova N.M., Research Fellow, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Kravchenko Yu.E., PhD (Biology), Research Associate, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Chumakov S.P., PhD (Biology), Research Associate, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Поступила 12.07.2017

Отправлена на доработку 22.09.2017

Принята к печати 23.10.2017

Received 12.07.2017

Revision received 22.09.2017

Accepted 23.10.2017

ЗНАЧЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЛЕПТИНА И ГРЕЛИНА КАК БИОМАРКЕРА ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИЕТОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ У САМОК МЫШЕЙ C57Black/6J

Ригер Н.А., Евстратова В.С., Апрытин С.А., Гмошинский И.В., Ханферьян Р.А.

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

Резюме. Висцеральное ожирение, дислипидемия и инсулинорезистентность рассматриваются как основные причины обменных нарушений при метаболическом синдроме. Лептин и грелин являются важнейшими факторами, участвующими в регуляции метаболических процессов. Целью настоящего исследования была оценка значимости соотношения концентраций лептина и грелина (L/Gh), а также цитокинового профиля в качестве биомаркеров метаболических и иммунных нарушений на *in vivo* модели индуцированной диеты дислипидемии у мышей.

Исследования проводили на 48 мышках-самках линии C57Black/6, которые были разделены на 6 групп по 8 животных. Группа 1 (контроль) получала рацион AIN93; 2 – избыток жиров (30% сухой массы); 3 – добавку 20% фруктозы с водой к основному рациону; 4 – избыток жиров и фруктозы; 5 – избыток холестерина (0,5% сухой массы); 6 – избыток холестерина и фруктозы. Продолжительность эксперимента составила 63 суток. У всех животных определяли относительную массу внутренних органов. Уровни цитокинов, лептина и грелина в плазме определяли на анализаторе Luminex 200 с использованием наборов Bio-Plex.

Не было выявлено значимых различий концентраций лептина и грелина в плазме животных между контролем и большинством опытных групп, за исключением 6-й группы (комбинированный рацион с избытком фруктозы и холестерина), в которой уровень лептина был достоверно снижен по сравнению с контролем (группа 6: 2,12 пг/мл, min 1,57 – max 3,83 vs группа 1: 3,92 пг/мл, min 2,45 – max 27,88; $p < 0,05$). Изменения содержания грелина в плазме, в зависимости от рационов, имели в целом обратную тенденцию по сравнению с лептином. Величина L/Gh при избытке жировой (группа 2) и холестериновой (группа 5) составляющей имела статистически недостоверные тенденции к возрастанию. Добавление фруктозы к рациону с избытком жира или холестерина достоверно ($p < 0,05$) снижало L/Gh. У животных 6-й группы (фруктоза + холестерин) при минимальном L/Gh выявлена наименьшая общая масса жировых отложений. Связь между L/Gh и массой жира была подтверждена наличием линейной регрессионной зависимости между рассматриваемыми показателями. Также были обнаружены корреляционные связи между значениями L/Gh и показателями массы тела животных ($r = 0,424$; $\alpha = 0,004$), относительной массы жировой ткани ($r = 0,663$; $\alpha = 0,000$), печени ($r = -0,315$; $\alpha = 0,035$) и селезенки ($r = -0,585$; $\alpha = 0,000$), статистически значимые корреляции между L/Gh, массой органов и тканей и концентрациями IL-12(p40), IL-2,

Адрес для переписки:

Ригер Николай Александрович
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии»
109240, Россия, Москва, Устьинский проезд, 2/14.
Тел.: 8 (495) 698-53-45.
E-mail: riger@ion.ru; n_rieger63@mail.ru

Address for correspondence:

Riger Nikolay A.
Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology
109240, Russian Federation, Moscow, Ustinski proezd, 2/14.
Phone: 7 (495) 698-53-45.
E-mail: riger@ion.ru; n_rieger63@mail.ru

Образец цитирования:

Н.А. Ригер, В.С. Евстратова, С.А. Апрытин, И.В. Гмошинский, Р.А. Ханферьян «Значение соотношения концентраций лептина и грелина как биомаркера при индуцированной диетой гиперлипидемии у самок мышей C57Black/6J» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 341-352. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-341-352

© Ригер Н.А. и соавт., 2018

For citation:

N.A. Riger, V.S. Evstratova, S.A. Apryatin, I.V. Gmoshniskiy, R.A. Khanferyan "Importance of the leptin/grelin ratio as a biomarker in dietary induced hyperlipidemia in female C57Black/6 MICE", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 341-352. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-341-352

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-341-352

IL-9, IL-13, G-CSF и RANTES. Наряду с этим, установлены достоверные различия между контрольной и опытными группами по концентрациям в плазме G-CSF, IL-12(p40), IL-2, IL-3 и IL-9. Концентрация IL-12(p40) в плазме группы 2 была самой низкой по сравнению с контролем, а в 6-й группе на фоне самых низких показателей L/Gh и общего количества жира уровень IL-12(p40) был самым высоким.

Таким образом, была выявлена достоверная зависимость между L/Gh с изменениями массы органов и тканей, а также с уровнями цитокинов, участвующих в регуляции воспаления. Наиболее значимая взаимосвязь обнаружена между относительной массой жировых отложений, соотношением L/Gh и концентрацией IL-12(p40). При этом отмечается не только корреляционная зависимость, но и достоверные изменения L/Gh и содержания IL-12(p40) между опытными группами на *in vivo* модели алиментарной дислипидемии у мышей.

Ключевые слова: лептин, грелин, гиперлипидемия, цитокины, биомаркеры, корреляция

IMPORTANCE OF THE LEPTIN/GRELIN RATIO AS A BIOMARKER IN DIETARY INDUCED HYPERLIPIDEMIA IN FEMALE C57Black/6 MICE

Riger N.A., Evstratova V.S., Apryatin S.A., Gmoshniskiy I.V.,
Khanferyan R.A.

Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Visceral obesity, dyslipidemia and insulin resistance are considered the main causes of metabolic disorders in metabolic syndrome. Leptin and ghrelin are the most important factors involved in regulation of the metabolic processes. The purpose of this study was to evaluate the significance of leptin-to-ghrelin ratio (L/Gh) and cytokine profiles as biomarkers of metabolic and immune disorders in an *in vivo* model of a dietary induced dyslipidemia in mice.

The studies were carried out on 48 female C57Black/6 mice, which were divided into 6 groups of 8 animals. Group 1 (control) received the AIN93 diet; group 2, excess fat administration (30% dry weight); the mice from group 3 were supplied with 20% fructose in drinking water added to the main diet; group 4 got fats and fructose excess, group 5, cholesterol excess (0.5% dry weight); group 6 was fed with cholesterol and fructose in excess. Duration of the experiment was 63 days. In all animals, the relative mass of internal organs was determined. The levels of cytokines, leptin and ghrelin in plasma were determined by means of Luminex 200 analyzer using Bio-Plex kits.

There were no significant differences for plasma leptin and ghrelin concentrations between the control and most of experimental groups, except of the 6th group (combined diet with excess fructose and cholesterol) which a significantly lower leptin levels as compared to the controls (group 6: 2.12 pg/ml, min 1.57 – max 3.83 vs group 1: 3.92 pg/ml, min 2.45 – max 27.88, $p < 0.05$). The changes in plasma ghrelin contents, depending on the diet, showed a generally opposite trend when compared to leptin levels.

The value of L/Gh ratio in mice fed with excess fat (group 2) and cholesterol (group 5) showed a statistically insignificant trend for increase. Fructose added to a diet with fat or cholesterol excess caused a significant decrease in L/Gh ratio ($p < 0.05$). In animals of the 6th group (fructose + cholesterol) with minimal L/Gh values, the lowest total body fat deposition was found. The relationship between the L/Gh and the fat mass was confirmed by the linear regression relationship between the indicators considered. We have also found a correlation between L/Gh and animal fat weight ($r = 0.424$, $\alpha = 0.004$), relative mass of adipose tissue ($r = 0.663$, $\alpha = 0.000$), liver ($r = -0.315$, $\alpha = 0.035$) and spleen ($r = -0.585$; $\alpha = 0.000$), statistically significant correlations between L/Gh, organ and tissue weight and concentrations of IL-12(p40), IL-2, IL-9, IL-13, G-CSF and RANTES. In addition, significant differences were found between the control and test groups for plasma concentrations of G-CSF, IL-12(p40), IL-2, IL-3 and IL-9. The IL-12(p40) concentration in plasma from the group 2 mice was the lowest against controls. Meanwhile, the 6th group exhibited highest IL-12(p40) levels against the lowest L/Gh ratios and total fat levels.

Thus, a significant relationship was found between L/Gh ratio and changing mass of organs and tissues, as well as with the levels of cytokines involved into the regulation of inflammation. The most significant relationship was found between the relative mass of body fat, L/Gh ratio and the IL-12(p40) concentration. L/Gh ratio and IL-12p(40) showed both content Not only a correlation dependence, but also significant changes were noted between the experimental groups in the *in vivo* model of alimentary dyslipidemia in mice.

Keywords: leptin, ghrelin, hyperlipidemia, cytokines, biomarkers, correlation

Введение

Метаболический синдром (МС) представляет собой комплекс обменных нарушений, включающий висцеральное ожирение, артериальную гипертензию, дислипидемию, гипергликемию и резистентность к инсулину. Хотя патогенез МС до настоящего времени окончательно не расшифрован, висцеральное ожирение, дислипидемия и инсулинорезистентность рассматриваются как основные причины развивающихся нарушений обмена веществ, которые могут быть выявлены и контролируются на основании изменений специфических биомаркеров сыворотки крови [37]. Избыток жировой ткани ведет к нарушению соотношения основных групп цитокинов и адипокинов, способствуя прогрессированию метаболического синдрома [35]. Список этих адипокинов и цитокинов постоянно расширяется, а их экспрессия взаимосвязана с количеством резидентных клеток и гетерогенностью жировой клетчатки [9].

Важнейшими факторами, участвующими в регуляции метаболических процессов, являются лептин и грелин. Лептин – адипокин, который при физиологическом состоянии ограничивает аппетит, повышает расход энергии, активирует симпатическую нервную систему, облегчает утилизацию глюкозы и повышает чувствительность к инсулину [10]. Наряду с этим, лептин участвует в регуляции гемопоза, результатом чего являются наблюдаемые при ожирении изменения количества лейкоцитов, эритроцитов, уровня гемоглобина и, как следствие, нарушения иммунорегуляции [6, 23, 24, 32, 39]. Грелин – нейроэндокринный гормон, секретируемый, главным образом, в желудке, в меньшей степени – в поджелудочной железе и кишечнике, и способный проникать через гемато-энцефалический барьер, стимулирует аппетит за счет прямой активации GH-специфических рецепторов 1a (GHSR-1a) гипоталамуса, а также вследствие повышения экспрессии орексигенных пептидов, таких как нейропептид Y (NPY) [7, 40]. Механизмы взаимодействия лептина и грелина в регуляции метаболизма и расходования энергии менее изучены по сравнению с регуляторной ролью лептина и адипонектина. Анорексическое действие лептина обусловлено угнетением грелин-индуцированной экспрессии ней-

ропептида Y нейронами дугообразных ядер гипоталамуса, играющими основную роль в стимуляции аппетита [20]. В исследованиях по оценке программ уменьшения массы тела было отмечено, что увеличение соотношения лептин/грелин (L/Gh) является предвестником снижения эффективности лечения и свидетельствует о тенденции к последующему нарастанию количества жировой ткани [41]. В связи с этим представляется целесообразной оценка изменений концентраций и соотношения лептина и грелина в крови в качестве биомаркеров развития нарушений метаболизма, обусловленных индуцированной дислипидемией и ожирением.

Целью исследования была оценка биомаркерной значимости грелина и лептина и их соотношения в изменении массы органов и тканей лабораторных животных, а также цитокинового профиля при индуцированной различными диетами гиперлипидемии на охарактеризованной ранее *in vivo* модели МС у самок мышей C57Black/6J [1].

Материалы и методы

Исследования проводили на 48 мышках-самках линии C57Black/6J со средней начальной массой тела $17,8 \pm 0,1$ г ($M \pm m$), полученных из питомника лабораторных животных, филиал «Столовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России. Животных содержали группами по 2 особи при температуре 20-22 °С и режиме освещения 12/12 ч. Работу с животными выполняли в соответствии с руководством [14] и Правилами лабораторной практики (Приказ Минздравсоцразвития России № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики»).

Мыши были разделены на 6 групп по 8 животных. Средняя масса тела в группах животных достоверно не различалась ($p > 0,05$, ANOVA). В течение 63 дней животные группы 1 (контроль) получали полусинтетический рацион по AIN93 [34]; группы 2 – рацион с избытком жиров (30% по массе сухого корма); группы 3 – рацион с добавлением 20% раствора фруктозы вместо воды, группы 4 – рацион с избытком жиров и добавлением 20% раствора фруктозы, группы 5 – рацион с избытком холестерина (0,5% по массе сухого корма), группы 6 – рацион с избытком холестерина и добавлением

20% раствора фруктозы вместо воды. Все исследуемые рационы были изокалорийными. Выведение животных из эксперимента осуществляли путем декапитации под эфирной анестезией. Кровь собирали в пробирки с добавлением 10% по объему антикоагулянта — 1% раствора гепарина в стерильном 0,15 М NaCl. После этого кровь центрифугировали при 3000 г в течение 15 минут для отделения плазмы. Образцы плазмы хранили при температуре -24 °С. Пробы органов и тканей (печень, почки, селезенка, головной мозг, жировая ткань) отбирали в стерильных условиях и охлаждали на льду до температуры 0-2 °С. У всех животных определяли от-

носительную массу внутренних органов (печень, селезенка, сердце, почки, тимус, легкие, головной мозг, жир подкожно-паховый, брыжеечный, забрюшинный и общий [суммарный]) на электронных весах с точностью $\pm 0,01$ г.

Для определения уровня цитокинов и ростовых факторов (Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17 α , KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF α) использовали коммерческий набор Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Grp I Panel 23-Plex; для определения уровня маркеров диабета (Ghrelin, GIP, GLP-1, glucagon, insulin, leptin, PAI-1, resistin) — коммерческий набор Bio-Plex Mouse Diabetes Panel 8-Plex; все производства фирмы Bio-Rad Laboratories, Inc. (США). Исследования проводили на мультиплексном анализаторе Luminex 200 (Luminex Corporation, США) по технологии xMAP с использованием программного обеспечения Luminex xPONENT Version 3.1.

Статистическую обработку полученных данных и корреляционный анализ выполняли с помощью пакета программ SPSS 20.0. Достоверность различия эмпирической функции распределения в группах животных оценивали с помощью непараметрического рангового критерия Манна—Уитни. Пороговое значение вероятности отклонения нуль-гипотезы было принято равным $p < 0,05$. Доверительный интервал для полученных коэффициентов корреляции (r) принимался для $\alpha < 0,05$.

Результаты

Уровни лептина в плазме мышей в разной степени претерпевали изменения под влиянием используемых рационов (рис. 1). В наибольшей степени концентрация лептина снижалась по сравнению с контролем при сочетании холестерина с фруктозой (группа 6: 2,12 пг/мл, min 1,57 — max 3,83 vs группа 1: 3,92 пг/мл, min 2,45 — max 27,88; $p < 0,05$). Напротив, при избытке жирового компонента (группа 2) уровень этого гормона проявлял статистически недостоверную тенденцию к росту (группа 2: 10,20 пг/мл, min 3,52 — max 26,91) по сравнению с контролем и остальными группами. В группе с избытком холестерина уровень лептина также имел тенденцию к увеличению по сравнению с контрольными животными (группа 5: 6,42 пг/мл, min 2,01 — max 11,10). Добавление фруктозы к высокожировому и холестериновому рационам приводило в обоих случаях к достоверному снижению концентрации лептина (группа 4 vs группа 2; $p < 0,05$; группа 6 vs группа 5; $p < 0,05$).

Изменения содержания грелина в плазме, в зависимости от рационов, имели в целом обратную тенденцию по сравнению с лептином (рис. 1).

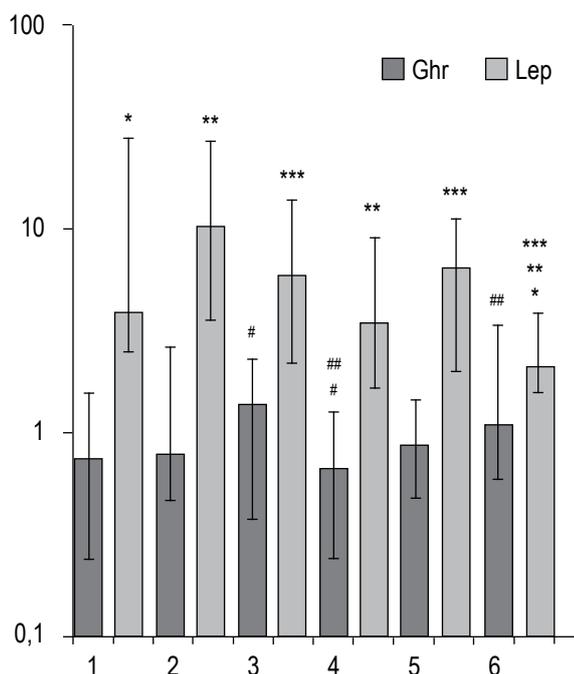


Рисунок 1. Уровень грелина и лептина в плазме мышей

Примечание. По оси Y — концентрация грелина и лептина — пг/мл; по оси X — номера групп: 1 — контроль, 2 — избыток жиров, 3 — избыток фруктозы, 4 — жиров и фруктозы, 5 — избыток холестерина, 6 — избыток холестерина и фруктозы.

* — $p < 0,05$ — различия концентраций лептина между группами 1 и 6;

** — $p < 0,05$ — различия концентраций лептина между группами 2 и 4, 2 и 6;

*** — $p < 0,05$ — различия концентраций лептина между группами 3 и 6, 5 и 6;

— $p < 0,05$ — различия концентраций грелина между группами 3 и 4;

— $p < 0,05$ — различия концентраций грелина между группами 4 и 6.

Figure 1. Levels of ghrelin and leptin in the blood plasma of mice

Note. Y axis, ghrelin and leptin concentrations in pg/ml; X axis, the numbers of the groups: 1, control; 2, excess fat; 3, excess fructose; 4, excess fats and fructose; 5, added cholesterol; 6, added cholesterol and excess fructose.

*, $p < 0.05$, differences in leptin concentrations between groups 1 and 6;

**, $p < 0.05$, differences in leptin concentrations between groups 2 and 4, 2 and 6;

***, $p < 0.05$, differences in leptin concentrations between groups 3 and 6, 5 and 6;

#, $p < 0.05$, differences in ghrelin concentrations between groups 3 and 4;

##, $p < 0.05$, differences in ghrelin concentrations between groups 4 and 6.

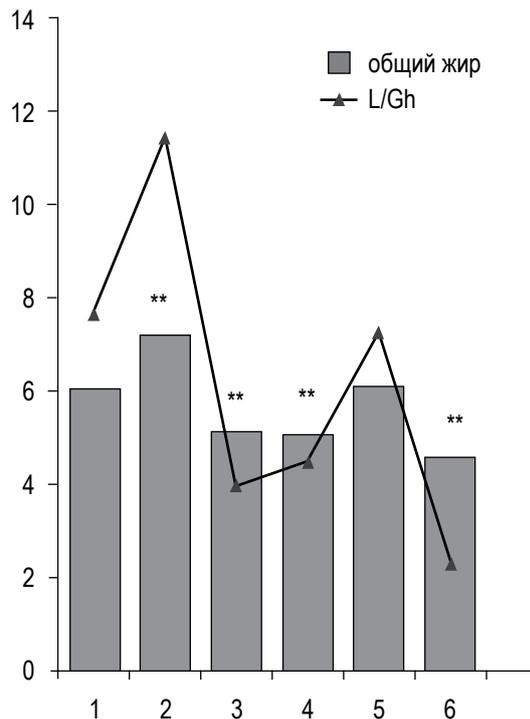


Рисунок 2. Динамика изменений соотношения концентраций грелина и лептина (L/Gh) и жировой массы при различных рационах

Примечание. По оси Y – соотношения концентраций грелина и лептина (L/Gh) и жировой массы (FAT) в относительных единицах; по оси X – номера групп: 1 – контроль, 2 – избыток жиров, 3 – избыток фруктозы, 4 – жиров и фруктозы, 5 – избыток холестерина, 6 – избыток холестерина и фруктозы. ** – $p < 0,05$ – различия в жировой массе между группами 2 и 3, 2 и 4, 2 и 6.

Figure 2. Dynamics of changes in ghrelin-to-leptin ratio (L/Gh) and fat mass for various experimental diets

Note. Y axis, ghrelin to leptin ratios (L/Gh) and fat mass (FAT) in relative units; X axis, experimental group numbers: 1, control; 2, excess fat; 3, excess fructose; 4, excess fat and fructose; 5, added cholesterol; 6, added cholesterol and fructose excess.

**, $p < 0.05$, differences in fat mass between groups 2 and 3, 2 and 4, 2 and 6.

В группах с избытком в диете жира и холестерина содержание в плазме грелина у опытных животных практически не отличалось от контроля. Избыток фруктозы, наоборот, способствовал умеренному росту концентрации грелина в плазме (различие с группой 1 на уровне тенденции). При сравнении эффекта комбинированных рационов установлено достоверное снижение уровня грелина при сочетании фруктозы и жира по сравнению с фруктозным рационом, а также с сочетанием фруктозы и холестерина (рис. 1).

График изменений соотношения концентраций лептина к грелину (L/Gh) представлен на рисунке 2. При избытке жировой и холестериновой составляющей это соотношение имело статистически

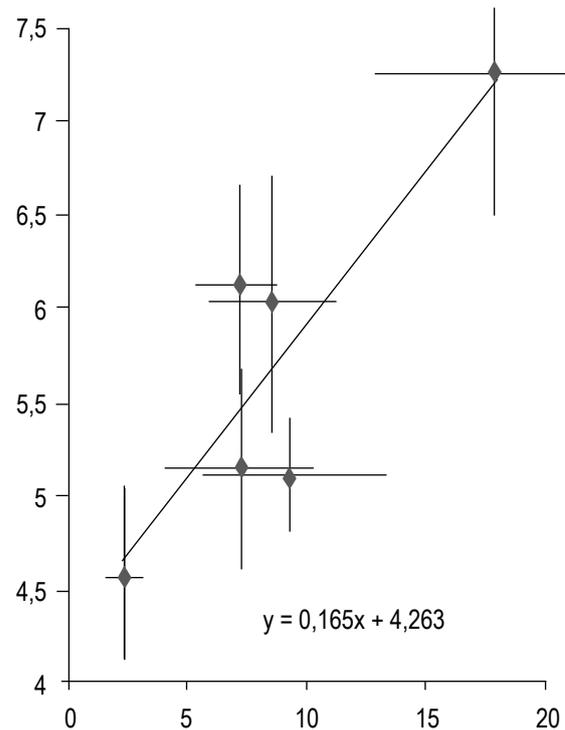


Рисунок 3. Регрессионная зависимость между соотношением L/Gh и массой жировой ткани мышей при выведении из эксперимента

Примечание. По оси абсцисс (X) – L/Gh (безразмерная величина), $M \pm m$; по оси ординат (Y) – масса жира, % от массы тела, $M \pm m$.

Figure 3. Linear regression between the L/Gh ratio and the fat mass of the mice by upon finishing the experiment

Note. X axis, L/Gh ratio $M \pm m$; Y axis, fat mass, % of body weight, $M \pm m$.

недостоверные тенденции к возрастанию, особенно во 2-й группе (L/Gh: 11,5, min 2,1 – max 46,8), по сравнению с контролем и остальными опытными группами. Напротив, на фоне избытка фруктозы L/Gh снизилось. Добавление фруктозы к рациону с избытком жира или холестерина выражено снижало соотношение L/Gh по сравнению с контролем и рационами с добавкой только жира и холестерина соответственно. Данный эффект был максимально выражен в 6-й группе животных (L/Gh: 2,3, min 0,6 – max 4,8; $p < 0,05$ в сравнении с контрольными и опытными группами – рис. 2). У животных 6-й группы при минимальном соотношении L/Gh выявлена наименьшая общая масса жировых отложений. Напротив, во 2-й группе (рацион с избытком жира), при самом высоком соотношении L/Gh обнаружено достоверно большее количество жировых отложений по сравнению с контролем и 6-й группой животных (рис. 3). Связь между L/Gh и массой жира подтверждается наличием линейной регрессионной зависимости между рассматриваемыми показателями (рис. 3).

Участие лептина и грелина в метаболических процессах накопления липидов и энергетических ресурсов подтверждается обнаружением корреляционных связей между индивидуальными значениями L/Gh и показателями массы тела животных ($r = 0,424$; $\alpha = 0,004$), относительной массы жировой ткани ($r = 0,663$; $\alpha = 0,000$), печени ($r = -0,315$; $\alpha = 0,035$) и селезенки ($r = -0,585$; $\alpha = 0,000$). Кроме того, изменения этих показателей в той или иной степени коррелировали между собой (табл. 1). Обнаружены также статистически значимые корреляции между L/Gh, морфологическими параметрами животных и концентрациями ряда цитокинов в плазме. Так, в частности:

– изменение соотношения L/Gh коррелировало с IL-12(p40): $r = -0,411$; $\alpha = 0,005$; IL-2: $r = 0,324$; $\alpha = 0,03$; IL-9: $r = -0,298$; $\alpha = 0,047$;

– общая масса животных при забое – с IL-13: $r = 0,343$; $\alpha = 0,021$;

– относительное количество общего жира – с IL-2: $r = 0,351$; $\alpha = 0,018$ и RANTES: $r = -0,311$; $\alpha = 0,038$;

– относительная масса печени – с G-CSF: $r = 0,313$; $\alpha = 0,036$.

Наряду с этим, установлены достоверные различия между контрольной и опытными группами по концентрациям в плазме G-CSF, IL-12(p40), IL-2 и IL-9 (табл. 2). Концентрация IL-12(p40) в плазме мышей группы 2 была самой низкой по сравнению с контролем ($0,285 \text{ пг/см}^3$, $\text{min } 0,155$ – $\text{max } 0,404$ vs $0,374 \text{ пг/см}^3$, $\text{min } 0,282$ – $\text{max } 0,591$; $p < 0,05$ в сравнении с контролем) и с группами 4 и 6 ($0,394 \text{ пг/см}^3$, $\text{min } 0,251$ – $\text{max } 0,581$ и $0,427 \text{ пг/см}^3$, $\text{min } 0,194$ – $\text{max } 0,729$; $p < 0,05$ в сравнении с группой 2). В 6-й группе на фоне самых низких показателей лептина, L/Gh и общего количества жира концентрация IL-12(p40) была самой высокой. Напротив, плейоморфный регулятор пролиферации и апоп-

ТАБЛИЦА 1. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ МЕЖДУ СООТНОШЕНИЕМ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЛЕПТИНА И ГРЕЛИНА И МАССОЙ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ

TABLE 1. CORRELATIONS BETWEEN THE LEPTIN-TO-GHRELIN RATIO AND THE WEIGHT OF ANIMAL'S ORGANS AND TISSUES

Parameter Parameter	n = 45	L/Gh ratio	Масса Body weight	Относительная масса органов Relative weights of organs and tissues, %		
				Печень Liver	Селезенка Spleen	Жир общий Total fat
L/Gh	r		0,42	-0,32	-0,59	0,66
	α		0,004	0,035	0,000	0,000
Масса Body weight	r	0,42		-0,39	-0,41	0,49
	α	0,004		0,008	0,006	0,001
Печень Liver	r	-0,32	-0,39		0,38	-0,38
	α	0,035	0,008		0,010	0,009
Селезенка Spleen	r	-0,59	-0,41	0,38		-0,65
	α	0,000	0,006	0,010		0,000
Жир общий Total fat	r	0,66	0,49	-0,38	-0,65	
	α	0,000	0,001	0,009	0,000	

Примечание. n = 45 – общее количество животных, для которых проводился корреляционный анализ; L/Gh – соотношение концентраций лептина и грелина; масса – масса животных при выведении из эксперимента; r – коэффициент корреляции; α – достоверность для полученного коэффициента корреляции ($p < 0,05$).

Note. n = 45, the total number of animals for which the correlation analysis was performed; L/Gh, leptin-to-ghrelin ratio; body weight has been measured at the end of experiment; r, Pearson correlation coefficient; α , confidence for the obtained correlation coefficient ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В ПЛАЗМЕ ЖИВОТНЫХ
TABLE 2. LEVELS OF CYTOKINES (pg/ml) IN ANIMALS' BLOOD PLASMA

Цитокины, пг/мл Cytokines, pg/ml		Группы животных, число (n) животных в группе Groups of animals, number (n) of animals in the group					
		1	2	3	4	5	6
		n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
RANTES	Median	0,0578	0,0614	0,0684	0,0632	0,0652	0,0904
	Min	0,0144	0,0000	0,0000	0,0190	0,0157	0,0385
	Max	0,1205	0,1070	0,1176	0,1203	0,0997	0,1423
G-CSF	Median	0,0451 ⁴	0,0558	0,0664	0,0701 ¹⁵	0,0430 ⁴	0,0839
	Min	0,0183	0,0394	0,0318	0,0534	0,0127	0,0237
	Max	0,1134	0,0796	0,1756	0,1308	0,1197	0,1166
IL-12(p40)	Median	0,374 ²	0,285 ¹⁴⁶	0,339	0,394 ²	0,406	0,427 ²
	Min	0,282	0,155	0,205	0,251	0,212	0,194
	Max	0,591	0,404	0,822	0,581	0,530	0,729
IL-2	Median	0,0181 ⁵⁶	0,0241 ⁶	0,0174	0,0152	0,0133 ¹	0,0125 ¹²
	Min	0,0006	0,0050	0,0050	0,0135	0,0065	0,0000
	Max	0,0409	0,0535	0,0446	0,0258	0,0334	0,0318
IL-3	Median	0,0004 ²⁻⁶	0,0059 ¹	0,0051 ¹	0,0104 ¹	0,0071 ¹	0,0105 ¹
	Min	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0032	0,0014
	Max	0,0209	0,0152	0,0313	0,0459	0,0094	0,0477
IL-9	Median	0,0511	0,0591 ³	0,0447 ²⁴	0,0607 ³	0,0431	0,0479
	Min	0,0319	0,0399	0,0255	0,0367	0,0224	0,0159
	Max	0,0702	0,0862	0,0575	0,0894	0,0702	0,0607
IL-13	Median	0,234	0,346	0,203	0,209	0,226	0,338
	Min	0,119	0,174	0,002	0,075	0,033	0,091
	Max	1,181	0,577	0,741	0,933	0,439	0,587

Примечание. Надстрочные индексы – достоверные различия ($p < 0,05$) концентраций цитокинов в плазме в сравнении между группами; номера групп: 1 – контроль, 2 – избыток жиров, 3 – избыток фруктозы, 4 – жиров и фруктозы, 5 – избыток холестерина, 6 – избыток холестерина и фруктозы.
Цитокины: RANTES, Chemokine (C-C motif) ligand 5, G-CSF, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, IL, интерлейкин.

Note. Superior figures, significant differences ($p < 0.05$) in plasma concentrations of cytokines by the intergroup comparisons; numbers of groups: 1, control; 2, excess fat; 3, excess fructose; 4, excess fat, and fructose; 5, added cholesterol; 6, added cholesterol and excess fructose.

Cytokines: RANTES, Chemokine (C-C motif) ligand 5; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; IL, interleukin.

тоза – IL-9 – также отрицательно коррелировал с L/Gh. При этом концентрации IL-9 были самыми высокими у животных 2-й и 4-й групп ($p < 0,05$ в сравнении со группой 3). Уровень G-CSF возрастал в опытных группах по сравнению с контролем. Достоверные изменения этого фактора выявлены в группе 4 (0,0701 пг/см³, min 0,0534 – max 0,1308 vs 0,0451 пг/см³, min 0,0183 – max 0,1134; $p < 0,05$ в сравнении с контролем) по сравнению с контролем и группой 5 (0,0430 пг/см³, min 0,0127 – max 0,1197; $p < 0,05$ в сравнении с группой 4). Уровень основного стимулятора гемопоэза IL-3 также до-

стоверно увеличился во всех опытных группах по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Содержание IL-2 оказалось достоверно меньшим в группах 5 и 6 по сравнению с животными, получавшими сбалансированный рацион (табл. 2). Для наиболее значимо изменявшегося при использовании различных диет IL-3 не было выявлено корреляций с L/Gh. Однако изменения уровня этого фактора имели положительную связь с содержанием в плазме животных RANTES ($r = 0,504$; $\alpha = 0,000$) и G-CSF ($r = 0,414$; $\alpha = 0,004$).

Обсуждение

В настоящее время растет число доказательств, что воспаление является важнейшим патогенетическим фактором развития резистентности к инсулину на фоне висцерального ожирения [24]. С другой стороны, избыточная адипозная ткань выполняет роль эндокринного органа, регулируя продукцию гормонов и цитокинов [30]. Продукция провоспалительных цитокинов [2, 28], маркеров прооксидантного статуса (продукты окисления липидов, мочевая кислота) [18, 36] и тромбогенных факторов (РАI-1) [22] увеличивается при метаболическом синдроме. Помимо этого, было обнаружено повышение концентрации лептина и нарастание резистентности к лептину [37]. Напротив, экспрессия противовоспалительных цитокинов (в частности, интерлейкина-10 [IL-10]), грелина, адипонектина и продукция антиоксидантных факторов (параоксоназа/арилестераза — PON-1) уменьшаются при метаболическом синдроме [4, 27]. Нарушения продукции и изменения концентраций биомаркеров при метаболическом синдроме могут коррелировать с выраженностью обменных нарушений [37].

Общеизвестно, что основным методом лечения при висцеральном ожирении являются редуцированные диеты в сочетании с физической нагрузкой, что сопровождается количественной и качественной нормализацией обменных нарушений. Для диагностики и раннего выявления, а также мониторинга результатов лечения компонентов метаболического синдрома необходимо использовать обладающие высокой чувствительностью и специфичностью биомаркеры. Результаты оценки уровней циркулирующих адипокинов на *in vivo* моделях индуцированного ожирения и в клинике подтвердили, что изменения в соотношении лептин/адипонектин (L/A) более информативны по сравнению с динамикой сывороточных концентраций каждого из этих факторов [11, 21]. Лимитирующим фактором использования L/A являются более высокие уровни адипонектина у самок животных и лиц женского пола и более значимая ассоциация с метаболическим синдромом у женщин, чем у мужчин [5]. Эти особенности обусловлены половыми различиями в обмене углеводов и жиров. Еще один ограничивающий фактор использования соотношения L/A в качестве биомаркеров — различия между уровнями лептина и адипонектина мало изменяются в фазу голода и в стадию насыщения [13].

В проведенных нами исследованиях не выявлено значимых различий концентрации лептина и грелина в плазме животных между контролем и большинством опытных групп, за исключением 6-й группы (комбинированный рацион с избыт-

ком фруктозы и холестерина), в которой уровень лептина был достоверно снижен по сравнению с контролем. При этом если концентрация лептина в плазме животных имела статистические различия в опыте с наибольшими проявлениями между 2-й и 6-й группами, то достоверных изменений уровней грелина даже на фоне используемых рационов в большинстве случаев выявлено не было (рис. 1). Поэтому оценка натуральных величин, как свидетельствуют результаты исследований, по аналогии с концентрациями лептина и адипонектина, про- и противовоспалительных цитокинов, про- и антиоксидантных факторов остаются недостаточно информативными для мониторинга компонентов метаболического синдрома. Как правило, при исследовании *in vivo* цитокинового и адипокинового спектра, про- и антиоксидантной активности, наблюдается широкая индивидуальная дисперсия показателей [24, 26]. Похожая ситуация была обнаружена и в нашем исследовании, где показатели лептина, грелина и цитокинового профиля довольно часто различались между контролем и опытными группами статистически недостоверно.

Основной результат антагонизма лептина и грелина проявляется в регуляции потребления пищи, накопления жировой ткани и расхода энергии. Лептин в ответ на накопление жира при обычной концентрации в плазме снижает аппетит и повышает расход энергии. Секретируемый первично в слизистой оболочке желудка грелин, особенно в период голода, повышается в плазме и, усиливая экспрессию нейропептида Y нейронами дугообразных ядер гипоталамуса, стимулирует организм к приему пищи [41]. Лептин супрессирует эффект грелина через фосфоинозитид-3-киназы/Akt (PI3k/Akt) и фосфодиэстеразы 3 (PDE3) метаболические пути [20]. Кроме того, низкий уровень глюкозы потенцирует активирующее действие грелина, а инсулин, наоборот, усиливает супрессорное влияние лептина на NPY-нейроны [41].

Иммуногистохимические исследования свидетельствуют, что грелин-специфические рецепторы (GHSR) и рецепторы к лептину (LEPR, OB-R) коэкспрессируются более чем в 90% нейронов дугообразных ядер гипоталамуса [31]. Такая тесная взаимосвязь непосредственно отражает значимость соотношения L/Gh. Это проявляется высокой положительной корреляционной связью между L/Gh и массой тела животных, а также относительной массой жировой ткани (табл. 1, рис. 3).

На этом фоне интересным фактом становятся достаточно значимые отрицательные корреляционные зависимости между L/Gh и относительной массой печени и селезенки. Отрицательная взаимосвязь

относительной массы печени и селезенки также была прослежена к относительной массе жировых отложений (табл. 1). Анатомическая и функциональная связь этих органов в регуляции метаболических процессов в норме и при патологии общеизвестна. В частности, при фиброзных изменениях в печени (независимо от этиологического фактора) неизбежно происходят дистрофические изменения в тканях селезенки [16, 25]. Взаимосвязь между изменениями L/Gh и массой органов и тканей может быть обусловлена участием лептина и грелина в регуляции ангиогенеза и формировании фиброзных изменений, которые наблюдаются при ожирении и метаболическом синдроме. Причем была показана как проангиогенная, так и антифибротическая роль грелина *in vivo* и *in vitro* за счет активации Bcl-2 (белок семейства регуляторов апоптоза) сигнального пути и редукции апоптоза [17]. На этом фоне системное введение грелина мышам, получающим обогащенный жирами рацион, способствовало увеличению сывороточного VEGF (фактор роста эндотелия) и снижению сывороточных концентраций лептина и NO (окись азота II) [19].

Лептин и грелин, наравне с цитокинами, обладают плеiotропной активностью и участвуют в механизмах регуляции воспаления, как одного из компонентов метаболического синдрома [23, 25, 33]. Корреляционная зависимость L/Gh, показателей абсолютной и относительной массы органов и тканей с рядом достоверно изменяющихся концентраций цитокинов в плазме мышей – достаточно интересная и закономерная находка. Механизм и пути развития лептин/лептин–рецептор и грелин/грелин–рецептор резистентности широко исследуются как мишень для целевого воздействия на патофизиологию иммунных и метаболических расстройств [8, 32]. Наиболее значимая зависимость с показателями L/Gh, а также абсолютной и относительной массой органов и тканей мышей была выявлена для следующих цитокинов: IL-12(p40) (отрицательная); IL-2, IL-9 (отрицательная); IL-13, RANTES (отрицательная). Для IL-12(p40), IL-2, IL-9 и G-CSF также были выявлены изменения в плазме при различных рационах. Причем концентрации IL-12(p40) в плазме достоверно изменялись в зависимости от относительной массы жировой ткани и L/Gh, особенно между 2-й и 6-й группами. Лептин в настоящее время все чаще рассматривается в роли иммунорегулятора. Структурно лептин содержит 4 альфа-спиральных домена – 2 пары альфа-спиралей, расположенных под углом друг к другу. Эти домены обладают большим сходством с участками альфа-спиралей длинных цепей цитокинов, таких как IL-2, IL-6, IL-11, IL-12, G-CSF и онкостатин М (OSM) [3, 24, 26]. Плеiotропные

особенности лептина обусловлены универсальным характером лептин-рецептора (OB-R), который представлен у мышей 6-ю изоформами, различающимися по своей локализации и функциям [29]. При этом только OB-Rb тип рецепторов (OB-Rb: long form) обладает наиболее значимой функциональной активностью, являясь наиболее важным компонентом в лептин–лептин–рецептор сигнальном пути [23]. Кроме высокой экспрессии в ядрах гипоталамуса, OB-Rb обнаруживаются на различных субпопуляциях Т-, В- и NK-лимфоцитов, дендритных клетках, моноцитах/макрофагах и гранулоцитах у грызунов и человека [32].

Кодируемые db-генами OB-R демонстрируют структурное сходство с семейством цитокиновых рецепторов класса I [29, 38]. По аналогии с другими членами этого семейства OB-R существенно подавляет активность тирозинкиназы, но способствует активации рецептор-ассоциированного семейства JAKs (Janus-семейство рецептор-ассоциированных киназ), которые инициируют снижение передачи сигналов транскрипционных факторов, в том числе членов STAT-семейства (факторы передачи сигналов от цитокинов). Дополнительно к активации семейства STAT OB-R-сигнальные пути вовлечены в активацию MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа) и PI3K/Akt сигнальных каскадов [32]. Эти же сигнальные каскады, как было указано выше, вовлечены в регуляцию антагонистических взаимодействий лептин–грелин на уровне нейронов дугообразных ядер гипоталамуса [20].

Примечательно, что цитокины IL-2, IL-9 и IL-12(p40), с которыми была выявлена достоверная корреляционная связь L/Gh, также содержат 4 альфа-спиральных домена, а их рецепторные структуры относят к классу I рецепторов цитокинов, как и рецепторы лептина. Подобная структурная особенность лептина свидетельствует о его роли, наравне с перечисленными цитокинами, в регуляции иммунного ответа [32]. У мышей при отсутствии секреции лептина (ob/ob mice) и рецепторов к лептину (db/db mice) наблюдаются не только эндокринная недостаточность и избыток жировых отложений, но и различные иммунодефицитные состояния, сопровождающиеся аутоиммунными процессами [12, 15, 33]. Цитокины: IL-12(p40), IL-2, IL-9, IL-13, RANTES, IL-3 и G-CSF, для которых выявлена прямая или опосредованная зависимость с изменениями L/Gh, принимают непосредственное участие в механизмах регуляции воспаления и инсулинорезистентности при метаболическом синдроме [24, 32].

Таким образом, на основании проведенного корреляционного анализа выявлена достоверно значимая зависимость между концентрациями

лептина, грелина и их соотношения в плазме с изменениями массы органов и тканей при индуцированной гиперлипидемии у мышей-самок C57Black/6J.

Соотношение концентраций лептина и грелина достоверно коррелирует с уровнями цитокинов в крови, участвующих в регуляции воспаления, в том числе и в жировой ткани и при резистентно-

сти к инсулину. Наиболее значимая взаимосвязь обнаружена между относительной массой жировых отложений, соотношением L/Gh и концентрацией IL-12(p40). При этом отмечается не только достоверная корреляционная зависимость, но и достоверные изменения концентраций лептина, грелина, уровня L/Gh и содержания IL-12(p40) в плазме крови самок C57Black/6J.

Список литературы / References

1. Апрытин С.А., Мжельская К.В., Трусов Н.В., Балакина А.С., Кулакова С.Н., Сото Х.С., Макаренко М.А., Ригер Н.А., Тутельян В.А. Сравнительная характеристика *in vivo* моделей гиперлипидемии у крыс линии Вистар и мышей линии C57Bl/6 // Вопросы питания, 2016. Т. 85, № 6. С. 14-23. [Apryatin S.A., Mzhelskaya K.V., Trusov N.V., Balakina A.S., Kulakova S.N., Soto S.Kh., Makarenko M.A., Riger N.A., Tutelyan V.A. Comparative characteristics of *in vivo* models of hyperlipidemia in Wistar rats and C57Bl/6 mice. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*, 2016, Vol. 85, no. 6, pp. 14-23. (In Russ.)]
2. Aroor A.R., McKarns S., Demarco V.G., Jia G., Sowers J.R. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism*, 2013, Vol. 62, no. 11, pp. 1543-1552.
3. Baumann H., Morella K.K., White D.W., Dembski M., Bailon P.S., Kim H., Lai C.F., Tartaglia L.A. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, Vol. 93, no. 16, pp. 8374-8378.
4. Choi K.M., Ryu O.H., Lee K.W., Kim H.Y., Seo J.A., Kim S.G., Choi D.S., Baik S.H. Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2007, Vol. 75, no. 2, pp. 235-240.
5. Cicero A.F., Magni P., More M., Ruscica M., Borghi C., Strollo F. Brisighella heart study staff. Metabolic syndrome, adipokines and hormonal factors in pharmacologically untreated adult elderly subjects from the Brisighella Heart Study historical cohort. *Obesity Facts*, 2012, Vol. 5, no. 3, pp. 319-326.
6. Claycombe K., King L.E., Fraker P.J. A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, Vol. 105, no. 6, pp. 2017-2021.
7. Cong W.N., Golden E., Pantaleo N., White C.M., Maudsley S., Martin B. Ghrelin receptor signaling: a promising therapeutic target for metabolic syndrome and cognitive dysfunction. *CNS and Neurological Disorders Drug Targets*, 2010, Vol. 9, no. 5, pp. 557-563.
8. Cui H., López M., Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2017, Vol. 13, no. 6, pp. 338-351.
9. Deng Y., Scherer P.E. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011, Vol. 1226, no. 1, pp. 50-69.
10. Dong M., Ren J. What fans the fire: insights into mechanisms of leptin in metabolic syndrome-associated heart diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, Vol. 20, no. 4, pp. 652-658.
11. Falahi E., Khalkhali Rad A.H., Roosta S. What is the best biomarker for metabolic syndrome diagnosis? *Diabetes Metab. Syndr.*, 2015, Vol. 9, no. 4, pp. 366-372.
12. Fantuzzi G., Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.*, 2000, Vol. 68, no. 4, pp. 437-446.
13. Finucane F.M., Luan J., Wareham N.J., Sharp S.J., O'Rahilly S., Balkau B., Flyvbjerg A., Walker M., Højlund K., Nolan J., Savage DB. Correlation of the leptin:adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia*, 2009, Vol. 52, no. 11, pp. 2345-2349.
14. Guide for the care and use of laboratory animals. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research (ILAR); Division on Earth and Life Studies (DELS); National Research Council of the national academies. 8th Ed. Washington: The National Academies Press, 2011, 248 p.
15. Howard J.K., Lord G.M., Matarese G., Vendetti S., Ghatei M.A., Ritter M.A., Lechler R.I., Bloom S.R. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J. Clin. Invest.*, 1999, Vol. 104, no. 8, pp. 1051-1059.

16. Kashani A., Salehi B., Anghesom D., Kawayeh A.M., Rouse G.A., Runyon B.A. Spleen size in cirrhosis of different etiologies. *J. Ultrasound. Med.*, 2015, Vol. 34, no. 2, pp. 233-238.
17. Katare R., Rawal S., Munasinghe P.E., Tsuchimochi H., Inagaki T., Fujii Y., Dixit P., Umetani K., Kangawa K., Shirai M., Schwenke D.O. Ghrelin promotes functional angiogenesis in a mouse model of critical limb ischemia through activation of proangiogenic microRNAs. *Endocrinology*, 2016, Vol. 157, no. 2, pp. 432-445.
18. Kelly A.S., Jacobs D.R. Jr., Sinaiko A.R., Moran A., Steffen L.M., Steinberger J. Relation of circulating oxidized LDL to obesity and insulin resistance in children. *Pediatric. Diabetes*, 2010, Vol. 11, no. 8, pp. 552-555.
19. Khazaei M., Tahergorabi Z. Systemic ghrelin administration alters serum biomarkers of angiogenesis in diet-induced obese mice. *Int. J. Pept.*, 2013, ID 249565, 5 p.
20. Kohno D., Nakata M., Maekawa F., Fujiwara K., Maejima Y., Kuramochi M., Shimazaki T., Okano H., Onaka T., Yada T. Leptin suppresses ghrelin-induced activation of neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus via phosphatidylinositol 3-kinase- and phosphodiesterase 3-mediated pathway. *Endocrinology*, 2007, Vol. 148, no. 5, pp. 2251-2263.
21. Kotani K., Sakane N. Leptin:adiponectin ratio and metabolic syndrome in the general Japanese population. *Korean J. Lab. Med.*, 2011, Vol. 31, no. 3, pp. 162-166.
22. Kraja A.T., Province M.A., Arnett D., Wagenknecht L., Tang W., Hopkins P.N. Do inflammation and procoagulation biomarkers contribute to the metabolic syndrome cluster? *Nutrition and metabolism*, 2007, Vol. 4, no. 1, pp. 28-40.
23. Lam Q.L., Lu L. Role of leptin in immunity. *Cell. Mol. Immunol.*, 2007, Vol. 4, no. 1, pp. 1-13.
24. Lee B.C., Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, Vol. 1842, no. 3, pp. 446-462.
25. Li L., Duan M., Chen W., Jiang A., Li X., Yang J., Li Z. The spleen in liver cirrhosis: revisiting an old enemy with novel targets. *J. Transl. Med.*, 2017, Vol. 15, no. 1, pp. 111-120.
26. López-Jaramillo P., Gómez-Arbeláez D., López-López J., López-López C., Martínez-Ortega J., Gómez-Rodríguez A., Triana-Cubillos S. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 18, no. 1, pp. 37-45.
27. Martinelli N., Micaglio R., Consoli L., Guarini P., Grison E., Pizzolo F., Friso S., Trabetti E., Pignatti P.F., Corrocher R., Olivieri O., Girelli D. Low levels of serum paraoxonase activities are characteristic of metabolic syndrome and may influence the metabolic-syndrome-related risk of coronary artery disease. *Exp. Diabetes Res.*, 2012, Vol. 2012, ID 231502, 9 p.
28. Musialik K. The influence of chosen adipocytokines on blood pressure values in patients with metabolic syndrome. *Kardiol Pol.*, 2012, Vol. 70, no. 12, pp. 1237-1242.
29. Myers M.G. Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog. Horm. Res.*, 2004, Vol. 59, pp. 287-304.
30. Ouchi N., Parker J.L., Lugus J.J., Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 2, pp. 85-97.
31. Perello M., Scott M.M., Sakata I., Lee C.E., Chuang J.C., Osborne-Lawrence S., Rovinsky S.A., Elmquist J.K., Zigman J.M. Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. *J. Comp. Neurol.*, 2012, Vol. 520, pp. 281-294.
32. Pérez-Pérez A., Vilariño-García T., Fernández-Riejos P., Martín-González J., Segura-Egea J.J., Sánchez-Margalet V. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2017, Vol. 35, pp. 71-84.
33. Perna V., Perez-Perez A., Fernandez-Riejos P., Polo-Padillo J., Batista N., Dominguez-Castellano A., Sanchez-Margalet V. Effective treatment of pulmonary tuberculosis restores plasma leptin levels. *Eur. Cytokine Netw.*, 2013, Vol. 24, no. 4, pp. 157-161.
34. Reeves P.C. AIN-93 purified diets for the study of trace elements metabolism in rodents. Trace elements in laboratory rodents. Ed. Watson R.R., CRC Press. Ink., 1997, pp. 3-34.
35. Ryo M., Nakamura T., Kihara S., Kumada M., Shibazaki S., Takahashi M., Nagai M., Matsuzawa Y., Funahashi T. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ. J.*, 2004, Vol. 68, no. 11, pp. 975-981.
36. Silva H.A., Carraro J.C., Bressan J., Hermsdorff H.H. Relation between uric acid and metabolic syndrome in subjects with cardiometabolic risk. *Einstein*, 2015, Vol. 13, no. 2, pp. 202-208.
37. Srikanthan K., Feyh A., Visweshwar H., Sodhi K. Systematic review of metabolic syndrome biomarkers: a panel for early detection, management, and risk stratification in the West Virginian population. *Int. J. Med. Sci.*, 2016, Vol. 13, no. 1, pp. 25-38.

38. Tartaglia L.A. The leptin receptor. *J. Biol. Chem.*, 1997, Vol. 272, no. 10, pp. 6093-6096.
39. Trottier M.D., Naaz A., Li Y., Fraker P.J. Enhancement of hematopoiesis and lymphopoiesis in diet-induced obese mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 20, pp. 7622-7629.
40. Varela L., Vazquez M.J., Cordido F., Nogueiras R., Vidal-Puig A., Dieguez C., López M. Ghrelin and lipid metabolism: key partners in energy balance. *J. Mol. Endocrinol.*, 2011, Vol. 46, no 2, pp. 43-63.
41. Williams R.L., Wood L.G., Collins C.E., Morgan P.J., Callister R. Energy homeostasis and appetite regulating hormones as predictors of weight loss in men and women. *Appetite*, 2016, Vol. 101, pp. 1-7.

Авторы:

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

Евстратова В.С. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии», Москва, Россия

Апратин С.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории метаболомного и протеомного анализа ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии», Москва, Россия

Гмошинский И.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии», Москва, Россия

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

Authors:

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

Evstratova V.S., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology, Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

Apryatyn S.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Proteomic and Genomic Analysis, Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

Gmoshinskiy I.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Food Toxicology and Nanotechnology Safety Evaluation, Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

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

Поступила 29.09.2017
Отправлена на доработку 10.10.2017
Принята к печати 16.10.2017

Received 29.09.2017
Revision received 10.10.2017
Accepted 16.10.2017

РОЛЬ TNF α /TNF-R1-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В РЕАЛИЗАЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРОТИВ ГЛИОБЛАСТОМНЫХ ЛИНИЙ

**Тыринова Т.В.¹, Мишинов С.В.², Леплина О.Ю.¹, Альшевская А.А.¹,
Курочкина Ю.Д.¹, Олейник Е.А.¹, Калиновский А.В.³,
Лопатникова Ю.А.¹, Чернов С.В.³, Ступак В.В.², Сенников С.В.¹,
Останин А.А.¹, Черных Е.Р.¹**

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

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

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

Резюме. Дендритные клетки (ДК) больных злокачественными глиомами головного мозга характеризуются нарушением экспрессии мембранной формы TNF α , что ассоциируется с угнетением цитотоксичности ДК против TNF-R1-экспрессирующей опухолевой линии Нер-2. Чтобы оценить клиническую значимость этого феномена, в настоящей работе исследовалась роль TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксической активности ДК против клеток глиобластомных линий, полученных из опухолевой ткани пациентов со злокачественными глиомами головного мозга. ДК генерировали путем культивирования прилипающей фракции МНК в присутствии GM-CSF и IFN α в течение 4 суток с последующим дозреванием с ЛПС в течение 24 ч (IFN-ДК). Опухолевые линии были получены из фрагментов опухоли 11 пациентов с внутримозговой глиобластомой. Показано, что клетки глиобластомных линий чувствительны к цитотоксическому действию IFN-ДК доноров. Выраженность цитотоксического эффекта IFN-ДК против глиобластомных линий, полученных от разных пациентов, варьировала от 20 до 72,2% и в культурах 8 из 11 линий превышала 40%. Клетки глиобластомных линий экспрессировали рецепторы TNF-R1 и TNF-R2, однако экспрессия TNF-R1 была выше. При этом растворимая форма rTNF α не обладала цитотоксическим действием на клетки глиобластомных линий. Блокирование TNF α /TNF-R1-сигнального пути путем обработки IFN-ДК доноров растворимым рецептором ghTNFR1 снижало цитотоксическую активность ДК против 5 из 6 тестируемых глиобластомных линий на 11-40% (медиана супрессии – 24%). ДК больных глиобластомой с дефектом TNF α /TNF-R1-сигнального пути лизировали клетки этих глиобластомных линий, однако медианный уровень цитотоксичности был на 30% ниже, чем аналогичный показатель у доноров (31,5 vs 45,1%; p = 0,003). В то же время цитотоксичность IFN-ДК больного глиобластомой против

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Т.В. Тыринова, С.В. Мишинов, О.Ю. Леплина,
А.А. Альшевская, Ю.Д. Курочкина, Е.А. Олейник,
А.В. Калиновский, Ю.А. Лопатникова, С.В. Чернов,
В.В. Ступак, С.В. Сенников, А.А. Останин, Е.Р. Черных
«Роль TNF/TNF-R1-сигнального пути в реализации
цитотоксического эффекта дендритных клеток против
глиобластомных линий» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 3. С. 353-364.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-353-364

© Тыринова Т.В. и соавт., 2018

For citation:

T.V. Tyrinova, S.V. Mishinov, O.Yu. Leplina, A.A. Alshevskaya,
Yu.D. Kurochkina, E.A. Oleynik, A.V. Kalinovskiy,
Yu.A. Lopatnikova, S.V. Chernov, V.V. Stupak, S.V. Sennikov,
A.A. Ostanin, E.R. Chernykh "Role of TNF/TNF-R1-signaling
pathway in cytotoxic activity of dendritic cells against glioblastoma
cell lines", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 353-364.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-353-364

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-353-364

аутологичных опухолевых клеток единственной линии, резистентной к TNF α /TNF-R1-зависимому пути, была сопоставима с уровнем цитотоксической активности ДК доноров. Таким образом, опухолевые клетки глиобластомных линий чувствительны к цитотоксическому эффекту ДК, опосредованному через TNF α /TNF-R1-сигнальный путь, и дефектность данного механизма у больных детерминирует значимое снижение цитотоксической активности ДК против глиобластомных клеток.

Ключевые слова: дендритные клетки, интерферон-альфа, фактор некроза опухоли альфа, TNF-R1, глиобластома

ROLE OF TNF α /TNF-R1-SIGNALING PATHWAY IN CYTOTOXIC ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS AGAINST GLIOBLASTOMA CELL LINES

Tyrinova T.V.^a, Mishinov S.V.^b, Leplina O.Yu.^a, Alshevskaya A.A.^a, Kurochkina Yu.D.^a, Oleynik E.A.^a, Kalinovskiy A.V.^c, Lopatnikova Yu.A.^a, Chernov S.V.^c, Stupak V.V.^b, Sennikov S.V.^a, Ostanin A.A.^a, Chernykh E.R.^a

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

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

^c Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Dendritic cells (DCs) of patients with high-grade brain glioma exhibit impaired expression of membrane TNF α associated with low DC cytotoxicity against TNF-R1-expressing tumor cell line HEP-2. To assess the significance of these findings, we investigated a role of TNF α /TNF-R1-signaling pathway in DC cytotoxic activity against allogenic and autologous cell lines obtained from high-grade glioma tissues. DCs were generated by culturing of plastic-adherent peripheral blood mononuclear cells in presence of GM-CSF and IFN α for 4 d followed by LPS addition for 24 h (IFN-DCs). The tumor cell lines were obtained from tissues of 11 patients with glioblastoma multiforme. According our findings glioblastoma cells were sensitive to lysis mediated by donor IFN-DCs. The level of DC cytotoxic effect against cell lines obtained from different glioma patient tissues varied from 20 to 72.2%. DC lysis of 8 out of 11 glioblastoma cell lines exceeded 40%. Glioblastoma cell lines expressed both TNF-R1 and TNF-R2 receptors, but mostly – TNF-R1. However, rTNF α did not show cytotoxic activity towards glioblastoma cell lines. Blocking of TNF α /TNF-R1-signaling pathway by treating of donor IFN-DCs with soluble rhTNFR1 receptor led to partial decrease of DC cytotoxic activity against 5 out of 6 tested glioblastoma cell lines by 11-40% (median of suppression 24%). Glioblastoma patient IFN-DCs which were characterized by an impairment of TNF α /TNF-R1-signaling pathway lysed these glioblastoma cell lines, however median of DC cytotoxicity was 30% lower than that of donor values (31.5 vs 45.1%; $p = 0.003$). Cytotoxic activity of IFN-DCs of the glioblastoma patient against autologous tumor cells resistance to TNF α /TNF-R1-signaling pathway was comparable with level of cytotoxicity of donor IFN-DCs. Thus, glioblastoma cells are sensitive to cytotoxic activity of DCs mediated via TNF α /TNF-R1-signaling pathway, but the defect of this mechanism in IFN-DCs of glioblastoma patients determines significant decrease of DC cytotoxicity towards glioblastoma cells.

Keywords: dendritic cells, interferon-alpha, tumor necrosis factor alpha, TNF-R1, glioblastoma multiforme

Проведенное исследование поддержано грантом Президента Российской Федерации в конкурсе государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-7611.2016.7) и грантом РФФИ № 14-04-00446-а.

Введение

Дендритные клетки (ДК), наряду с запуском иммунного ответа против различных антигенов,

в том числе и опухолевых, способны проявлять свойства эффекторных клеток и напрямую индуцировать гибель опухолевых клеток [11, 22]. Противоопухолевая цитотоксическая активность ДК реализуется с вовлечением рецептор-опосредованного и грануло-зависимого механизмов, которые типичны для всех цитотоксических клеток (NK-клеток, цитотоксических CD8⁺T-лимфоцитов) [14, 20].

Согласно данным литературы, индукторами цитотоксической активности ДК являются интерфероны I типа (IFN I) [7, 15]. Проведенные нами ранее исследования показали, что ДК здоровых доноров, генерируемые в культуре *in vitro* в присутствии IFN α (IFN-ДК), экспрессируют широкий спектр цитотоксических медиаторов (TNF α , TRAIL, FasL, перфорин, гранзим Б) и обладают дозозависимой цитотоксической активностью против TRAIL-, FasL- и TNF α -чувствительных опухолевых линий [21].

В отличие от ДК здоровых доноров, IFN-ДК больных внутримозговыми глиальными опухолями высокой степени злокачественности характеризуются низким уровнем экспрессии гена TNF α , а также высокой активностью TNF α -конвертирующего фермента, участвующего в превращении мембранной формы TNF α (mTNF α) в растворимую форму TNF α (sTNF α) [1]. Выявленные изменения ассоциируются с низким уровнем экспрессии mTNF α на ДК и угнетением цитотоксичности ДК больных против опухолевой линии HEP-2. Поскольку ведущую роль в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против мишеней HEP-2 играет TNF α /TNF-R1-сигнальный путь [21], слабая цитотоксическая активность ДК свидетельствует о нарушении данного механизма цитотоксичности ДК у больных злокачественными глиомами. Учитывая эти факты, важным представляется вопрос, может ли обнаруженный дефект цитотоксической функции IFN-ДК больных глиомами снижать эффективность лизиса аутологичных опухолевых клеток.

Предварительные данные демонстрируют, что в ряде случаев IFN-ДК больных злокачественными глиомами характеризуются почти полным отсутствием цитотоксической активности против глиобластных клеток, полученных непосредственно из ткани опухоли [21]. IFN-ДК доноров, напротив, способны проявлять выраженный цитотоксический эффект против первичных глиобластных культур. Однако действительно ли обнаруженный феномен связан с дефектом TNF α -опосредованного сигнального пути, остается неясным.

В связи с этим **целью настоящей работы** явилось изучение роли TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против аллогенных и аутологичных клеточных линий, полученных из фрагментов опухоли пациентов с злокачественными глиомами головного мозга.

Материалы и методы

В исследование были включены 30 здоровых доноров, 11 больных опухолями головного мозга с гистологически верифицированной глио-

бластомой (Grade IV). Обследование всех пациентов проводилось при наличии письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина. ДК получали путем культивирования прилипающей фракции МНК в 6-луночных планшетах (Nunclon, Дания) в течение 3-4 суток в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, Биолот, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN α (1000 ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим дозреванием в течение 24 ч с липополисахаридом (10 мкг/мл, LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich).

Культуры глиобластных клеток были получены путем механической и последующей ферментативной (0,3% коллагеназы I, Sigma-Aldrich) дезагрегации фрагмента ткани опухоли, полученной хирургическим путем от 11 пациентов с гистологически верифицированной глиобластомой (Grade IV), проходивших обследование и лечение в отделении нейрохирургии Новосибирского НИИТО и Федеральном нейрохирургическом центре. Исследования проводили после получения письменного информированного согласия больных.

Полученную суспензию клеток в виде адгезивного монослоя культивировали при 37 °С и 5% CO₂ в среде DMEM/F-12 (Gibco, UK), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 10⁻⁴М меркаптэтанол, 100 мкг/мл гентамицина и 10% FCS, обновляя питательную среду два раза в неделю. Пассирование клеток осуществлялось при достижении субконфлюэнтного роста адгезивных клеток посредством 0,25% трипсина (Sigma-Aldrich) и 0,02% ЭДТА (ICN, США). Количество пассажей для клеточных линий варьировало от 3 до 15.

Цитотоксическая активность ДК оценивалась против полученных глиобластных клеточных линий с помощью МТТ-теста в течение 24 часов в соотношении «эффектор:мишень» 1:1. Для изучения роли TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксической активности ДК в отдельных экспериментах IFN-ДК доноров предварительно инкубировали в течение 60 мин с химерной молекулой rhTNFR1/TNFRSF1A Fc chimera (10 мкг/мл; R&D Systems, США).

Расчет цитотоксической активности проводился по стандартной формуле:

$$(\%) = [1 - (\text{ОПэ} + \text{м} - \text{ОПм}) / \text{ОПм}] \times 100\%$$

где ОПэ+м – значение оптической плотности в опытных сериях; ОПэ – значение оптической плотности в лунках с эффекторами; ОПм – значе-

ние оптической плотности в лунках с мишенями. Оптическая плотность измерялась при длине волны 492 нм на мультилуночном спектрофотометре (Thermo Scientific Multiskan FC, Финляндия).

Оценку экспрессии рецепторов TNF-R1 и TNF-R2 на глиобластомных клетках проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) с использованием APC- или PE-меченых моноклональных анти-TNF-R1 и -TNF-R2 антител (BD PharMingen, США).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Данные представлены в виде среднего арифметического значения (m) и стандартной ошибки среднего (SE), а также в виде медианы (Me) и диапазона 25-75% квартильных значений ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона—Манна—Уитни. Для анализа взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

В качестве модели для изучения цитотоксического потенциала IFN-ДК нами были использованы клеточные линии, полученные из первичных культур опухолевых клеток (рис. 1). Несмотря на то что в первичных культурах сохраняются специфические свойства самой опухоли и присущие ей клеточные взаимодействия, пролиферация опухолевых клеток в таких культурах снижена, что влияет на воспроизводимость результатов и ограничивает возможность проведения различ-

ных исследований. Генерация клеточных линий из первичных культур позволила нам увеличить количество опухолевых клеток после нескольких пассажей, а также получить морфологически однородные клеточные популяции.

Как видно из рисунка 2, все тестируемые глиобластомные линии были чувствительны к цитотоксическому действию IFN-ДК здоровых доноров. В зависимости от клеточной линии значения цитотоксичности IFN-ДК варьировали от 20 до 72,2%, что может свидетельствовать о разной степени чувствительности глиобластомных линий, полученных от различных пациентов. Тем не менее в большинстве случаев ДК доноров обладали выраженной способностью лизировать глиобластомные клетки. Уровень цитотоксичности IFN-ДК против 8 из 11 опухолевых линий был выше 40%.

Прежде чем оценить роль TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против глиобластомных клеток, был проведен анализ экспрессии двух типов рецепторов к TNF α , TNF-R1 и TNF-R2, на клетках глиобластомных линий. Проведенные исследования показали, что оба типа рецепторов представлены на клетках опухолевых линий. Количество клеток, которые экспрессировали рецептор TNF-R1, участвующий в проведении сигнала к апоптозу [2], варьировало от 44 до 89% в зависимости от клеточной линии (Me 82%). В то же время рецептор TNF-R2, лишенный домена смерти (DD) и не обладающий проапоптогенной активностью [2], был представлен на глиобластомных клетках в меньшей степени (от 2 до 68%). Количество опухолевых клеток, экспрессирующих TNF-R2, среди всех анализируемых линий составляло 17,5% (Me). В качестве

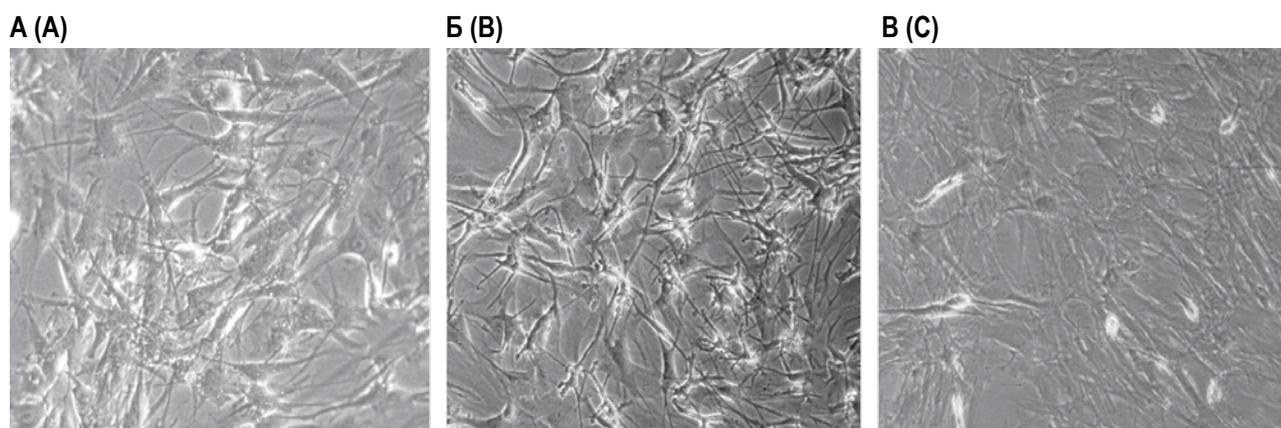


Рисунок 1. Клеточные линии, полученные из фрагментов опухоли пациентов с глиобластомами

Примечание. На рисунке представлены нативные препараты трех репрезентативных глиобластомных линий (увеличение $\times 250$) после 3-6 пассажа.

Figure 1. Cell lines obtained from tumor tissues of patients with glioblastoma multiforme

Note. The figures show representative phase contrast images ($\times 250$ magnification) of cell lines derived from three glioblastoma multiforme tissues after 3-6 passages.

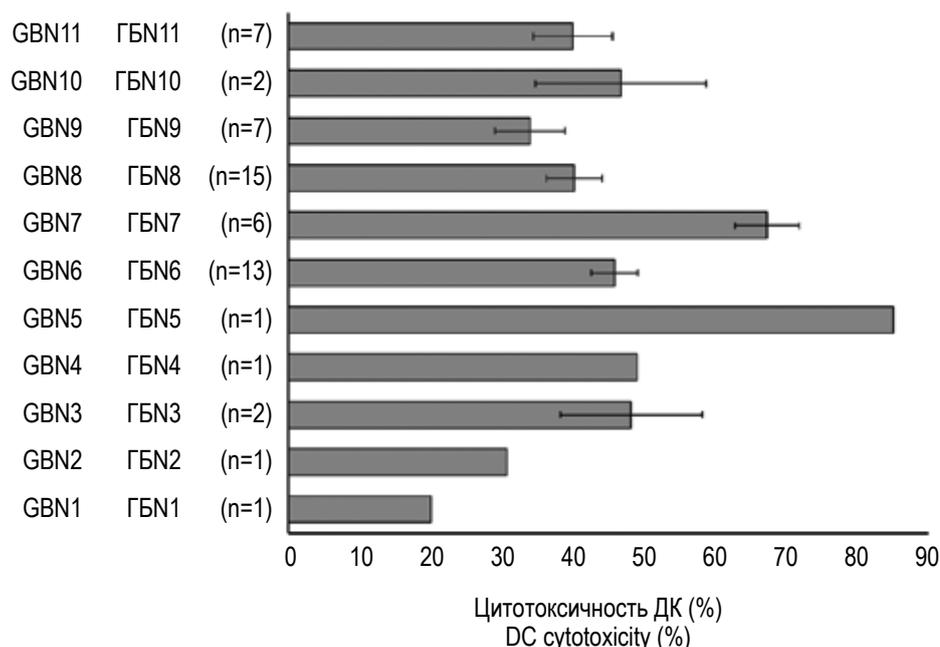


Рисунок 2. Цитотоксическая активность IFN-ДК доноров против клеточных линий, полученных из опухоли пациентов с глиобластомами

Примечание. Данные представлены в виде средних значений и ошибки среднего ($M \pm SE$) или индивидуальных значений (для линий ГБН1, ГБН2, ГБН4) цитотоксической активности ЛПС-стимулированных IFN-ДК здоровых доноров против глиобластомных культур (ГБ). Цитотоксическую активность оценивали с помощью МТТ-теста при соотношении «эффекторы (ДК): мишени (опухолевые клетки)» – 1:1.

Figure 2. Cytotoxic activity of donor IFN-DCs against cell lines obtained from glioblastoma multiforme tissues

Note. Data of cytotoxic activity of healthy donor's LPS-stimulated IFN-DCs against glioblastoma cell lines (GB) are presented as mean ($M \pm SE$) or individual values (for GBN1, GBN2, GBN4). Cytotoxic activity was determined using MTT-assay at a ratio of effectors (DCs):targets (tumor cells) as 1:1.

примера на рисунке 3 приведены индивидуальные значения распределения (дот-плот) экспрессии TNF-R1 и TNF-R2 на поверхности опухолевых клеток одной из анализируемых клеточных линий. Видно, что количество TNF-R1⁺ клеток существенно выше, чем TNF-R2⁺ клеток.

На следующем этапе было проведено исследование чувствительности глиобластомных линий к рекомбинантному TNF α человека (rTNF α). Как видно из рисунка 4, несмотря на высокую экспрессию рецепторов TNF-R на поверхности опухолевых клеток, rTNF α не оказывал цитотоксического эффекта на опухолевые линии при всех исследуемых концентрациях. Супернатанты IFN-ДК доноров (как источник нативного TNF α) обладали слабой или умеренной цитотоксической активностью против глиобластомных линий, медианный уровень которой составлял 9,8% при добавлении супернатантов в дозе 25% (v/v) (рис. 4). Эти данные позволили заключить, что для реализации цитотоксической активности IFN-ДК против глиобластомных линий необходимо контактное взаимодействие ДК с опухолевыми клетками. При этом умеренная цитотоксичность супернатантов ДК позволяет полагать,

что киллерная активность IFN-ДК против глиобластомных клеток-мишеней может опосредоваться с участием растворимых факторов, не связанных с TNF α .

Чтобы оценить вклад TNF α -зависимого сигнального пути в опосредование цитотоксической активности ДК против глиобластомных клеток, IFN-ДК доноров предварительно инкубировали с растворимым рецептором rhTNFR1. Такой подход позволил нейтрализовать действие мембранной формы TNF α , экспрессируемой на ДК, и заблокировать TNF α /TNF-R1-сигнальный путь в клетках-мишенях. Исследование было проведено на 6 глиобластомных линиях, чувствительных к цитотоксическому действию IFN-ДК доноров (ГБН6, ГБН7, ГБН8, ГБН9, ГБН10, ГБН11; рис. 5). Блокирующий эффект rhTNFR1 на цитотоксичность ДК отмечался против пяти из шести тестируемых глиобластомных линий. Обработка IFN-ДК молекулой rhTNFR1 снижала цитотоксическую активность ДК против чувствительных линий на 24,0 % (Me) (Me с 53 до 39%; $p = 0,0009$). При этом выраженность блокирующего эффекта rhTNFR1 в культурах различных глиобластомных линий варьировала, свидетельствуя об индиви-

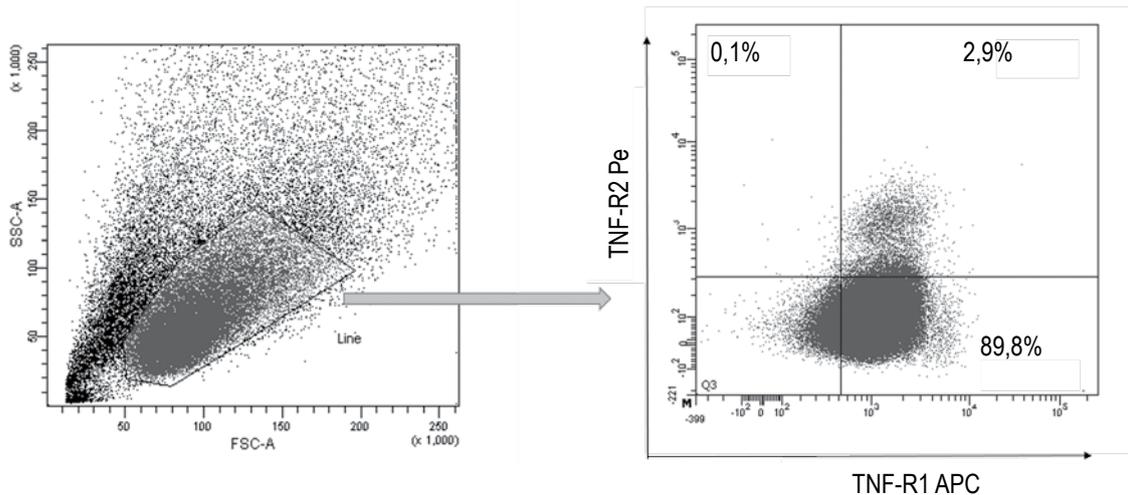


Рисунок 3. Экспрессия рецепторов TNF-R на глиобластомных клетках

Примечание. Представлена цитометрическая характеристика репрезентативной глиобластомной линии. На левом рисунке показана область гейтирования клеток глиобластомной линии, в которой определяли экспрессию на клетках рецепторов TNF-R. На правом рисунке представлены индивидуальные DotPlot гистограммы распределения опухолевых клеток по флуоресценции APC-меченых анти-TNF-R1 антител и PE-меченых анти-TNF-R2 антител. Левый верхний квадрант – TNF-R1⁻TNF-R2⁺ клетки, правый верхний квадрант – TNF-R1⁺TNF-R2⁺ клетки, правый нижний квадрант – TNF-R1⁺TNF-R2⁻ клетки.

Figure 3. TNF-R expression on glioblastoma cell lines

Note. Flow cytometric dot plots of representative glioblastoma cell line are presented. The left figure shows the gating region of glioblastoma cells to determine TNF-R expression. The dot plot on the right demonstrates co-staining of APC-conjugated anti-TNF-R1 monoclonal antibody and PE-conjugated anti-TNF-R2 monoclonal antibody on tumor cells. Upper left quadrant – TNF-R1⁻TNF-R2⁺ cells, upper right quadrant – TNF-R1⁺TNF-R2⁺ cells, lower right quadrant – TNF-R1⁺TNF-R2⁻ cells.

дуальных различиях в чувствительности опухолевых клеток к лизису, опосредованному через TNF α /TNF-R1-сигнальный путь. В одной из шести опухолевых линий (ГБН9) блокирующий эффект rhTNFR1 не выявлялся, т.е. опухолевые клетки были не чувствительны к TNF α /TNF-R1-опосредованной цитотоксичности IFN-ДК. При этом отсутствие корреляционной связи между экспрессией рецепторов к TNF α на опухолевых клетках и блокирующим эффектом rhTNFR1 ($R = 0,50$; $p = 0,6$ для TNFR1 и $R = 0,50$; $p = 0,67$ для TNFR2) свидетельствовало, что вариации в чувствительности опухолевых клеток к TNF α /TNF-R1-опосредованному лизису не связаны с особенностями экспрессии TNF-R. Таким образом, опухолевые клетки глиобластомных линий в большинстве случаев чувствительны к TNF α /TNF-R1-опосредованному цитотоксическому действию IFN-ДК, что подтверждается ослаблением цитотоксической активности ДК при блокировании данного пути. С другой стороны, только частичное подавление цитотоксической активности ДК (на 24%) при блокировании TNF α /TNF-R1-сигнального пути, а также отсутствие эффекта rhTNFR1 в культурах клеток одной из шести линий свидетельствуют о существовании TNF α -независимых механизмов цитотоксического действия IFN-ДК против глиобластомных клеток.

Поскольку IFN-ДК больных злокачественными глиомами характеризуются низкой экспрессией mTNF α и, как следствие, угнетением TNF α -опосредованной цитотоксичности против клеток HEp-2 [21], на следующем этапе было проанализировано, насколько сохранна киллерная активность IFN-ДК больных против собственных опухолевых клеток.

Цитотоксическая активность IFN-ДК больных против аутологических опухолевых клеток была на 30% (Me) ниже, чем цитотоксичность ДК доноров в аналогичных культурах (Me 31,5 vs 45,1%; $p = 0,003$). При этом степень снижения цитотоксической активности ДК больных была сопоставима с уровнем блокирующего эффекта (Δ блокирования) растворимого rhTNFR1 при добавлении последнего к ДК доноров. В то же время киллерная активность IFN-ДК больного, опухолевые клетки которого оказались не чувствительны к TNF α /TNF-R1-сигнальному пути (ГБН9), была сопоставима с уровнем цитотоксичности IFN-ДК доноров (табл. 1).

Таким образом, можно заключить, что цитотоксический эффект IFN-ДК против глиобластомных клеток реализуется с участием TNF α /TNF-R1-сигнального пути. Этот механизм обеспечивает почти четверть цитотоксического потенциала ДК (24%), но, по-видимому, не является основным. ДК больных глиобластомой обладают

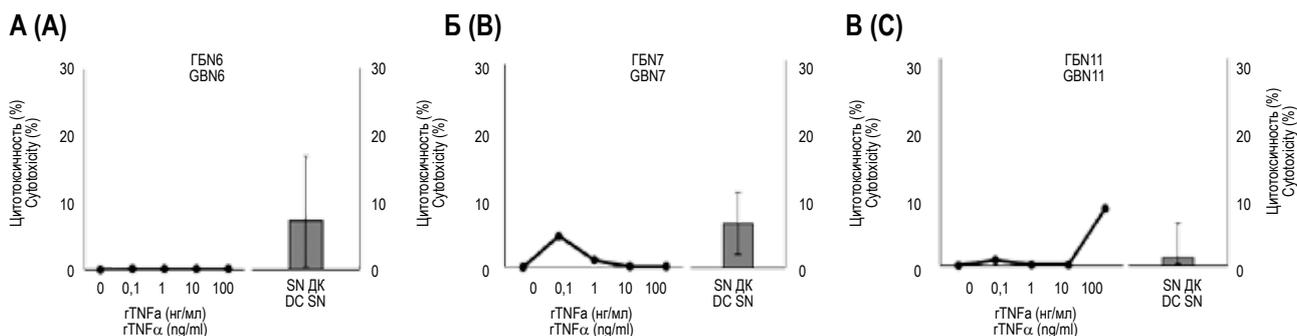


Рисунок 4. Чувствительность клеток глиобластомных линий к цитотоксическому действию растворимых факторов
Примечание. На рисунке представлены цитотоксическая активность rTNFα в указанных дозах (левые графики) и медианные (Me) и диапазон 25-75% квартильных значений ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) цитотоксической активности супернатантов (v/v 25%) IFN-ДК доноров (правые графики) против клеток трех репрезентативных глиобластомных линий ГБН6 (А), ГБН7 (Б), ГБН11 (В) в 24 ч МТТ-тесте.

Figure 4. Sensitivity of glioblastoma cell lines to cytotoxic activity of soluble factors

Note. The figure demonstrates cytotoxic activity of rTNFα at different doses (left graphics) and median (Me) and interquartile range ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) of cytotoxic activity of donor IFN-DC supernatants (v/v 25%) (right graphics) against cells of three representative glioblastoma lines GBN6 (A), GBN7 (B), GBN11 (C) in 24h MTT-assay.

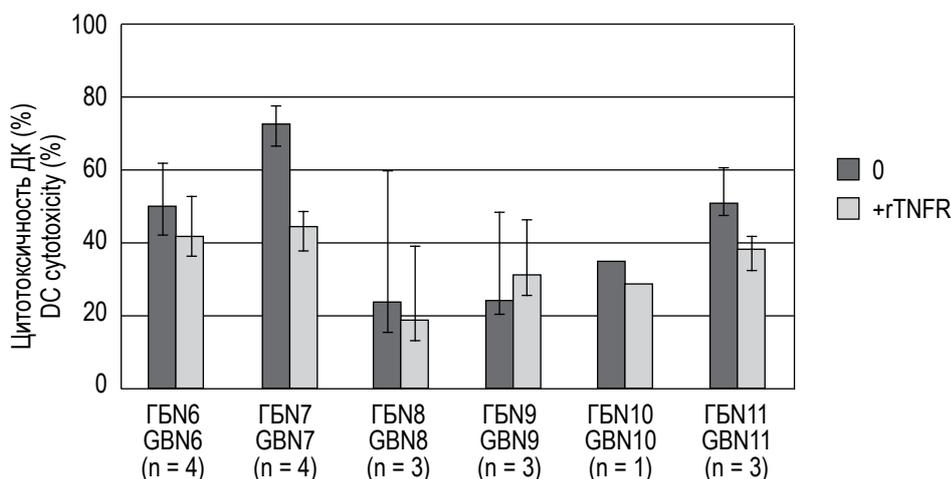


Рисунок 5. Влияние rhTNFR1 на цитотоксическую активность IFN-ДК доноров против клеточных линий, полученных из опухоли пациентов со злокачественными глиомами

Примечание. Данные представлены в виде медианных (Me) и диапазона 25-75% квартильных значений ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) (для линий ГБН6, ГБН7, ГБН8, ГБН9, ГБН11) и индивидуальных значений (для линии ГБН10) цитотоксической активности ЛПС-стимулированных IFN-ДК здоровых доноров против глиобластомных культур (ГБ) в 24 ч МТТ-тесте в соотношении «эфффекторы:мишени» 1:1. ДК предварительно инкубировали в течение 1 часа rhTNFR1:Fc (+rTNFR; 10 мкг/мл).

Figure 5. The effect of rhTNFR1 on cytotoxic activity of donor IFN-DCs against glioblastoma cell lines

Note. Data are presented as median (Me) and interquartile range ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) (for GBN6, GBN7, GBN8, GBN9, GBN11) or individual values (for GBN10) of cytotoxic activity of healthy donor LPS-stimulated IFN-DCs against glioblastoma cell lines (GB) in 24h MTT-assay at a ratio of effectors:targets as 1:1. IFN-DCs were pre-incubated for 1 h with rhTNFR1 (+rTNFR; 10 μg/ml) before co-culturing with tumor cells.

меньшей способностью лизировать опухолевые клетки, поскольку характеризуются нарушением экспрессии mTNFα на ДК и, соответственно, дефектом TNFα/TNF-R1-сигнального пути. Дефект TNFα/TNF-R1-сигнального пути не приводит к полному подавлению цитотоксической функции ДК больных против аутологичных опухолевых клеток, однако на треть ослабляет цитотоксическую активность ДК.

Обсуждение

Способность ДК к лизису опухолевых клеток имеет, по всей видимости, большое значение. Наряду с элиминацией опухолевых клеток, высвобождающиеся опухолевые антигены могут сразу же презентироваться Т-лимфоцитам и индуцировать противоопухолевый иммунный ответ в самом раннем периоде. Действительно, при многих ти-

ТАБЛИЦА 1. ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДК ПРОТИВ ГЛИОБЛАСТОМНЫХ КЛЕТОК

TABLE 1. CYTOTOXIC ACTIVITY OF DCs AGAINST GLIOBLASTOMA CELLS

Линия Cell line	ДК доноров Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) (%) Donor DCs	Аутологичные ДК больных (%) Autologous patient DCs (%)	Степень снижения цитотоксичности IFN-ДК больных (%) Impairment index of cytotoxicity of patient IFN-DCs (%)
ГБН6 GBN6	44,7 (41-52,7)	22,7	49,2
ГБН7 GBN7	68 (63,4-76,2)	46,6	31,5
ГБН8 GBN8	37,5 (30,5-50)	27,6	26,4
ГБН9 GBN9	29 (23-48,3)	32,7	0
ГБН10 GBN10	48,1 (34,8-58,7)	37,5	22
ГБН11 GBN11	43,6 (29,6-50,7)	27,8	36,2

Примечание. Представлены медианные (Me) и диапазон 25-75% квартильных (Q_{0,25}-Q_{0,75}) значений цитотоксической активности (%) IFN-ДК доноров и индивидуальные значения цитотоксической активности ДК больных против глиобластомных линий (ГБ). В крайнем правом столбце указана степень дефекта цитотоксичности ДК больных, рассчитанная по формуле:
[1 – (цитотоксичность ДК_{больной}/Me цитотоксичности ДК_{доноры})] × 100%.

Note. Median (Me) and interquartile range (Q_{0,25}-Q_{0,75}) of cytotoxic activity (%) of donor IFN-DCs and individual values of cytotoxic activity (%) of patient IFN-DCs against glioblastoma cell lines (GB) are presented. Meanings of impairment of patient IFN-DC cytotoxic activity towards glioblastoma cell lines are shown in right-hand column and calculated as:
[1 – (cytotoxicity of DC_{patient}/Me cytotoxicity of DC_{donor})] × 100%.

пах опухолей (аденокарцинома толстой кишки, легких, щитовидной железы, рак желудка) большее количество ДК в опухолевом микроокружении ассоциировано с более благоприятным прогнозом [3, 10, 18]. С другой стороны, снижение цитотоксической функции ДК может ассоциироваться с большей степенью злокачественности опухолевых клеток и худшим прогнозом. Так, согласно полученным нами ранее данным, больные глиобластомой (в отличие от пациентов с глиомами низкой степени злокачественности) характеризуются дефектом цитотоксической активности ДК против опухолевых клеток HEp-2, опосредованной через TNF α /TNF-R1-сигнальный путь [21]. Чтобы выяснить клиническую значимость этого феномена, настоящее исследование было сфокусировано на изучении чувствительности опухолевых клеток больных глиобластомой к цитотоксическому действию ДК и роли TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации лизиса глиобластомных клеток.

Полученные результаты продемонстрировали, что ДК доноров, генерированные в присутствии IFN α , лизировали клетки всех исследуемых пер-

вичных глиобластомных линий. В большинстве случаев IFN-ДК демонстрировали достаточно высокий уровень цитотоксичности (> 40%), хотя линии опухолевых клеток от разных пациентов различались по чувствительности к лизису, что могло быть связано с особенностями экспрессии проапоптогенных рецепторов (TNF-R, Fas, TRAIL-R и др.), участвующих в индукции гибели опухолевых клеток. Согласно данным литературы, клетки глиобластомы обладают низкой чувствительностью к NK-опосредованному лизису, поскольку несут на своей поверхности лиганды для ингибиторного рецептора NK-клеток, но слабо экспрессируют лиганды к активационным NK-рецепторам [8, 23, 24]. В то же время сведения о чувствительности глиобластомных клеток к лизису, опосредованному ДК, отсутствуют. С этой точки зрения нами впервые получены данные о чувствительности первичных опухолевых клеток при глиобластоме к цитотоксическому эффекту IFN-ДК.

Вторым важным заключением, следующим из результатов работы, является то, что цитотоксический эффект IFN-ДК против глиобластом-

ных клеток реализуется с вовлечением TNF α /TNF-R1-сигнального пути. На это указывают данные об экспрессии клетками глиобластомных линий рецепторов TNF-R1 и TNF-R2 (с явным преобладанием TNF-R1) и снижением цитотоксической активности IFN-ДК при блокировании мембранной формы TNF α на ДК растворимым рецептором rhTNFR1. Важно отметить, что для реализации цитотоксического эффекта через TNF α /TNF-R1-сигнальный путь необходим клеточный контакт, поскольку растворимая форма rTNF α не оказывала цитотоксического эффекта на глиобластомные клетки, а супернатанты IFN-ДК обладали умеренной цитотоксичностью, которая, по-видимому, была обусловлена действием других факторов.

В литературе имеются данные о высоком уровне экспрессии TNF-R1 и низком уровне или отсутствии TNF-R2 на клетках перевиваемых глиобластомных линий человека (SF-126, SF-188, U-138MG, LN235 и др.) [13]. В то же время полученные нами результаты впервые характеризуют экспрессию рецепторов к TNF α на клетках глиобластомных линий. Как известно, TNF α представляет собой плейотропный цитокин, способный, с одной стороны, индуцировать гибель опухолевых клеток, а с другой – поддерживать рост глиальных опухолей, стимулируя пролиферацию опухолевых клеток, их инвазию и метастазирование [4, 5], а также процесс ангиогенеза в опухоли [16]. По данным литературы, клетки глиобластомы устойчивы к цитотоксическому действию растворимой формы TNF α (sTNF α) [17], что согласуется с нашими данными. Резистентность глиобластомных клеток к sTNF α может быть связана с высокой TNF-R1-зависимой активностью транскрипционного фактора NF- κ B, обеспечивающего выживаемость и пролиферацию опухолевых клеток [17]. Кроме того, недавние исследования выявили изменение в опухолевых клетках больных глиобластомой соотношения CLIPR-59 и Sru-1 [6, 9], играющих ключевую роль в регуляции TNF α -опосредованного апоптоза. При этом снижение экспрессии CLIPR-59 (активатор каспаз) ассоциировалось с большей степенью злокачественности и меньшей выживаемостью больных [6].

Ранее нами было показано, что основную роль в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против TNF-R1-экспрессирующих опухолевых клеток линии HEP-2 играет мембранная форма TNF α (mTNF α), а не sTNF α [1]. В этом аспекте полученные в настоящем исследовании данные, во-первых, подтверждают резистентность глиобластомных клеток к цитотоксическо-

му действию sTNF α и, во-вторых, демонстрируют важную роль ДК в индукции гибели глиобластомных клеток за счет mTNF α . Схожие результаты о различиях в цитотоксической активности двух форм TNF α обнаружены Shi W и соавт., которые показали, что mTNF α обладает цитотоксичностью против опухолевых клеток, резистентных к sTNF α -медируемому апоптозу [19]. Данный эффект объясняется способностью mTNF α вызывать конформационные изменения рецептора, которые ведут к более эффективной активации проапоптогенных сигнальных путей [12].

Важно отметить, что блокирование mTNF α на ДК с помощью rhTNFR1 вызывало только 24% снижение цитотоксической активности ДК против клеток глиобластомных линий, означая, что, наряду с вовлечением TNF α /TNF-R1-сигнального пути, лизис дендритными клетками глиобластомных клеток опосредуется и другими механизмами.

Поскольку предыдущие исследования выявили дефектность цитотоксической активности IFN-ДК больных против клеток HEP-2, опосредованной через TNF α /TNF-R1-сигнальный путь [1, 21], представлялось важным оценить, будет ли данный дефект сказываться на цитотоксичности ДК против глиобластомных клеток. Результаты настоящего исследования показали, что IFN-ДК больных характеризовались сниженной цитотоксической активностью, причем степень снижения соответствовала выраженности блокирующего эффекта rhTNFR1, то есть той доле цитотоксического потенциала, который реализуется с вовлечением TNF α /TNF-R1-зависимого механизма.

Ранее нами было показано, что ДК больных глиобластомой характеризуются сниженной экспрессией mTNF α , и это является причиной дефекта цитотоксичности ДК против клеток линии HEP-2 [1]. Основываясь на этих фактах, можно заключить, что низкая экспрессия mTNF α на ДК больных имеет важное патогенетическое значение и уменьшает цитотоксический потенциал ДК против аутологичных опухолевых клеток. Дополнительным аргументом в пользу этого предположения является тот факт, что в редких случаях, когда опухолевые клетки оказываются резистентными к TNF α /TNF-R1-опосредованному лизису (глиобластомная линия пациента N9), ДК больных не отличаются по цитотоксической активности от ДК доноров.

В целом проведенное нами исследование демонстрирует, что IFN-ДК здоровых доноров обладают цитотоксическим действием в отношении глиобластомных клеток, уровень которого

варьирует в зависимости от чувствительности самих опухолевых культур, полученных от разных пациентов. В подавляющем большинстве случаев в реализацию лизиса глиобластомных клеток дендритными клетками вовлечен TNF α /TNF-R1-зависимый механизм, который обеспечивает существенный вклад в цитоток-

сический потенциал IFN-ДК. IFN-ДК больных злокачественными глиомами, характеризующиеся нарушением экспрессии mTNF α , способны лизировать аутологичные опухолевые клетки, однако эта функция ослаблена у них на 30%, что свидетельствует о важности TNF α -зависимого механизма цитотоксичности ДК.

Список литературы / References

1. Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Мишинов С.В., Тихонова М.А., Калиновский А.В., Чернов С.В., Долгова Е.В., Поттер Е.А., Богачев С.С., Ступак В.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Нарушение цитотоксической активности дендритных клеток у больных с опухолями головного мозга: механизмы и возможности коррекции // Иммунология, 2016. Т. 37, № 5. С. 246-252. [Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Mishinov S.V., Tikhonova M.A., Kalinovskiy A.V., Chernov S.V., Dolgova E.V., Potter E.A., Bogachev S.S., Stupak V.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. The impairment of cytotoxic activity of dendritic cells in glioma patients: mechanisms and approaches to correction. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 5, pp. 246-252. (In Russ.)]
2. Aggarwal B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 2003, Vol. 3, no. 9, pp. 745-756.
3. Bigotti G., Coli A., Castagnola G. Distribution of Langerhans cells and HLA class II molecules in prostatic carcinomas of different histopathological grade. *Prostate*, 1991, Vol. 19, pp. 73-87.
4. Cheng S.M., Xing B., Li J. C.B., Cheung B.K.W., Lau A.S.Y. Interferon- γ regulation of TNF α -induced matrix metalloproteinase 3 expression and migration of human glioma T98G cells. *The International Journal of Cancer*, 2007, Vol. 121, pp. 1190-1196.
5. Chuang M.-J., Sun K.-H., Tang S.-J., Deng M.-W., Wu Y.-H., Sung J.-S., Cha T.-L., Sun G.-H. Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Science*, 2008, Vol. 99, pp. 905-913.
6. Ding Z., Liu Y., Yao L., Wang D., Zhang J., Cui G., Yang X., Huang X., Liu F., Shen A. Spy1 induces deubiquitinating of RIP1 arrest and confers glioblastoma's resistance to tumor necrosis factor (TNF- α)-induced apoptosis through suppressing the association of CLIPR-59 and CYLD. *Cell Cycle*, 2015, Vol. 14, no. 13, pp. 2149-2159.
7. Fanger N.A., Maliszewski C.R., Schooley K., Griffith T.S. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *The Journal of Experimental Medicine*, 1999, Vol. 190, pp. 1155-1164.
8. Friese M.A., Platten M., Lutz S.Z., Naumann U., Aulwurm S., Bischof F., Buhring H. J., Dichgans J., Rammensee H.G., Steinle A., Weller M. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Research*, 2003, Vol. 63, pp. 8996-9006.
9. Fujikura D., Ito M., Chiba S., Harada T., Perez F., Reed J.C., Uede T., Miyazaki T. CLIPR-59 regulates TNF- α -induced apoptosis by controlling ubiquitination of RIP1. *Cell Death and Differentiation*, 2012, Vol. 3, e264. doi:10.1038/cddis.2012.3.
10. Hart D.N. Dendritic cells: unique leukocyte population which control the primary immune response. *Blood*, 1997, Vol. 90, pp. 3245-3287.
11. Janjic B.M., Lu G., Pimenov A., Whiteside T.L., Storkus W.J., Vujanovic N.L. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway. *The Journal of Immunology*, 2002, Vol. 168, pp. 1823-1830.
12. Jiang Y., Yu M., Hu X., Han L., Yang K., Ba H., Zhang Z., Yin B., Yang X.P., Li Z., Wang J. STAT1 mediates transmembrane TNF-alpha-induced formation of death-inducing signaling complex and apoptotic signaling via TNFR1. *Cell Death and Differentiation*, 2017, Vol. 24, no. 4, pp. 660-671.
13. Kato T., Sawamura Y., Tada M., Sakuma S., Sudo M., Abe H. p55 and p75 tumor necrosis factor receptor expression on human glioblastoma cells. *Neurologia Medico-Chirurgica (Tokyo)*, 1995, Vol. 35, no. 8, pp. 567-574.
14. Korthals M., Safaian N., Kronenwett R., Maihöfer D., Schott M., Papewalis C., Diaz Blanco E., Winter M., Czibere A., Haas R., Kobbe G., Fenk R. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN-alpha acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *Journal of Translational Medicine*, 2007, Vol. 5, p. 46.
15. Liu Sh., Yu Y., Zhang M., Wang W., Cao X. The involvement of TNF- α -related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN- β -stimulated human dendritic cells to tumor cells. *The Journal of Immunology*, 2001, Vol. 166, no. 9, pp. 5407-5415.

16. Nabors L.B., Suswam E., Huang Y., Yang X., Johnson M.J., King P.H. Tumor necrosis factor α induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells. *Cancer Research*, 2003, Vol. 63, no. 14, pp. 4181-4187.
17. Sakuma S., Sawamura Y., Tada M., Aida T., Abe H., Suzuki K., Taniguti N. Responses of human glioblastoma cells to human natural tumor necrosis factor- α ; susceptibility, mechanism of resistance and cytokine production studies. *The Journal of Neuro-Oncology*, 1993, Vol. 15, pp. 197-208.
18. Schroder S., Schwarz W., Rehpennig W., Loning T., Bocker W. Dendritic/Langerhans cells and prognosis in patients with papillary carcinoma. Immunohistochemical study of 106 thyroid neoplasm correlated to follow up data. *American Journal of Clinical Pathology*, 1988, Vol. 99, pp. 295-300.
19. Shi W., Li Z.Y., Gong F.L., Xiong P., Xu Y. Comparison of the cytotoxic effect induced by transmembrane and secreted TNF- α . *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 1998, Vol. 18, pp. 499-504
20. Sary G., Bangert C., Tauber M., Strohal R., Kopp T., Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007, Vol. 204, pp. 1441-1451.
21. Tyrinova T.V., Leplina O.Y., Mishinov S.V., Tikhonova M.A., Shevela E.Y., Stupak V.V., Pendyurin I.V., Shilov A.G., Alyamkina E.A., Rubtsova N.V., Bogachev S.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Cytotoxic activity of ex-vivo generated IFN α -induced monocyte-derived dendritic cells in brain glioma patients. *Cell Immunology*, 2013, Vol. 284, pp. 146-153.
22. Vanderheyde N., Vandenabeele P., Goldman M., Willems F. Distinct mechanisms are involved in tumoristatic and tumoricidal activities of monocyte-derived dendritic cells. *Immunology Letters*, 2004, Vol. 91, no. 2-3, pp. 99-101.
23. Wischhusen J., Friese M.A., Mittelbronn M., Meyermann R., Weller M. HLA-E protects glioma cells from NKG2D-mediated immune responses *in vitro*: implications for immune escape *in vivo*. *The Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 2005, Vol. 64, pp. 523-528.
24. Wu A., Wiesner S., Xiao J., Ericson K., Chen W., Hall W. A., Low W. C., Ohlfest J. R. Expression of MHC I and NK ligands on human CD133 glioma cells: possible targets of immunotherapy. *The Journal of Neuro-Oncology*, 2007, Vol. 83, pp. 121-131.

Авторы:

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

Мишинов С.В. — к.м.н., врач-нейрохирург отделения нейрохирургии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии имени Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

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

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

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

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

Калиновский А.В. — к.м.н., заведующий операционным блоком ФГБНУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Authors:

Tyrinova T.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Mishinov S.V., PhD (Medicine), Clinical Neurosurgeon, Neurosurgery Department, Novosibirsk Research Ya.L. Tsviyann Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

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

Alshevskaya A.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kurochkina Yu.D., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Kalinovskiy A.V., PhD (Medicine), Head, Surgical Unit, Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russian Federation

Лопатникова Ю.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Чернов С.В. — к.м.н., заведующий отделением нейроонкологии ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Ступак В.В. — д.м.н., профессор, заведующий отделением нейрохирургии ФГБУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии имени Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

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

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

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

Lopatnikova Yu.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chernov S.V., PhD (Medicine), Head, Neurooncology Department, Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russian Federation

Stupak V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Neurosurgery Department, Novosibirsk Research Ya.L. Tsivyan Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

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

Поступила 09.10.2017
Принята к печати 20.10.2017

Received 09.10.2017
Accepted 20.10.2017

ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ ПРИ ОККЛЮЗИИ ВЕН СЕТЧАТКИ НА ФОНЕ АНТИАНГИОГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Дроздова Е.А., Хохлова Д.Ю., Мезенцева Е.А., Никушкина К.В.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. В статье представлены результаты исследования системного и локального уровня цитокинов при окклюзии вен сетчатки на фоне антиангиогенной терапии. Изучение их содержания проводилось в общей группе пациентов, а также в зависимости от типа ретинальной венозной окклюзии до и после интравитреального введения ранибизумаба. Было обследовано 32 пациента с окклюзией вен сетчатки. Проведено стандартное офтальмологическое обследование, спектральная оптическая когерентная томография, флюоресцентная ангиография для установления типа ретинальной венозной окклюзии. Определение концентрации фактора роста эндотелия сосудов, эндотелина-1, интерлейкина-1, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли- α в сыворотке крови и слезной жидкости было выполнено методом иммуноферментного анализа до начала терапии и через 3 месяца регулярных инъекций ранибизумаба. Проведена статистическая обработка полученных данных. В результате исследования получено, что у пациентов с окклюзией вен сетчатки вне зависимости от типа окклюзии наблюдается достоверное повышение уровня фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови и слезе по сравнению с контрольными значениями. Кроме того, выявлена положительная корреляционная зависимость уровня фактора роста эндотелия сосудов в слезе и интерлейкина-1, интерлейкина-6 и эндотелина-1 в слезной жидкости, а также с концентрацией фактора роста эндотелия сосудов и эндотелина-1 в сыворотке крови. В ходе проводимого исследования установлено, что окклюзия вен сетчатки сопровождается повышением содержания эндотелина-1 в слезе и сыворотке крови, а также интерлейкинов и фактора некроза опухоли- α в слезной жидкости с максимальными значениями некоторых факторов при ишемическом типе ретинальной венозной окклюзии. На фоне антиангиогенной терапии у пациентов с неишемическим типом окклюзии выявлено достоверное снижение уровня фактора роста эндотелия сосудов, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли- α в сыворотке крови, в слезе – фактора роста и интерлейкина-1. У пациентов с ишемическим типом окклюзии была зарегистрирована статистически значимая разница концентраций фактора роста эндотелия сосудов и интерлейкина-6 в слезе и сывороточных эндотелина-1 и интерлейкина-1. Таким образом, в результате исследования определено некоторое значение исследуемых интерлейкинов, фактора некроза опухоли- α , фактора роста эндотелия сосудов и эндотелина-1 в иммунопатогенезе окклюзии вен сетчатки.

Ключевые слова: окклюзия вен сетчатки, фактор роста эндотелия сосудов, интерлейкин, интерлейкин-6, фактор некроза опухоли альфа, эндотелин-1, ранибизумаб

Адрес для переписки:

Хохлова Дарья Юрьевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454119, Россия, г. Челябинск, ул. Якутская, 13-68.
Тел.: 8 (922) 635-89-10.
E-mail: dar.yu@mail.ru

Address for correspondence:

Khokhlova Daria Yu.
South Ural State Medical University
454119, Russian Federation, Chelyabinsk,
Yakutskaya str., 13, apt 68.
Phone: 7 (922) 635-89-10.
E-mail: dar.yu@mail.ru

Образец цитирования:

Е.А. Дроздова, Д.Ю. Хохлова, Е.А. Мезенцева,
К.В. Никушкина «Исследование системного и локального
уровня цитокинов при окклюзии вен сетчатки на фоне
антиангиогенной терапии» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 3. С. 365–372.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-365-372

© Дроздова Е.А. и соавт., 2018

For citation:

E.A. Drozdova, D.Yu. Khokhlova, E.A. Mezentseva,
K.V. Nikushkina “Studies of systemic and local cytokine level in
retinal vein occlusion associated with antiangiogenic therapy”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2018, Vol. 20, no. 3, pp. 365–372.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-365-372

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-365-372

STUDIES OF SYSTEMIC AND LOCAL CYTOKINE LEVEL IN RETINAL VEIN OCCLUSION ASSOCIATED WITH ANTIANGIOGENIC THERAPY

Drozdova E.A., Khokhlova D.Yu., Mezentseva E.A., Nikushkina K.V.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The paper presents results of studying systemic and local level of cytokines in retinal vein occlusion following antiangiogenic therapy. The study of cytokine concentrations was conducted in the general group of patients, and depended on the type of retinal vein occlusion before and after intravitreal injections of Ranibizumab. We examined thirty-two patients with retinal vein occlusion. We performed standard ophthalmological examinations, spectral optical coherence tomography, fluorescent angiography in order to establish the type of retinal vein occlusion. We determined concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF), endothelin-1, interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in serum and tears by enzyme immunoassay before treatment, and 3 months after regular injections of Ranibizumab. The obtained data prove that all the patients with retinal vein occlusion had significantly increased VEGF levels in blood serum and tear fluid compared to the control group. We have revealed a positive correlation between levels of VEGF in tear fluid, and interleukin-1, interleukin-6 and endothelin-1 in the tears, as well as with VEGF concentrations and endothelin-1 in serum. We have found an increase of endothelin-1 in tear and serum, along with interleukins and tumor necrosis factor- α in tear fluid, with maximal concentrations of some factors in ischemic type of retinal vein occlusion. Following antiangiogenic therapy in patients with non-ischemic type, there was a significant decrease in VEGF level, interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in the serum, vascular endothelial growth factor and interleukin-1 in tears. In patients with ischemic type, a significant decrease in VEGF and interleukin-6 concentrations in tears, endothelin-1 and interleukin-1 in blood serum. Thus, our research showed the role of interleukins, tumor necrosis factor- α , vascular endothelial growth factor and endothelin-1 in pathogenesis of retinal vein occlusion.

Keywords: retinal vein occlusion, vascular endothelial growth factor, interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor- α , endothelin-1, ranibizumab

Введение

Окклюзия вен сетчатки – острая сосудистая патология органа зрения, основными клиническими симптомами которой являются отек, геморрагии и различная степень гипоксии сетчатки [18]. Изменение гемодинамики и гемореологии в поврежденном сосуде приводит к нарушению функции эндотелия с последующим повышением экспрессии молекул адгезии и роллингу лейкоцитов, что индуцирует дальнейшую потерю эндотелиальных клеток, повреждение гематоретинального барьера и выход элементов крови за пределы сосуда [23]. Скопление на поверхности сетчатки активированных макрофагов и других клеток приводит к продукции цитокинов, факторов роста, которые участвуют в повышении проницаемости капилляров и развитии воспалительной реакции в ткани сетчатки [22]. Одним из клинических проявлений этого процесса является макулярный отек сетчатки [1, 3, 17, 31].

В ответ на развивающуюся вследствие ретинальной венозной окклюзии гипоксию сетчатки клетками эндотелия, макрофагами синтезируется фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A), который посредством связи со специфическими тирозинкиназными рецепторами запускает

цепочку патологических реакций, приводящих к повышению проницаемости сосудов и ангиогенезу [24, 25]. Исследования, посвященные изучению уровня VEGF-A при окклюзии вен сетчатки, установили значительное превышение его концентрации при данном заболевании в сравнении с группой контроля, а также прямую корреляционную связь уровня VEGF-A от давления и концентрации кислорода в окружающих тканях [10, 13, 19, 28]. Однако недостаточно изученной остается зависимость концентрации VEGF-A от типа ретинальной венозной окклюзии и динамика на фоне специфической терапии.

Известно, что развивающаяся на фоне окклюзии вен сетчатки дисфункция эндотелия сопровождается повышением продукции сосудосуживающих факторов, в частности эндотелина-1 (ET-1) и некоторых цитокинов [26]. Иммунохимические исследования выявили повышение содержания интерлейкина-6 (IL-6) в жидких средах глаза у пациентов с окклюзией вен сетчатки с прямой корреляцией от площади поражения [10, 13, 27]. Однако неясна зависимость концентрации IL-6 от степени гипоксии сетчатки и динамика на фоне проводимого лечения. Недостаточно изученным остается значение других провоспалительных цитокинов и вазоактив-

ных факторов, таких как интерлейкин-1 (IL-1), фактор некроза опухоли- α (TNF α), ET-1 в патогенезе ретиальной венозной окклюзии. Учитывая известные из литературы значимые эффекты данных веществ, изучение их влияния на особенности течения окклюзии вен сетчатки является актуальным для исследования.

На сегодняшний день основным методом лечения, применяемым при окклюзии вен сетчатки, является антиангиогенная терапия в виде ежемесячных инъекций ингибиторов ангиогенеза в стекловидное тело. Одним из таких препаратов, чья клиническая эффективность была доказана многоцентровыми рандомизированными клиническими испытаниями, был ранибизумаб [8, 9]. Однако недостаточно изученной остается динамика концентрации цитокинов, ET-1 и VEGF-A на фоне указанной терапии.

Исходя из вышеизложенного, **целью исследования** было определить уровень VEGF-A, ET-1, IL-1, IL-6 и TNF α в сыворотке крови и слезной жидкости при окклюзии вен сетчатки в зависимости от типа окклюзии и их динамику на фоне интравитреального введения ранибизумаба.

Материалы и методы

В проспективное нерандомизированное исследование было включено 32 пациента с окклюзией вен сетчатки, проходивших обследование и лечение на клинической базе кафедры глазных болезней Южно-Уральского государственного медицинского университета в офтальмологическом отделении областной клинической больницы №3 г. Челябинска в период с 2015 по 2016 год. Женщин – 21 (66%), мужчин – 11 (34%), средний возраст – 58,9 \pm 9,3 лет. Окклюзия центральной вены сетчатки (ЦВС) диагностирована у 14 (44%) пациентов, окклюзия ветвей ЦВС – у 18 (56%).

Всем пациентам проведено стандартное офтальмологическое обследование, спектральная оптическая когерентная томография – RTVue 100/CA (Optovue Inc., США). На основании результатов флюоресцентной ангиографии (TRC NW8F plus, Topcon, Япония), с учетом площади отсутствия капиллярной перфузии, ишемический тип был выявлен у 16 (50%), ишемический тип – у 16 (50%) пациентов.

Интравитреальное введение ранибизумаба (Lucentis, Novartis Pharma) осуществлялось в ранние сроки от начала заболевания по стандартной методике в дозе 0,5 мг № 3 ежемесячно, далее по потребности.

Исследование содержания VEGF-A (eBioscience, США), ET-1 (Biomedica, Австрия), IL-1, IL-6, TNF α (Вектор-Бест, Россия) в сыворотке крови и слезной жидкости проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) на автоматическом ИФА-анализаторе Personal Lab. (Adaltis, Italy) в лаборатории НИИ Иммунологии ФГБОУ

ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск, до начала терапии и через 3 месяца регулярных инъекций ранибизумаба. Группу контроля составили условно здоровые добровольцы в возрасте 50-70 лет, без признаков острых и обострения хронических заболеваний, с нормальным уровнем артериального давления, при отсутствии сахарного диабета и ишемических заболеваний сердца и сосудов.

Критерии включения в исследование: давность заболевания не более 1 месяца. Критерии исключения из исследования: дегенеративные и воспалительные заболевания органа зрения. Все пациенты предоставили добровольное информированное согласие на проведение исследования и лечение в письменной форме. Исследование было одобрено этическим комитетом ЮУГМУ.

Анализ результатов проводился с использованием статистического пакета программ IBM SPSS Statistics v 20.0 с вычислением средних значений, стандартных отклонений и определением коэффициента корреляции Пирсона. Для сравнения данных между независимыми выборками использовался критерий Манна–Уитни, для определения достоверности полученных результатов до и после лечения – критерий Вилкоксона. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Для определения значения исследуемых цитокинов, фактора роста и эндотелина-1 в иммунопатогенезе окклюзии вен сетчатки был проведен анализ их концентрации на системном и локальном уровне. Изучение их содержания проводилось в общей группе пациентов, а также в зависимости от типа ретиальной венозной окклюзии до и после проведения антиангиогенной терапии. Концентрация указанных веществ в сыворотке крови представлена в таблице 1.

Как следует из данных таблицы, уровень ET-1 практически в 5 раз превышал контрольные значения в общей группе пациентов ($p = 0,009$) и в 9 раз – при ишемическом типе окклюзии ($p = 0,009$). При сравнительном анализе содержания ET-1 в исследуемых группах выявлено статистически значимое его превышение в сыворотке крови пациентов с ишемическим типом окклюзии ($p = 0,006$).

Кроме того, было определено, что концентрация VEGF-A у всех пациентов вне зависимости от типа окклюзии достоверно превышала уровень VEGF-A в контрольной группе ($p < 0,05$) с максимальными значениями при ишемическом типе ($p = 0,018$).

Максимальная концентрация IL-1, IL-6 и TNF α в сыворотке крови также была определена при ишемическом типе окклюзии, однако статисти-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ НА ФОНЕ ИНТРАВИТРЕАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ РАНИБИЗУМАБА

TABLE 1. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN BLOOD SERUM ASSOCIATED WITH INTRAVITREAL INJECTIONS OF RANIBIZUMAB

Группы обследования Survey groups	Сроки обследования The timing of the survey	ЕТ-1, фмоль/мл fmol/ml	VEGF-A, пг/мл pg/ml	IL-1, пг/мл pg/ml	IL-6, пг/мл pg/ml	TNF α , пг/мл pg/ml
Общая группа General group (n = 32)	До лечения Before treatment	2,0 \pm 0,6*	714,6 \pm 46,1*	18,5 \pm 8,7	24,4 \pm 15,5	4,6 \pm 1,0
	После After therapy	0,4 \pm 0,03***	517,2 \pm 81,6***	5,8 \pm 2,6***	6,6 \pm 2,3***	2,3 \pm 0,2***
Неишемический тип Non-ischemic type (n = 16)	До лечения Before treatment	0,5 \pm 0,06	603,0 \pm 51,7*	4,0 \pm 0,4	6,8 \pm 2,2	3,6 \pm 0,7
	После лечения After therapy	0,4 \pm 0,03	271,5 \pm 46,2***	3,2 \pm 0,2	2,8 \pm 0,5***	2,0 \pm 0,2***
Ишемический тип Ischemic type (n = 16)	До лечения Before treatment	3,5 \pm 1,0**	826,1 \pm 66,7**	32,9 \pm 16,8	63,1 \pm 39,3	5,7 \pm 1,9
	После лечения After therapy	0,4 \pm 0,04***	762,8 \pm 131,2	8,4 \pm 5,1***	10,4 \pm 5,8	2,6 \pm 0,3
Контрольная группа Control group (n = 16)		0,4 \pm 0,3	347,4 \pm 162,0	3,8 \pm 1,3	4,2 \pm 1,9	3,5 \pm 1,2

Примечание. * – $p < 0,05$ – достоверная разница значений в сравнении с группой контроля; ** – $p < 0,05$ – достоверная разница значений между типом окклюзии вен сетчатки; *** – $p < 0,05$ – достоверная разница значений до и после лечения.

Note. * , $p < 0.05$ significant difference in values compared to the control group; ** , $p < 0.05$ significant difference in values between the type of retinal vein occlusion; *** , $p < 0.05$ significant difference in values before and after treatment.

чески значимой разницы от показателей группы контроля установлено не было.

При изучении динамики исследуемых факторов на фоне интравитреального введения ранибизумаба было определено, что у пациентов в общей группе наблюдалось достоверное снижение концентрации всех исследуемых веществ: VEGF-A – на 197,4 \pm 51,3 пг/мл ($p = 0,04$), ET-1 – на 1,6 \pm 0,4 фмоль/мл ($p = 0,001$), IL-1 – на 12,7 \pm 4,1 пг/мл ($p = 0,003$), IL-6 – на 17,8 \pm 11,2 пг/мл ($p = 0,001$), TNF α – на 2,3 \pm 0,8 пг/мл ($p = 0,001$). У пациентов с неишемическим типом окклюзии было установлено достоверное снижение концентрации VEGF-A – на 331,5 \pm 110 пг/мл ($p = 0,001$), IL-6 – на 4,0 \pm 1,2 пг/мл ($p = 0,001$) и TNF α – на 1,6 \pm 0,7 пг/мл ($p = 0,002$). У пациентов с ишемическим типом ретинальной венозной окклюзии наблюдалось статистически значимое снижение концентрации ET-1 – на 3,1 \pm 0,6 фмоль/мл ($p = 0,002$) и IL-1 – на 24,5 \pm 1,7 пг/мл ($p = 0,029$).

Аналогично был проведен анализ содержания исследуемых веществ в слезной жидкости и их динамика на фоне проведения антиангиогенной терапии. Данные представлены в таблице 2.

Из таблицы следует, что у всех пациентов вне зависимости от типа ретинальной венозной окклюзии установлено достоверное превышение

содержания всех исследуемых веществ в слезной жидкости по сравнению с контрольными значениями.

При сравнительном анализе полученных данных в исследуемых группах было установлено, что при ишемическом типе окклюзии содержание VEGF-A, ET-1 и интерлейкинов было достоверно выше, чем при неишемическом типе. Однако статистически значимой разницы уровня TNF α у пациентов с разным типом окклюзии установлено не было.

При изучении динамики исследуемых факторов в слезной жидкости на фоне интравитреального введения ранибизумаба определено, что у всех пациентов вне зависимости от типа окклюзии было отмечено достоверное снижение уровня VEGF-A: в общей группе на 547,9 \pm 113,6 пг/мл ($p = 0,001$), при неишемическом типе – на 217,4 \pm 112,3 пг/мл ($p = 0,001$), при ишемическом типе – на 878,6 \pm 87,4 пг/мл ($p = 0,001$). Кроме того, зарегистрировано достоверное снижение концентрации ET-1 в общей группе пациентов – на 0,2 \pm 0,05 фмоль/мл ($p = 0,005$). Статистически значимая разница концентраций IL-1 была получена только при неишемическом типе окклюзии – на 1,7 \pm 0,7 пг/мл ($p = 0,008$). Кроме того, на фоне интравитреального введения ранибизумаба было выявлено достоверное снижение

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ НА ФОНЕ ИНТРАВИТРЕАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ РАНИБИЗУМАБА

TABLE 2. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN TEAR FLUID ASSOCIATED WITH INTRAVITREAL INJECTIONS OF RANIBIZUMAB

Группы обследования Survey groups	Сроки обследования The timing of the survey	ЕТ-1, фмоль/мл fmol/ml	VEGF-A, пг/мл pg/ml	IL-1, пг/мл pg/ml	IL-6, пг/мл pg/ml	TNF α , пг/мл pg/ml
Общая группа General group (n = 32)	До лечения Before treatment	0,6 \pm 0,07*	884,5 \pm 91,9*	24,7 \pm 8,6*	3,7 \pm 0,7*	3,1 \pm 0,4*
	После лечения After therapy	0,4 \pm 0,1***	336,6 \pm 60,2***	68,0 \pm 20,3	1,5 \pm 0,2	3,0 \pm 0,5
Неишемический тип Non-ischemic type (n = 16)	До лечения Before treatment	0,3 \pm 0,06*	425,3 \pm 20,9*	5,0 \pm 0,9*	1,5 \pm 0,3*	2,9 \pm 0,4*
	После лечения After therapy	0,2 \pm 0,03	207,9 \pm 21,1***	3,3 \pm 0,4***	1,5 \pm 0,3	2,2 \pm 0,3
Ишемический тип Ischemic type (n = 16)	До лечения Before treatment	0,9 \pm 0,08**	1343,8 \pm 79,9**	44,3 \pm 15,9**	5,9 \pm 1,2**	3,3 \pm 0,6*
	После лечения After therapy	0,6 \pm 0,2	465,2 \pm 111,1***	132,8 \pm 33,9	1,4 \pm 0,3***	3,9 \pm 0,9
Контрольная группа Control group (n = 16)		0,2 \pm 0,1	167,7 \pm 103,0	2,9 \pm 1,7	0,33 \pm 0,08	1,7 \pm 0,9

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

концентрации IL-6 при ишемическом типе окклюзии – на 4,5 \pm 1,3 пг/мл (p = 0,002).

Для подтверждения взаимосвязи исследуемых цитокинов в сыворотке крови и слезной жидкости был проведен корреляционный анализ, в результате которого определена прямая связь VEGF-A в слезе с IL-1 (r = +0,8) (p = 0,001), IL-6 (r = +1,0) (p = 0,001), ET-1 (r = +1,0) (p = 0,001) в слезной жидкости, а также с концентрацией VEGF-A (r = +0,9) (p = 0,001) и ET-1 (r = +0,9) (p = 0,001) в сыворотке крови.

Обсуждение

На основании данных зарубежных авторов о наличии прямой корреляционной связи содержания некоторых цитокинов в жидких средах глаза и в крови мы проводили определение их уровня в сыворотке крови и в слезной жидкости, которая также косвенно может отражать изменение уровня веществ во внутриглазных структурах [20, 32]. Патогенетически это обусловлено возникающей при окклюзии вен сетчатки несостоятельностью гематоретинального барьера, что может способствовать поступлению определенных концентраций провоспалительных и ангиогенных веществ в системный кровоток [31].

При анализе полученных в ходе исследования результатов было выявлено повышение содержания VEGF-A в сыворотке крови и слезной жидкости вне зависимости от типа окклюзии по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о значимой роли фактора роста в иммунопатогенезе окклюзии вен сетчатки. Аналогичные изменения в стекловидном теле и влаге передней камеры также были описаны в ранее проводимых исследованиях [10, 13, 19, 20, 28].

Кроме того, у пациентов в общей группе выявлено превышение содержания ET-1 в слезной жидкости и в сыворотке крови по сравнению с контрольными значениями. Данный факт может быть связан с описанными в литературе основными эффектами ET-1, который может оказывать не только выраженное вазоконстрикторное, но и провоспалительное действие, способствуя адгезии лейкоцитов к поверхности эндотелия, адгезии и агрегации тромбоцитов, повышению проницаемости сосудов, как при системных сосудистых заболеваниях, так и при окклюзии вен сетчатки [4, 6, 26]. Полученная нами повышенная концентрация ET-1 может свидетельствовать о его значимой роли в патогенезе ретинальной венозной окклюзии.

Выявленный в результате исследования максимальный уровень VEGF-A и ET-1 как в сыворотке крови, так и в слезе у пациентов с ишемическим типом окклюзии может свидетельствовать о зависимости их содержания от выраженности ишемии. Некоторые авторы также отмечают, что уровень некоторых цитокинов, vasoактивных веществ и фактора роста напрямую зависит от типа ретинальной венозной окклюзии [5, 10, 19].

В ходе проводимого исследования было выявлено достоверное повышение содержания IL-1 в слезе у всех пациентов по сравнению с группой контроля. Как известно, IL-1 путем повышения продукции простагландинов, молекул адгезии, активации нейтрофилов стимулирует воспалительный процесс, пролиферацию клеток эндотелия и повышение проницаемости сосудистой стенки [4]. Учитывая данные эффекты, можно объяснить значимую роль IL-1 в патогенезе окклюзии вен сетчатки и полученную нами высокую концентрацию данного цитокина в слезной жидкости.

Уровень IL-6 в слезе был также выше значений в контрольной группе вне зависимости от типа окклюзии. Учитывая, что IL-6 – многофункциональный провоспалительный цитокин, повышение его концентрации при окклюзии вен сетчатки подтверждает его значение в иммунопатогенезе данного заболевания, что также было отмечено некоторыми авторами [10, 13].

Выявленный в результате исследования максимальный уровень IL-1 и IL-6 в слезе при ишемическом типе окклюзии может свидетельствовать о выраженной дисфункции эндотелия и степени гипоксии, что сопровождается мощным синтезом цитокинов [10, 11, 15]. В ряде исследований, посвященных иммунологическим особенностям окклюзии вен сетчатки, также было установлено повышение концентраций исследуемых цитокинов в стекловидном теле с прямой зависимостью от выраженности ишемии [5, 10, 19].

Также и концентрация TNF α в слезе у всех пациентов была достоверно выше контрольных значений. Как известно из литературы, TNF α способен усиливать провоспалительный эффект других цитокинов путем увеличения синтеза молекул адгезии, хемоаттрактантов, вызывая миграцию лейкоцитов к эндотелию [4]. В высоких концентрациях TNF α способствует повреждению эндотелия с развитием его дисфункции и повышению проницаемости сосудов. Данные эффекты объясняют полученное нами превышение содержания TNF α при окклюзии вен сетчатки.

На фоне проведения антиангиогенной терапии в виде интравитреальных инъекций ранибизумаба было зарегистрировано достоверное снижение VEGF-A в сыворотке крови и слезе в общей группе пациентов и при неишемическом типе окклюзии. Аналогичные изменения в жидких средах глаза были описаны в некоторых ис-

следованиях [2, 7, 12, 14, 16]. Кроме того, на фоне анти-VEGF терапии было зарегистрировано снижение концентрации ET-1 в сыворотке крови и слезе в общей группе пациентов, что также было отмечено некоторыми авторами [21].

Отсутствие динамики VEGF-A и некоторых цитокинов при ишемическом типе окклюзии на фоне специфической терапии может быть связано с наличием периферической ишемии, постоянно поддерживающей повышенную продукцию провоспалительных молекул и фактора роста, способствуя поддержанию воспалительного процесса [11, 15].

В связи с тем что повышенное содержание цитокинов соответствует количеству VEGF-A, выявленному при корреляционном анализе, можно предположить, что их продукция – взаимосвязанный процесс. Так, например, известно, что TNF α способен активировать макрофаги, находящиеся на поверхности внутренней пограничной мембраны сетчатки, приводя к увеличению экспрессии ими VEGF-A и других провоспалительных цитокинов [29]. Некоторые авторы также отмечают наличие корреляционной связи уровня некоторых цитокинов в жидких средах глаза и сыворотке крови у пациентов с различной патологией [5, 20, 30, 32]. Учитывая эти данные, возможно, снижение концентрации VEGF-A на фоне антиангиогенной терапии опосредованно может приводить к снижению содержания других цитокинов, что также было отмечено в некоторых исследованиях [7].

Выводы

Окклюзия вен сетчатки сопровождается повышением концентрации VEGF-A в сыворотке крови и слезе вне зависимости от типа окклюзии с положительной корреляционной зависимостью от уровня интерлейкинов и эндотелина-1.

В сыворотке крови пациентов с окклюзией вен сетчатки выявлено повышение содержания эндотелина-1, в слезной жидкости – всех исследуемых факторов.

Максимальная концентрация VEGF-A, эндотелина-1 и интерлейкинов была выявлена при ишемическом типе ретинальной венозной окклюзии.

На фоне антиангиогенной терапии у пациентов с неишемическим типом окклюзии отмечено достоверное снижение уровня VEGF-A, IL-6 и TNF α в сыворотке крови, в слезе – VEGF-A, IL-1. У пациентов с ишемическим типом окклюзии была зарегистрирована статистически значимая разница концентраций VEGF-A и IL-6 в слезе и сывороточных ET-1 и IL-1.

Список литературы / References

1. Будзинская М.В., Мазурина Н.К., Егоров А.Е., Куроедов А.В., Лоскутов И.А., Плюхова А.А., Разик С., Рябцева А.А., Симонова С.В. Алгоритм ведения пациентов с ретинальными венозными окклюзиями. Сообщение 2. Макулярный отек // Вестник офтальмологии, 2015. Т. 131, № 6. С. 57-66. [Budzinskaya M.V., Mazurina N.K., Egorov A.E., Kuroedov A.V., Loskutov I.A., Plyukhova A.A., Razik S., Ryabtseva A.A., Simonova S.V. Retinal vein occlusion management algorithm. Part 2. Macular edema. *Vestnik oftalmologii = Bulletin of Ophthalmology*, 2015, Vol. 131, no. 6, pp. 57-66. (In Russ.)]
2. Дроздова Е.А., Хохлова Д.Ю. Динамическая оценка морфологических и иммунологических параметров при макулярном отеке на фоне окклюзии вен сетчатки // Практическая медицина, 2015. Т. 10, № 3 (104). С. 25-29. [Drozdova E.A., Khokhlova D.Yu. Dynamic assessment of morphological and immunological parameters at macular edema due to retinal vein occlusion. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2015, Vol. 10, no. 3 (104), pp. 25-29. (In Russ.)]
3. Казарян А.А., Бурладинова А.А., Лебенкова О.А. Морфологическая характеристика макулярной зоны сетчатки у больных с окклюзией ретинальных вен до и после лечения: предварительные результаты // Вестник офтальмологии, 2014. Т. 130, № 1. С. 12-17. [Kazarian A.A., Burladinova A.A., Lebenkova O.A. Morphological characteristics of the macula in patients with retinal vein occlusion before and after the treatment: preliminary results. *Vestnik oftalmologii = Bulletin of Ophthalmology*, 2014, Vol. 130, no. 1, pp. 12-17. (In Russ.)]
4. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 640 с. [Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R.Ya. Clinical immunology and allergology with the basics of general immunology: a textbook]. Moscow: GEOTAR-Media, 2012. 640 p.
5. Хохлова Д.Ю., Дроздова Е.А. Значение основных маркеров эндотелиальной дисфункции в развитии макулярного отека при окклюзии вен сетчатки // Современные технологии в офтальмологии, 2016. № 4. С. 245-247. [Drozdova E.A., Khokhlova D.Yu. The importance of the main markers of endothelial dysfunction in the development of macular edema in the retinal vein occlusion. *Sovremennyye tekhnologii v oftalmologii = Modern Technologies in Ophthalmology*, 2016, no. 4, pp. 245-247. (In Russ.)]
6. Шеланкова А.В., Будзинская М.В., Плюхова А.А., Михайлова М.А., Нуриева Н.М. Анализ изменений уровня эндотелина-1 в сыворотке крови у пациентов с ретинальными венозными окклюзиями // Казанский медицинский журнал, 2017. Т. 98, № 3. С. 409-412. [Shelankova A.V., Budzinskaya M.V., Plyukhova A.A., Mikhaylova M.A., Nurieva N.M. Analysis of changes in serum levels of endothelin-1 in patients with retinal vein occlusion. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2017, Vol. 98, no. 3, pp. 409-412. (In Russ.)]
7. Шуко А.Г., Злобин И.В., Юрьева Т.Н., Останин А.А., Черных Е.Р. Дисбаланс внутриглазных цитокинов при окклюзии вен сетчатки и его взаимосвязь с эффективностью антиангиогенной терапии // Вестник офтальмологии, 2015. Т. 131, № 2. С. 50-58. [Shchuko A.G., Zlobin I.V., Yuryeva T.N., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Imbalance of intraocular cytokines in retinal vein occlusion and its relationship with the effectiveness of antiangiogenic therapy. *Vestnik oftalmologii = Bulletin of Ophthalmology*, 2015, Vol. 131, no. 2, pp. 50-58. (In Russ.)]
8. Brown D.M., Campochiaro P.A., Singh R.P., Li Z., Gray S., Saroj N., Rundle A.C., Rubio R.G., Murahashi W.Y. CRUISE Investigators. Ranibizumab for macular edema following central retinal vein occlusion: six-month primary end point results of a phase III study. *Ophthalmology*, 2010, Vol. 117, no. 6, pp. 1124-1133.
9. Campochiaro P.A., Heier J.S., Feiner L., Gray S., Saroj N., Rundle A.C., Murahashi W.Y., Rubio R.G. BRAVO Investigators. Ranibizumab for macular edema following branch retinal vein occlusion: six month primary end point results of phase III study. *Ophthalmology*, 2010, Vol. 117, no. 6, pp. 1102-1112.
10. Dacheva I., Ceglowska K., Nobl M., Nowomiejska K., Kretz F.T., Reich M., Deuchler S., Tandogan T., Auffarth G.U., Koss M.J. Correlation from undiluted vitreous cytokines of untreated central retinal vein occlusion with spectral domain optical coherence tomography. *Klin. Monbl. Augenheilkd*, 2016, Vol. 233, no. 7, pp. 864-868.
11. Ehlken C., Grundel B., Michels D., Junker B., Stahl A., Schlunck G., Hansen L.L., Feltgen N., Martin G., Agostini H.T., Pielon A. Increased expression of angiogenic and inflammatory proteins in the vitreous of patients with ischemic central retinal vein occlusion. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 5, e0126859. doi:10.1371/journal.pone.0126859.
12. Fauser S., Viebahn U., Muether P.S. Intraocular and systemic inflammation-related cytokines during one year of ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.*, 2015, Vol. 93, no. 8, pp. 734-738.
13. Feng J., Zhao T., Zhang Y., Ma Y., Jiang Y. Differences in aqueous concentrations of cytokines in macular edema secondary to branch and central retinal vein occlusion. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 7, e68149. doi: 10.1371/journal.pone.0068149.
14. Forooghian F., Kertes P.J., Eng K.T., Albani D.A., Kirker A.W., Merkur A.B., Fallah N., Cao S., Cui J., Or C., Matsubara J.A. Alterations in intraocular cytokine levels following intravitreal ranibizumab. *Can. J. Ophthalmol.*, 2016, Vol. 51, no. 2, pp. 87-90.
15. Fujikawa M., Sawada O., Miyake T., Kakinoki M., Sawada T., Kawamura H., Ohji M. Correlation between vascular endothelial growth factor and nonperfused areas in macular edema secondary to branch retinal vein occlusion. *Clin. Ophthalmol.*, 2013, Vol. 7, pp. 1497-1501.
16. Grierson R., Meyer-Rüsenberg B., Kunst F., Berna M.J., Richard G., Thill M. Endothelial progenitor cells and plasma vascular endothelial growth factor and stromal cell-derived factor-1 during ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 2013, Vol. 29, no. 6, pp. 530-538.
17. Groneberg T., Trattig J.S., Feucht N., Lohmann C.P., Maier M. Morphologic patterns on spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) as a prognostic indicator in treatment of macular edema due to retinal vein. *Klin. Monbl. Augenheilkd*, 2016, Vol. 233, no. 9, pp. 1056-1062.
18. Hayreh S.S. Retinal vein occlusion. *Indian J. Ophthalmol.*, 1994, Vol. 42, no. 3, pp. 109-132.

19. Jung S.H., Kim K.A., Sohn S.W., Yang S.J. Association of aqueous humor cytokines with the development of retinal ischemia and recurrent macular edema in retinal vein occlusion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2014, Vol. 55, no. 4, pp. 2290-2296.
20. Kasza M., Balogh Z., Biro L., Ujhelyi B., Damjanovich J., Csutak A., Várdai J., Berta A., Nagy V. Vascular endothelial growth factor levels in tears of patients with retinal vein occlusion. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2015, Vol. 253, no. 9, pp. 1581-1586.
21. Kida T., Flammer J., Oku H., Morishita S., Fukumoto M., Suzuki H., Konieczka K., Ikeda T. Suppressed endothelin-1 by anti-VEGF therapy is important for patients with BRVO-related macular edema to improve their vision. *EPMA J.*, 2016, Vol. 7, no. 1, p. 18.
22. Kim S.Y., Johnson M.A., McLeod D.S., Alexander T., Hansen B.C., Luty G.A. Neutrophils are associated with capillary closure in spontaneously diabetic monkey retinas. *Diabetes*, 2005, Vol. 54, no. 5, pp. 1534-1542.
23. Luna J.D., Chan C.C., Derevjani N.L., Mahlow J., Chiu C., Peng B., Tobe T., Campochiaro P.A., Vinos S.A. Blood-retinal barrier (BRB) breakdown in experimental autoimmune uveoretinitis: comparison with vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta-mediated breakdown. *J. Neurosci. Res.*, 1997, Vol. 49, no. 3, pp. 268-280.
24. Miller J.W., Le Couter J., Strauss E.C., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor A in intraocular vascular disease. *Ophthalmology*, 2013, Vol. 120, no. 1, pp. 106-114.
25. Mo B., Zhou H.Y., Jiao X., Zhang F. Evaluation of hyperreflective foci as a prognostic factor of visual outcome in retinal vein occlusion. *Int. J. Ophthalmol.*, 2017, Vol. 10, no. 4, pp. 605-612.
26. Muraoka Y., Tsujikawa A., Murakami T., Ogino K., Kumagai K., Miyamoto K., Uji A., Yoshimura N. Morphologic and functional changes in retinal vessels associated with branch retinal vein occlusion. *Ophthalmology*, 2013, Vol. 120, no. 1, pp. 91-99.
27. Noma H., Mimura T., Yasuda K., Nakagawa H., Motohashi R., Kotake O., Shimura M. Intravitreal Ranibizumab and aqueous humor factors/cytokines in major and macular branch retinal vein occlusion. *Ophthalmologica*, 2016, Vol. 235, no. 4, pp. 203-207.
28. Noma H., Mimura T., Yasuda K., Shimura M. Role of soluble vascular endothelial growth factor receptor signaling and other factors or cytokines in central retinal vein occlusion with macular edema. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2015, Vol. 56, no. 2, pp. 1122-1128.
29. Pérez-Ruiz M., Ros J., Morales-Ruiz M., Navasa M., Colmenero J., Ruiz-del-Arbol L., Cejudo P., Clària J., Rivera F., Arroyo V., Rodés J., Jiménez W. Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology*, 1999, Vol. 29, no. 4, pp. 1057-1063.
30. Pfister M., Rothweiler F., Michaelis M., Cinatl J.Jr., Schubert R., Koch F.H., Koss M.J. Correlation of inflammatory and proangiogenic cytokines from undiluted vitreous samples with spectral domain OCT scans, in untreated branch retinal vein occlusion. *Clinical Ophthalmology*, 2013, Vol. 7, pp. 1061-1067.
31. Scholl S., Augustin A., Loewenstein A., Rizzo S., Kupperman B. General pathophysiology of macular edema. *Eur. J. Ophthalmol.*, 2011, Vol. 21, pp. 10-19.
32. Topcu-Yilmaz P., Atakan N., Bozkurt B., Irkec M., Aban D., Mesci L., Tezcan I. Determination of tear and serum inflammatory cytokines in patients with rosacea using multiplex bead technology. *Immunol. Inflamm.*, 2013, Vol. 21, no. 5, pp. 351-359.

Авторы:

Дроздова Е.А. — д.м.н., профессор кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Хохлова Д.Ю. — аспирант кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Мезенцева Е.А. — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Никущкина К.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Drozdova E.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Ophthalmology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Khokhlova D. Yu., Postgraduate Student, Department of Ophthalmology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Mezentseva E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology, and Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Nikushkina K.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 14.09.2017

Отправлена на доработку 25.09.2017

Принята к печати 06.10.2017

Received 14.09.2017

Revision received 25.09.2017

Accepted 06.10.2017

ЦИТОИММУНОГРАММА КОЖИ – НОВЫЙ МЕТОД ОБЪЕКТИВНОЙ ЦИФРОВОЙ ОЦЕНКИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА КЛЕТОК КОЖИ

**Гольцов С.В.¹, Гольцова Е.Н.¹, Суховой Ю.Г.², Костоломова Е.Г.²,
Паульс В.Ю.¹**

¹ Многопрофильное медицинское учреждение NEO-Clinic, г. Тюмень, Россия

² Тюменский филиал Института клинической иммунологии, г. Тюмень, Россия

Резюме. История дерматологии помнит массу попыток преобразовать кожу человека – плотную ткань в жидкость. Поиск способа разделения клеточного субстрата кожи для получения суспензии и изучения фенотипа клеток, входящих в ее состав, стал основой нашего многолетнего исследования, результатом которого явился патентованный способ цифровой оценки субпопуляционного состава клеток кожи – цитоиммунограмма кожи. Именно так называется изобретение, признанное практикоориентированным и перспективным для внедрения в систему общественного здравоохранения резолюцией «Х международной конференции иммунологов Урала», на которой впервые был представлен доклад о «Перспективах применения цитоиммунограммы кожи».

Приведенные в качестве примера результаты исследования одного частного случая показывают, что в данном образце кожи:

1) активно представлена субпопуляция кератиноцитов, причем большинство из них активированы, что говорит об умеренной пролиферативной активности базального слоя эпидермиса;

2) присутствуют В-лимфоциты, которые в норме являются резидентами циркулирующего объема крови и лимфы, поскольку имеют положительный таксис к высокоэндотелиальным венам, находящимся преимущественно в лимфатических узлах; наличие их в коже указывает на активность гуморального иммунитета;

3) присутствие несколько разновидностей Т-лимфоцитов (CD3⁺ лимфоцитов), локализующихся преимущественно в трех наружных слоях эпидермиса, и тот факт, что CD4⁺ клетки несколько преобладают численно над CD8⁺ клетками, говорит об усилении адаптивного иммунитета кожи;

4) низкое содержание Т-цитотоксических лимфоцитов свидетельствует об отсутствии инфекционно-воспалительного процесса;

5) остальные показатели демонстрируют количество специфических клеток кожи, но при этом их низкую активацию, что в совокупности с отсутствием специфических жалоб у данного пациента свидетельствует о нормальном состоянии его кожи;

б) жизнеспособность в нативном образце составила 99,8%, после криоконсервации – 87,0%.

Предлагаемый способ позволяет получить информацию о количественном составе и функциональной активности клеток кожи, что объективно свидетельствует о текущем статусе местного иммунитета пациента и может стать основой для лечебно-профилактической программы, разработанной индивидуально. Цитоиммунограмма кожи, как способ диагностики кожи, проста в исполнении и доступна, позволяет оценить качественный и количественный состав ее отдельных субпопуляций

Адрес для переписки:

Гольцов Сергей Викторович
Многопрофильное медицинское учреждение NEO-Clinic
625002, Россия, г. Тюмень, ул. Немцова, 4.
Тел./факс: 8 (3452) 39-09-05.
E-mail: goltsovs@gmail.com

Address for correspondence:

Goltsov Sergey V.
Multidisciplinary Medical Institution NEO-Clinic
625002, Russian Federation, Tyumen, Nemtsova str., 4.
Phone/Fax: 7 (3452) 39-09-05.
E-mail: goltsovs@gmail.com

Образец цитирования:

С.В. Гольцов, Е.Н. Гольцова, Ю.Г. Суховой, Е.Г. Костоломова, В.Ю. Паульс «Цитоиммунограмма кожи – новый метод объективной цифровой оценки субпопуляционного состава клеток кожи» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 373–382.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-373-382

© Гольцов С.В. и соавт., 2018

For citation:

S.V. Goltsov, E.N. Goltsova, Yu.G. Sukhovey, E.G. Kostolomova, V.Yu. Pauls "Cytoimmunogram of the skin: a new method for objective evaluation of the skin cell subpopulation profile", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 373–382.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-373-382

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-373-382

клеток, оценить их функцию и степень их реагирования в ответ на какие-либо воздействия внешней и внутренней среды. Широкомасштабное применение цитоиммунограммы в перспективе позволит создать половозрастной регистр состояния кожи в норме и патологии, что позволит определять степень реагирования кожи на воздействия среды, измерять активность клеточных субпопуляций нативной кожи в условиях нормы и патологии, использовать критерий возрастных изменений кожи, объективно оценивать динамику заболевания кожи, индивидуально подбирать лекарственный препарат и контролировать эффективность применяемых наружных лекарственных средств.

Ключевые слова: кожа, клетки, фенотип, цитоиммунограмма, проточная цитометрия, криоконсервация

CYTOIMMUNOGRAM OF THE SKIN: A NEW METHOD FOR OBJECTIVE EVALUATION OF THE SKIN CELL SUBPOPULATION PROFILE

Goltsov S.V.^a, Goltsova E.N.^a, Sukhovey Yu.G.^b, Kostolomova E.G.^b, Pauls V.Yu.^a

^a Multidisciplinary Medical Institution NEO-Clinic, Tyumen, Russian Federation

^b The Institute of Clinical Immunology, Tyumen Branch, Tyumen, Russian Federation

Abstract. The history of dermatology reminds a lot of attempts to transform the dense human skin samples into a liquid phase. A search for a method aimed to separate cellular substrate of the skin and to obtain a suspension for studying the cell phenotype profile was a basis of our long-term study, which resulted in a proprietary method for digital estimation of distinct subsets composing the skin cell population. The skin cytoimmunogram is the name of the invention, which is recognized as practical and promising for implementation in public healthcare system as recognized by the decision of the “Xth International Conference of Immunologists of the Urals”, where the report on the “Prospects for application of the skin cytoimmunogram” was presented for the first time.

The results of a single case analysis showed the following findings for this skin sample:

1) a subpopulation of keratinocytes is actively represented, most of them activated, which indicates a moderate proliferative activity of the basal layer of the epidermis;

2) there are B-lymphocytes, which normally are residents of the circulating blood and lymph, since they have a positive taxis to the high endothelial venules located mainly in the lymph nodes. Their presence in the skin indicates the activity of humoral immunity;

3) presence of several T-cell types of (CD3⁺ lymphocytes) localized predominantly in the three outer layers of the epidermis, and the findings of CD4⁺ cells predominating over CD8⁺ cells suggests an increase in adaptive skin immunity;

4) low content of T-cytotoxic cells indicates to absence of an infectious/inflammatory process;

5) the remaining parameters reflect the numbers of specific skin cells, characterized by low activation grade, which, along with absence of specific complaints in this patient, indicates to normal state of his skin;

6) cell viability in the native sample was 99.8%, after cryopreservation – 87.0%.

The proposed method allows to obtain information on the quantitative composition and functional activity of skin cells, which distinctly indicates to the present condition of the patient’s local immunity and may become a basis for development of personalized curative and prophylactic programs. The Cytoimmunogram of skin as a way of skin diagnostic evaluation, is easy to implement, and it is available for qualitative and quantitative evaluation of separate cell subpopulations, in order to assess their function and degree of their response to any external or internal environmental impact. Widespread application of the cytoimmunogram perspective will allow to create sex- and age-matched registry for skin parameters in normal and pathological conditions, thus determining the extent of skin response to environmental exposures, to measure activities of cell subsets in native skin under normal and pathological conditions, to justify the criteria of age-related skin changes, to objectively assess clinical course of skin diseases, and to individually select the drug and monitor the effectiveness of external medical drugs applied.

Keywords: skin, cells, phenotype, cytoimmunogram, flow cytometry, cryoconservation

Введение

Сегодня нет никаких сомнений в том, что развитие науки связано с новыми технологиями, которые интегрируются в самые сложные формы деятельности человека, в том числе медицинскую науку и ее отдельный сегмент — дерматологию, как науку, изучающую кожу.

Образуя обширную область контакта с внешней средой и представляя собой важнейшую барьерную ткань, ограничивающую внутреннюю среду организма, кожа человека исторически сформировалась в самостоятельный орган иммунной системы, зачастую являясь плацдармом реализации ее механизмов реагирования. Кроме того, обладая многообразием иммунокомпетентных клеток, кооперирующихся между собой как с помощью комплементарных структур на поверхности, так и при участии иммунорегуляторных цитокинов, организация кожи позволяет ей участвовать в иммунных реакциях всего организма, при этом осуществляя некоторые иммунологические процессы самостоятельно, *in situ*.

Клеточный субстрат иммунной компетентности кожи представлен резидентными и рециркулирующими клетками костномозгового происхождения. К резидентным клеткам относятся тучные клетки, клетки Лангерганса, кератиноциты, эндотелиальные клетки, фибробласты, моноциты (макрофаги). Рециркулирующими являются лимфоциты и гранулоциты, причем есть мнение, что лишь определенные типы лимфоцитов способны поселяться в коже. Следует отметить, что первым концепцию лимфоидной ткани, ассоциированной с кожей (SALT — от Skin-Associated Lymphoid Tissue), сформулировал J.W. Streinlein, который объединил этим понятием эпидермис, тропные к нему Т-лимфоциты, сами кератиноциты, а также дренирующие эпидермис лимфатические узлы [3].

Однако ранее к иммунной подсистеме кожи доказательно относили иммунологически значимые клетки, локализованные, главным образом, в дерме — тучные клетки, макрофаги, гранулоциты, эндотелий кровеносных и лимфатических сосудов и др. [4].

Приняв тот факт, что кожа представляет собой активный иммунный орган, так как резидентные и рециркулирующие клетки эпидермиса и дермы способны не только инициировать иммунные процессы, участвовать в них, но и определять состояние кожных покровов, это может быть оценено в ходе осмотра [6, 7].

Визуально состояние кожных покровов может оценить любой человек, основываясь на собственных знаниях. Оценка врача более точна, по сравнению с обывателем, но она все же субъективна и зависит от опыта, стажа работы, количества пациентов. В связи с этим актуализируется потребность в методах оценки состояния кожных покровов. Сегодня для этого используется ряд методов определения функций и свойств кожи. Они безопасны, безболезненны, комфортны и дают возможность многократного проведения процедуры обследования и анализа. К таким методам относятся: корнеометрия, себуметрия, кутометрия, профилометрия [1]. Кроме того, для оценки внутренних структур кожи применяются инвазивные (гистология) и неинвазивные (оптическая когерентная томография, ультразвуковая микроскопия, магнитно-резонансная томография) методы [5].

Однако существенным их недостатком является дороговизна, недоступность, а также невозможность оценить клеточный состав кожи и ее функциональность [8]. Перечисленные методы, описывая ряд свойств кожи, не учитывают того, что кожа — экзосоан, на который постоянно действует окружающая среда и в котором постоянно происходит сложный комплекс межклеточных взаимодействий [9].

При этом на протяжении всего периода изучения кожи было и остается актуальным изучение фенотипа клеток ее составляющих. Актуальным остается изучение роли хемокинов и соответствующих им хемокиновых рецепторов в патогенезе хронических заболеваний кожи [2]. Но сложность исследований обусловлена прочными десмосомальными связями клеток, препятствующими их разделению и изучению в живом виде и по отдельности.

Мы говорим о коже как о целостном органе, но состоящем из множеств и подмножеств клеток, выполняющих соответствующие их предназначению функции, понимание значения каждой из которых возможно только при определении вне отношений с другими клетками. Если бы это было возможным, то такие врачебные специальности, как дерматология и косметология, получили бы ответы на вопросы: возможна ли объективная оценка динамики заболевания кожи и как оценить степень реагирования кожи на воздействия среды, какова функциональная активность клеточных субпопуляций кожи в условиях нормы и патологии и каковы критерии возрастных изменений кожи, насколько эффективно применяемое наружное лекарственное средство и возможен ли строго индивидуальный подбор

лекарственного препарата для наружного применения или косметики?

История дерматологии помнит массу попыток преобразовать кожу человека — плотную ткань в жидкость. Поиск способа разделения клеточного субстрата кожи для получения суспензии и изучения фенотипа клеток, входящих в ее состав, стал основой нашего многолетнего исследования, результатом которого явился патентованный способ цифровой оценки субпопуляционного состава клеток кожи — цитоиммунограмма кожи (Патент на изобретение № 2630607 от 11.09.2017). Именно так называется изобретение, признанное практикоориентированным и перспективным для внедрения в систему общественного здравоохранения резолюцией «X международной конференции иммунологов Урала», на которой впервые был представлен доклад о «Перспективах применения цитоиммунограммы кожи».

Изобретение относится к биологии и медицине и может быть использовано для определения субпопуляционного состава клеток кожи и получения цитоиммунограммы кожи. Общеизвестно, что клетки кожи соединены друг с другом десятками, сотнями, а может и тысячами отростков, крепко-накрепко спаивающих клетки в плотный конгломерат, и разделение их для помещения в жидкость, влечет разрыв мембран и грозит клеткам гибелью. Но для определения функции клетки исследователям нужны живые и только живые клетки. Удалось создать такие условия, при которых клетки кожи, разделенные между собой и приведенные в состояние суспензии, остаются жизнеспособными на 90-99%. А, следовательно, суспензию клеток кожи можно изучать (качественно, количественно), тестировать *in vitro* эффективность различных лекарственных препаратов, а в условиях криобанка еще и хранить весь субпопуляционный состав клеток индивидуального образца.

Материалы и методы

Указанный технический результат достигается способом определения субпопуляционного состава клеток кожи и получения цитоиммунограммы кожи, включающим в себя забор биоптата кожи на глубину 2 мм, гомогенизацию ткани в 0,9% водном растворе хлорида натрия при температуре +23 ... +25 °С, извлечение гомогената, фильтрование гомогената через инертную фильтровальную перегородку с диаметром пор 20 мкм, центрифугирование гомогената при 400 г в течение 5 минут при температуре +23 ... +25 °С, определение жизнеспособности клеток кожи, инкубирование в течение 20 минут в защищенном от света месте клеток кожи с моноклональ-

ными антителами, конъюгированными с флюорохромами, фенотипирование клеток кожи, определение количества клеток кожи определенного фенотипа.

Жизнеспособность клеток определяют методом проточной цитометрии с помощью внутриклеточного красителя 7-amino-actinomycin D RUO (7AAD). Идентификацию жизнеспособных клеток выполняют путем регистрации двух параметров: бокового светорассеяния (side scatter) и регистрацией флюоресценции по 3 каналу (FL3). Если не определить жизнеспособность клеток кожи, то полученные результаты окажутся менее точными, т.к. некоторые клетки разрушаются.

Полученный образец кожи можно исследовать *ex tempore* (сразу после забора материала) либо после длительной криоконсервации. Для этого проверенный на стерильность образец помещают в криобирку Costar 2 мл с раствором для замораживания (90% Fetal Bovine Serum и 10% DMSO в качестве криопротектора), затем образец замораживают в парах жидкого азота t°-140 °С со скоростью 1 °С в минуту методом витрификации.

Инкубирование клеток кожи проводят в течение 20 минут в защищенном от света месте с моноклональными антителами, конъюгированными с флюорохромами флюоресцеинизотиоцианатом (FITC), фикоэритрином (PE), PE — Texasred (ESD), PE/CY5(PC5), PE/CY7(PC7) (Beckman Coulter, США). Фенотипирование клеток кожи проводили с помощью специфических маркеров: CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD34, CD44, CD45, CD49, CD54, CD63, CD80, CD146, CD203c; CD207, CD249. Выбор типа и количества флюоресцентных красителей может определяться задачей конкретного исследования. В нашем исследовании выделение субпопуляций клеток кожи было обусловлено выбором наиболее влияющих на патогенез часто встречаемых дерматозов. Так, определялись кератиноциты CD49f⁺, из них активированные CD49f⁺HLA-DR⁺; фибробласты (фиб्रोциты) CD45⁻CD14⁻CD44⁺, из них активированные CD45⁻CD14⁻CD44⁺CD80⁺; тучные клетки CD249⁺, из них активированные CD249⁺CD63⁺; моноциты (макрофаги) CD45⁺CD14⁺, из них активированные CD45⁺CD14⁺HLA-DR⁺; внутриэпидермальные макрофаги CD207⁺, из них активированные CD207⁺CD80⁺, CD207⁺HLA-DR⁺, CD207⁺CD80⁺HLA-DR⁺; эндотелиальные клетки CD146⁺, из них активированные CD146⁺CD34⁺, CD146⁺HLA-DR⁺, CD146⁺CD54⁺, CD146⁺CD54⁺HLA-DR⁺; лимфоцитарные популяции: Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺, Т-хелперы CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺, Т-цитотоксические лимфоциты CD45⁺

CD3⁺CD4⁺CD8⁺, В-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD19⁺, NK-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺.

Продолжительность инкубирования в 20 минут является оптимальной для данного способа. Попадание света во время инкубирования недопустимо, т.к. приведет к разрушению флюорохромов.

В процессе дифференцировки клеток на их поверхности появляются специфические мембранные молекулы. Такие молекулы обнаруживают с использованием набора специфических моноклональных антител, с помощью которых идентифицируют субпопуляции клеток и определяют их фенотип.

Методом проточной цитометрии определяют количество клеток кожи определенного фенотипа, используя моноклональные антитела, меченные флюорохромами и связывающиеся с определенными рецепторами на мембране клетки.

Для регистрации получаемых результатов и удобства пользования разработан бланк медицинского документа «Цитоиммунограмма кожи», в верхней части которого свободные участки для заполнения лаборантом идентификационного номера цитоиммунограммы кожи с датой проведения анализа, фамилии имени отчества пациента и его возраста.

В средней части документа в две колонки представлен состав клеток кожи с указанием фенотипа каждой популяции. Напротив каждой группы клеток кожи предусмотрены пустые поля в виде сдвоенных прямоугольников для заполнения лаборантом числовых данных в относительных и/или абсолютных единицах по результатам исследования. Представленные числовые данные указывают количество клеток кожи определенного фенотипа.

В нижней части документа имеются свободные участки, предназначенные для заполнения врачом информации о результатах исследования фенотипа клеток кожи, которые могут свидетельствовать о динамической оценке течения заболевания, эффективности использования назначенных лекарственных или косметических средств, оценке возрастных изменений кожи, индивидуальном подборе лекарственных препаратов, оценке степени реагирования клеток кожи на те или иные воздействия. А также заполняются лаборантом в свободные участки сведения об исполнителе и враче, направившем на проведение анализа.

Результаты

В качестве примеров применения цитоиммунограммы кожи представляем три наблюдения предлагаемого способа оценки.

Наблюдение первое – частный случай оценки состояния кожи человека

С помощью инструмента для биопсии мы осуществили забор биоптата кожи человека с ягодичной области. После пробоподготовки, описанной выше, методом проточной цитометрии на Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) определяли количество клеток кожи определенных фенотипов, используя моноклональные антитела, меченные флюорохромами и связывающиеся с определенными рецепторами на мембране клетки. Результаты фиксировали на бланке (рис. 1).

Приведенные в качестве примера результаты исследования одного частного случая показывают, что в данном образце кожи:

1) активно представлена субпопуляция кератиноцитов, причем большинство из них активированы, что говорит об умеренной пролиферативной активности базального слоя эпидермиса;

2) присутствуют В-лимфоциты, которые в норме являются резидентами циркулирующего объема крови и лимфы, поскольку имеют положительный таксис к высокоэндотелиальным венам, находящимся преимущественно в лимфатических узлах. Наличие их в коже указывает на активность гуморального иммунитета;

3) присутствие несколько разновидностей Т-лимфоцитов (CD3⁺ лимфоцитов), локализующихся преимущественно в трех наружных слоях эпидермиса, и тот факт, что CD4⁺ клетки несколько превалируют численно над CD8⁺ клетками, говорит об усилении адаптивного иммунитета кожи;

4) низкое содержание Т-цитотоксических лимфоцитов свидетельствует об отсутствии инфекционно-воспалительного процесса;

5) остальные показатели демонстрируют количество специфических клеток кожи, но при этом их низкую активацию, что в совокупности с отсутствием специфических жалоб у данного пациента свидетельствует о нормальном состоянии его кожи.

Наблюдение второе – сравнительная оценка цитоиммунограммы кожи нативных и криоконсервированных образцов

Для демонстрации возможностей использования цитоиммунограммы кожи нами было отобрано 64 человек, которых мы разделили на группы по полу и возрасту: 25–45 лет и 45–65 лет, по 16 человек в каждой.

Деление обследованных по полу и возрасту было необходимым, чтобы показать различие измеряемых параметров в разных половозрастных группах. Исследование состояло из двух этапов:

ЦИТОИММУНОГРАММА КОЖИ № 42/2

Cytoimmunogramm of the skin №

« 22 » января 2017 г.

Ф.И.О. XXX
Last name XXX

Возраст _____
Age _____

Кератиноциты Keratinocytes CD49f ⁺	54,2	Эндотелиальные клетки Endothelial cells C146 ⁺	0,6
из них активированные of which activated CD49f ⁺ HLA-DR ⁺	41,4	из них активированные of which activated C146 ⁺ CD34 ⁺	0
Фибробласты (фиброциты) Fibroblasts CD45 ⁺ CD14 ⁺ CD44 ⁺	86,0	C146 ⁺ HLA-DR ⁺	60,3
из них активированные of which activated CD45 ⁺ CD14 ⁺ CD44 ⁺ CD80 ⁺	6,2	C146 ⁺ CD54 ⁺	5,4
		C146 ⁺ CD54 ⁺ HLA-DR ⁺	5,9
Тучные клетки Mast cells CD249 ⁺	6,8	Лимфоцитарные популяции: Lymphocyte populations: Т-лимфоциты T-lymphocytes	13,0
из них активированные of which activated CD249 ⁺ CD63 ⁺	1,1	C45 ⁺ CD3 ⁺	
Моноциты (макрофаги) Monocytes (macrophages) CD45 ⁺ CD14 ⁺	7,0	Т-хелперы T-helpers C45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	11,9
из них активированные CD45 ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	2,6	Т-цитотоксические лимфоциты T-cytotoxic cells C45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	1,2
Внутриэпидермальные макрофаги CD207 ⁺ Intraepidermal macrophages	46,1	В-лимфоциты B-lymphocytes C45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺	8,1
из них активированные of which activated CD207 ⁺ CD80 ⁺	0	НК-лимфоциты NK-lymphocytes C45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	12,5
CD207 ⁺ HLA-DR ⁺	4,9		
CD207 ⁺ CD80 ⁺ HLA-DR ⁺	0,3		

Результаты исследования свидетельствуют _____

The results of the observation _____

Для врача _____

For the doctor _____

анализ проводил _____

The analysis conducted _____

Рисунок 1. Результаты цитоиммунограммы кожи на бланке

Figure 1. Results of the skin citoimmunogram (standart form)

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФЕНОТИПА КЛЕТОК БИОПТАТА КОЖИ ИЗ НАТИВНОГО И КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО ОБРАЗЦА

TABLE 1. COMPARATIVE EVALUATION OF PHENOTYPE OF SKIN BIOPSY CELLS FROM NATIVE AND CRYOPRESERVED SAMPLES

Клеточный состав кожи Cellular composition of the skin	Локализация Localization	Фенотип Phenotype	Нативный образец (%) The native sample (%)	Размороженный образец (%) Thawed sample (%)
Кератиноциты Keratinocytes	эпидермис epidermis	CD49 ⁺	70,25±3,75	68,2±2,01
Активированные кератиноциты Activated keratinocytes		CD49 ⁺ HLA-DR ⁺	3,25±0,75	1,3±0,04***
Фибробласты Fibroblasts	дерма dermis	CD45 ⁺ CD14 ⁺ CD44 ⁺	76,5±3,5	66,8±4,0*
Активированные фибробласты Activated fibroblasts		CD45 ⁺ CD14 ⁺ CD44 ⁺ CD80 ⁺	4,93±2,47	3,5±0,2
Эпидермальные клетки Лангерганса Epidermal Langerhans cells	эпидермис дерма epidermis dermis	CD207 ⁺	48±1,0	46,4±1,2
Активированные клетки Лангерганса Activated Langerhans cells		CD207 ⁺ CD80 ⁺ HLA-DR ⁺	3,8±0,9	0***
		CD207 ⁺ CD80 ⁺ HLA-DR ⁻ CD207 ⁺ CD80 ⁺ HLA-DR ⁺	5,1±1,1 0	1,3±0,05*** 3,5±0,9***
Эндотелиальные клетки Endothelial cells	дерма dermis	CD146 ⁺	1,32±0,98	0,6±0,03***
Активированные эндотелиальные клетки Activated endothelial cells		CD146 ⁺ CD54 ⁺ HLA-DR ⁺	0	0
		CD146 ⁺ CD54 ⁺ HLA-DR ⁻ CD146 ⁺ CD54 ⁺ HLA-DR ⁺ CD146 ⁺ CD34 ⁺	22,88±2,52 0,33±0,17 6,93±1,07	50,0±4,6** 0* 36,0±5,2***
Тучные клетки Mast cells	эпидермис epidermis	CD249 ⁺	3,43±1,77	2,5±0,99
Активированные тучные клетки Activated mast cells		CD249 ⁺ CD63 ⁺	1,1±0,2	1,6±0,3
Моноциты (Макрофаги) Monocytes (Macrophages)	дерма dermis	CD45 ⁺ CD14 ⁺	7,75±1,25	5,6±1,01
Активированные моноциты (Макрофаги) Activated monocytes (Macrophages)		CD45 ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	0,23±0,16	0***
Эпидермальные лимфоциты Т-общие Epidermal lymphocytes T common	эпидермис дерма epidermis dermis	CD45 ⁺ CD3 ⁺	14,0±1,0	11,2±1,99
Т-хелперы T helpers		CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	11,0±1,0	9,9±0,75
Т-цитотоксические T cytotoxic		CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	2,5±0,5	1,3±0,22*
В-лимфоциты B lymphocytes		CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺	6,0±1,0	7,0±1,05
НК-клетки NK cells		CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	10,5±1,5	9,5±1,14

Примечание. Достоверность различия по сравнению с нативным образцом: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001.
Note. Significance of differences as compared to the native sample, *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

1 этап – исследовался биоптат с ягодичной области патентованным способом;

2 этап – исследовался криоконсервированный аналог биоптатов.

В результате исследования впервые из общей гетерогенной популяции клеток кожи были получены отдельные субпопуляции и определен фенотип клеток из нативного и криоконсервированного образца (табл. 1).

Жизнеспособность в нативном образце составила 99,8%, после криоконсервации – 87,0%. При сравнении данных процентного соотношения клеток кожи двух образцов существенного расхождения в показателях не обнаружено, за исключением клеток, экспрессирующих на своей поверхности HLA-DR антигены и молекулы адгезии, то есть являющихся антигенпрезентирующими.

Наблюдение третье – сравнительная характеристика количества кератиноцитов эпидермиса и фибробластов дермы

Основными звеньями иммунной системы кожи являются кератиноциты и фибробласты, которые регулируют физиологические функции кожи, а продуцируемые ими вещества – сигнальными молекулами для локальной координации межклеточных и межтканевых взаимодействий. Причем эти субпопуляции клеток кожи являются резидентами разных ее слоев, а их согласованное взаимодействие определяет способность поддерживать гомеостаз кожи и реагировать на воздействие внешней и внутренней среды. В качестве

примера мы демонстрируем наблюдение количества кератиноцитов и фибробластов в исследуемых образцах (табл. 2).

Как видно, количество кератиноцитов в эпидермисе с течением времени уменьшается. Результаты достоверны в группах сравнения 25-45 и 45-65 у обоих полов, а также в группах сравнения 25-45 и 45-65 между мужчинами и женщинами. Необходимо отметить, что у мужчин количество кератиноцитов в эпидермисе больше, чем у женщин, на 4%. Это можно объяснить тем, что анатомически толщина кожи у мужчин выражена значительно больше, чем у женщин. Причем у мужчин количество кератиноцитов в эпидермисе с возрастом уменьшается на 16,3%, а у женщин на 23,6%. Такое снижение клеток, возможно, связано с различием гормонального фона между полами.

Количество фибробластов в дерме также демонстрирует возрастное снижение. Результаты достоверны в группах сравнения 25-45 и 45-65 у обоих полов, а также в группах сравнения 25-45 и 45-65 между мужчинами и женщинами. У мужчин количество клеток больше по сравнению с женщинами на 4%. Динамика снижения с возрастом – у мужчин количество фибробластов в дерме уменьшается на 13,9%, а у женщин – на 17%.

В большей степени происходит снижение количества кератиноцитов в эпидермисе, чем фибробластов в дерме. Причем у женщин эти изменения более выражены с возрастом. Скорее всего,

ТАБЛИЦА 2. ПОЛОВОЗРАСТНАЯ КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЕРАТИНОЦИТОВ ЭПИДЕРМИСА И ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ ОБСЛЕДОВАННОГО КОНТИНГЕНТА

TABLE 2. GENDER/AGE-RELATED QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF EPIDERMAL KERATINOCYTES AND DERMAL FIBROBLASTS OF THE GROUPS EXAMINED

Возраст, лет Age, years	25-45	45-65
Кератиноциты эпидермиса Epidermal keratinocytes		
мужчины men	69,9±0,96	58,5±1,18***
женщины women	66,88±0,47	51,1±1,9***
Фибробласты дермы Dermal fibroblasts		
мужчины men	74,25±1,1	63,9±1,0***
женщины women	71,25±0,34	59,1±0,9***

Примечание. Достоверность сравнения с контрольной группой: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; * – p < 0,001.**

Note. Significance of differences when compared to the control group, *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001

это связано с тем, что кожа является гормонально зависимым органом, но эти результаты предстоит определить точнее.

Обсуждение

Таким образом, предлагаемый способ позволяет получить информацию о количественном составе и функциональной активности клеток кожи, что объективно свидетельствует о текущем статусе местного иммунитета пациента и может стать основой для лечебно-профилактической программы, разработанной индивидуально.

Цитоиммунограмма кожи, как способ диагностики кожи, проста в исполнении и доступна, позволяет оценить качественный и количественный состав ее отдельных субпопуляций клеток, оценить их функцию и степень их реагирования в ответ на какие-либо воздействия внешней и внутренней среды.

Изобретение цитоиммунограммы кожи открывает для практической дерматологии и косметологии путь к новому пониманию процессов, проходящих в коже человека, дает возможность количественно оценить показатели состояния

кожи не только в рамках отдельного человека, но и в рамках популяции, не только в условиях нормы, но, что немаловажно, в условиях патологии. Тем более что в роли системы хемокинов в коже, например в патогенезе псориаза, уже нет никаких сомнений [2].

Возможность исследовать криоконсервированный образец позволяет сделать повторное исследование спустя некоторое время или после каких-либо процедур, воздействий, применении наружных препаратов или косметических средств и, сравнив данные, позволит врачу объективно оценивать изменения.

Широкомасштабное применение цитоиммунограммы в перспективе позволит создать популяционно-возрастной регистр состояния кожи в норме и патологии, что позволит определять степень реагирования кожи на воздействия среды, измерять активность клеточных субпопуляций нативной кожи в условиях нормы и патологии, использовать критерий возрастных изменений кожи, объективно оценивать динамику заболевания кожи, индивидуально подбирать лекарственный препарат и контролировать эффективность применяемых наружных лекарственных средств.

Список литературы / References

1. Агафонова С.Г., Индилова Н.И., Иванова Е.В., Гуткин Д.В., Ткаченко С.Б. Неинвазивные методы диагностики в дерматологии и дерматокосметологии // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология, 2010. № 4. С. 41-45. [Agafonova S.G., Indilova N.I., Ivanova E.V., Gutkin D.V., Tkachenko S.B. Noninvasive diagnostic techniques in dermatology and dermatocosmetology. *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya dermatokosmetologiya = Experimental and Clinical Dermatocosmetology*, 2010, no. 4, pp. 41-45. (In Russ.)]
2. Бельтюкова А.С., Сысоев К.А., Ильина Т.Н., Шемеровская Т.Г., Хобейш М.М., Монахов К.Н., Тотолян Арег А. Экспрессия мРНК хемокинов и хемокиновых рецепторов в коже больных псориазом // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 4-5. С. 337-346. [Beltiukova A.S., Syssoev K.A., Ilyina T.N., Shemerovskaya T.G., Hobeish M.M., Monakhov K.N., Totolian Areg A. Expression of mRNAs for chemokines and chemokine receptors in the skin from patients with psoriasis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 4-5, pp. 337-346. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-4-5-337-346.
3. Боровик Т.Э., Макарова С.Г., Дарчия С.Н., Гамалева А.В., Грибакин С.Г. Кожа как орган иммунной системы // Педиатрия, 2010. Т. 89, № 2. С. 132-136. [Borovik T.E., Makarova S.G., Darchiya S.N., Gamaleeva A.V., Gribakin S.G. Skin as an organ of the immune system. *Pediatriya = Pediatrics*, 2010, Vol. 89, no. 2, pp. 132-136. (In Russ.)]
4. Гусак В.К., Николенко Ю.И., Фисталь Э.Я., Попандопуло О.М. Иммунная компетентность кожи как один из механизмов развития аутоагрессии при термических повреждениях // Вестник гигиены и эпидемиологии, 2000. Т. 4, № 2. С. 256-261. [Gusak V.K., Nikolenko Yu.I., Fistal E.Ya., Popandopulo O.M. Immune competence of the skin as one of the mechanisms of development of autoaggression during thermal damage. *Vestnik gigiyeny i epidemiologii = Bulletin of Hygiene and Epidemiology*, 2000, Vol. 4, no. 2, pp. 256-261. (In Russ.)]
5. Золотенкова Г.В., Ткаченко С.Б., Пиголкин Ю.И. Современные неинвазивные методы оценки возрастных изменений кожи // Судебно-медицинская экспертиза, 2015. Т. 58, № 1. С. 26-30. [Zolotenkova G.V., Tkachenko S.B., Pigolkin Yu.I. The modern non-invasive methods for the evaluation of the age-specific changes in the skin. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza = Forensic-Medical Examination*, 2015, Vol. 58, no. 1, pp. 26-30. (In Russ.)]
6. Козлова Н.Н., Прокопенко В.Д. Кожа как иммунный орган // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2006. № 4. С. 34-40. [Kozlova N.N., Prokopenko V.D. The skin as an organ of immunity. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2006, no. 4, pp. 34-40. (In Russ.)]

7. Резайкин А.В., Кубанова А.А., Резайкина А.В. Неинвазивные методы исследования кожи // Вестник дерматологии и венерологии, 2009. № 6. С. 28-32. [Rezaikin A.V., Kubanova A.A., Rezaikina A.V. Non-invasive skin examination methods. *Vestnik dermatologii i venerologii = Bulletin of Dermatology and Venerology*, 2009, no. 6, pp. 28-32. (In Russ.)]

8. Тимофеев Г.А. Методы аппаратного исследования кожи человека // Косметика и медицина, 2005. № 4. С. 30-38. [Timofeev G.A. Methods of hardware research of human skin. *Kosmetika i meditsina = Cosmetics and Medicine*, 2005, no. 4, pp. 30-38. (In Russ.)]

9. Ткаченко С.Б. Потехаев Н.Н. Старение кожи. Теория свободных радикалов // Клиническая дерматология и венерология, 2003. № 4. С. 85-88. [Tkachenko S.B. Potekayev N.N. Skin aging. Theory of free radicals. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya = Clinical Dermatology and Venerology*, 2003, no. 4, pp. 85-88. (In Russ.)]

Авторы:

Гольцов С.В. — к.м.н., доцент, дерматолог,
Многопрофильное медицинское учреждение NEO-Clinic,
г. Тюмень, Россия

Гольцова Е.Н. — к.м.н., дерматокосметолог,
Многопрофильное медицинское учреждение NEO-Clinic,
г. Тюмень, Россия

Суховей Ю.Г. — д.м.н., профессор, иммунолог,
Тюменский филиал Института клинической
иммунологии, г. Тюмень, Россия

Костоломова Е.Г. — к.б.н., биолог, Тюменский филиал
Института клинической иммунологии, г. Тюмень,
Россия

Паульс В.Ю. — к.т.н., доцент, инженер,
Многопрофильное медицинское учреждение NEO-Clinic,
г. Тюмень, Россия

Поступила 11.08.2017

Отправлена на доработку 25.09.2017

Принята к печати 16.10.2017

Authors:

Goltsov S.V., PhD (Medicine), Associate Professor
(Dermatology), Multidisciplinary Medical Institution NEO-
Clinic, Tyumen, Russian Federation

Goltsova E.N., PhD (Medicine), Dermatologist/Cosmetologist,
Multidisciplinary Medical Institution NEO-Clinic, Tyumen,
Russian Federation

Sukhovey Yu.G., PhD, MD (Medicine), Professor,
Immunologist, Institute of Clinical Immunology, Tyumen
Branch, Tyumen, Russian Federation

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Biologist, Institute of
Clinical Immunology, Tyumen Branch, Tyumen, Russian
Federation

Pauls V.Yu., PhD (Technology), Associate Professor, Engineer,
Multidisciplinary Medical Institution NEO-Clinic, Tyumen,
Russian Federation

Received 11.08.2017

Revision received 25.09.2017

Accepted 16.10.2017

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., Кит О.И.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Для поиска эффективных мишеней для иммунотерапии рака молочной железы, на основе раково-тестикулярных антигенов (РТА), необходим анализ ассоциации экспрессии генов РТА с клинико-патологическими характеристиками РМЖ. Поэтому целью нашего исследования стал скрининг РТА, специфичных для опухолевых тканей молочной железы (люминальных типов А и В), на основании анализа их транскрипционного профиля у пациенток разного возраста. Для исследования использовали парные операционные биоптаты (норма и опухоль) тканей молочной железы 32 пациенток (64 образца) в возрасте от 38 до 86 лет. Методом RT-qPCR определяли относительную экспрессию 16 генетических локусов: *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SYCP1* и *PRAME1*. Обнаружено, что транскрипционный профиль РТА отличается в разных возрастных группах пациенток: до 55 лет наблюдалась гиперэкспрессия локуса *MAGEA3*, а старше 55 лет – *MAGEA1*, *MAGEB1*, *BAGE*, *NY-ESO1*, *GAGE1* и *GAGE3*. В тканях РМЖ люминального типа А обнаружена повышенная экспрессия РТА-локусов – *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1* и *PRAME1*, а в тканях РМЖ люминального типа В-генов с повышенной экспрессией не обнаружено. Данные отличия необходимо учитывать при планировании иммунотерапии, а также использовать в качестве биомаркеров процессов малигнизации как для РМЖ в целом, так и для его отдельных подтипов.

Ключевые слова: экспрессия генов, Real-Time qPCR, раково-тестикулярные антигены, рак молочной железы, иммунотерапия

TRANSCRIPTIONAL PROFILE OF CANCER-TESTICULAR ANTIGENS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

Vodolazhskiy D.I., Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A., Kit O.I.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. To identify new effective targets for immunotherapy of breast cancer, based on cancer-testis antigens (CTA), the associations were studied between CTA gene expression, clinical and pathological characteristics of breast cancer. Therefore, the aim of the study was to perform screening of CTAs specific to breast tissue tumors (luminal types A and B) based on assessment of the transcriptional profile of cancer-testis genes in the patients of different ages. To evaluate these relations, paired surgical biopsies (normal and tumor) of breast tissue of 32

Адрес для переписки:

Кутилин Денис Сергеевич
ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ
344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63, корп. 8.
Тел.: 8 (863) 300-02-00 (доб. 472).
E-mail: k.denees@yandex.ru

Address for correspondence:

Kutilin Denis S.
Rostov Research Institute of Oncology
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don,
14th Line, 63, bldg 8.
Phone: 7 (863) 300-02-00 (add. 472).
E-mail: k.denees@yandex.ru

Образец цитирования:

Д.И. Водолажский, Д.С. Кутилин, Х.А. Могушкова, О.И. Кит «Транскрипционный профиль раково-тестикулярных антигенов у больных раком молочной железы» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 383-390. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390

© Водолажский Д.И. и соавт., 2018

For citation:

D.I. Vodolazhskiy, D.S. Kutilin, Kh.A. Mogushkova, O.I. Kit "Transcriptional profile of cancer-testicular antigens in patients with breast cancer", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 383-390. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390

patients (64 samples) aged 38–86 years were used. Relative expression of 16 genetic loci (*MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SYCP1* and *PRAME1*) was determined by the RT-qPCR. It was found that the transcriptional profile of CTA differs in different age groups of patients (at the age of < 55 years, overexpression of *MAGEA3* was noted; after 55 years, *MAGEA1*, *MAGEB1*, *BAGE*, *NY-ESO1*, *GAGE1* and *GAGE3* were more expressed). In the luminal type A cancer, overexpression of *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1* and *PRAME1*, whereas in B type cancer, the genes with increased expression were not detected. These differences should be considered when planning immunotherapy, can be used as biomarkers for both breast cancer as clinical entity, and, in particular, for its individual subtypes.

Keywords: gene expression, real-time qPCR, cancer-testicular antigens (CTA), breast cancer, immunotherapy

Введение

В мире ежегодно регистрируют приблизительно 1 млн новых случаев заболевания раком молочной железы (РМЖ) [4]. В Российской Федерации рак молочной железы является самым распространенным злокачественным новообразованием у женщин: в 2013 году было выявлено 57 307 новых случаев заболевания, а число умерших составило более 20 000 пациентов [2]. Рак молочной железы – гетерогенное заболевание, включающее в себя как наследственные, так и спорадические формы [5].

Прогнозирование развития рецидивов и метастазирования РМЖ после первичного лечения представляет собой серьезную и нерешенную проблему [7]. Одним из возможных подходов к профилактике метастазирования и рецидивов онкологических заболеваний, в том числе РМЖ, является иммунотерапия. В настоящее время иммунотерапевтические курсы при РМЖ чаще используются при лечении онкологических заболеваний на поздней стадии развития и в основном направлены на антигены, экспрессирующиеся немалигнизированными клетками и сверх-экспрессирующиеся раковыми клетками [11]: MUC1, раково-эмбриональный антиген (CEA) и HER2 и др. [1]. Иммунотерапия РМЖ, направленная на раково-тестикулярные антигены (РТА), может быть более специфичной и поэтому намного более эффективной, чем на вышеперечисленные опухолевые антигены. Иммунный ответ может быть стимулирован адьювантами, эпигенетическими (деметирующими) препаратами и анти-CTLA-4-терапией. Результаты анализа базы данных клинических испытаний www.clinicaltrials.gov показали, что до настоящего времени было проведено небольшое количество испытаний вакцин, направленных на РТА: MAGE-A12 с адьювантом Montanide ISA-51, NY-ESO-1 – CNP-NY-ESO-1 с иммуноадьювантом OK-432, NY-ESO-1 – CDX-1401 в комбинации с Resiquimod и/или poly-ICLC (Hiltonol) [8]. Таким образом, иммунотерапевтические подходы, направленные на РТА при РМЖ, находятся в начальной стадии разработок.

В рутинной клинической практике выбор лечебных воздействий основан на стандартных

прогностических факторах: возраст, наступление менопаузы, размер опухоли, степень ее злокачественности, рецепторный статус стероидных гормонов и HER2/neu, мутационный статус генов *BRCA 1/2*, наличие/отсутствие метастазов в локальных лимфатических узлах. Однако стандартные подходы не всегда способны эффективно предсказать оптимальный терапевтический подход для лечения заболевания. Для некоторых раково-тестикулярных антигенов в результате многочисленных исследований было выявлено их прогностическое значение, которое может быть использовано для уточняющей диагностики РМЖ [1, 9, 14, 15, 16, 19].

В нескольких исследованиях по РМЖ было доказано, что частота экспрессии РТ-антигенов (РТА) выше в низкодифференцированных опухолях [14], а в исследовании Grigoriadis A. и соавт. [12] было обнаружено, что РТА разных классов (СТ-Х, non-Х) по-разному экспрессируются в разных подгруппах опухолей молочной железы. Однако исследования РТ-генов и РТА в основном ограничены семействами MAGE-A и NY-ESO-1. Следовательно, анализ ассоциации экспрессии других РТ-генов в РМЖ с клинико-патологическими характеристиками необходим для идентификации новых, более специфичных маркеров прогрессии РМЖ и мишеней для иммунотерапии.

Целью нашего исследования стал скрининг РТА, специфичных для опухолевых тканей молочной железы (люминальных типов А и В) на основании анализа паттерна транскрипционных профилей раково-тестикулярных генов у пациенток с РМЖ разного возраста.

Материалы и методы

В исследовании использованы парные операционные биоптаты 32 пациенток (64 образца) в возрасте от 38 до 86 лет, поступивших на лечение в ФГБУ РНИОИ МЗ РФ в 2015–2017 гг.: прилегающие к опухоли немалигнизированные (норма) и собственно опухолевые ткани молочной железы. Образцы для транспортировки в лабораторию и хранения мгновенно замораживали в жидком азоте без использования крио-/транспортных РНК-сред. Максимальное время

от взятия образца до его заморозки в жидком азоте составляло не более 20 с. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ РНИОИ; в каждом конкретном случае было получено информированное согласие больного на включение его в данное исследование.

Фрагменты ткани измельчали и растирали в фарфоровых ступках в лизирующем растворе, содержащем 4 М гуанидин тиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,5% саркозили и 0,1 М 2-меркаптоэтанол. Дальнейшее выделение РНК из тканей проводили по методу Р. Chomczynski и N. Sacchi [10]. Для удаления следов геномной ДНК полученные образцы суммарной РНК обрабатывали препаратами ДНК-азы. Синтез кДНК проводили с использованием коммерческих наборов Reverta-L («Интерлабсервис», Россия). Методом RT-qPCR определяли величины относительной экспрессии 16 генетических локусов: *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SYCP1* и *PRAME1*. В качестве референсного использовали ген *GAPDH*. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров (табл. 1) осуществлялся нами с использованием референсных последовательностей NCBI GenBank и программы Primer-BLAST на основе следующих принципов: область отжига олигонуклеотидных праймеров должна быть в диапазоне 58-60 °С; GC-состав в диапазоне 40-60%; в последовательности прай-

мера должны отсутствовать стабильные вторичные структуры – шпильки и димеры, e-value последовательности праймера должно стремиться к нулю и быть не больше 0,05, а query coverage (покрытие целевой последовательности) 100% (для версии BLASTN 2.3.1+), температуры отжига праймеров (Forward и Reverse) не должны различаться друг от друга более чем на 0,50. При подборе праймеров учитывался сплайсинг мРНК (использовали опцию "Primer must span an exon-exon junction" программы Primer-BLAST) [3].

Полученную библиотеку кДНК амплифицировали в 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,25 мМ каждого из dNTP, 2,5 мМ MgCl₂, 1х-ый ПЦР-буфер и 1 ед. акт. SynTaq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Россия), краситель EVA-Green и по 400 нМ прямого и обратного праймеров для референсного гена (*GAPDH*) или гена-мишени. Количественную RT-PCR-амплификацию проводили на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: первичная денатурация: t = 95 °С в течение 3 мин; 40 циклов: t = 95 °С в течение 10 с, t = 58 °С в течение 30 с (регистрация сигнала), t = 72 °С в течение 30 с. Относительную экспрессию генетического локуса (RE) рассчитывали по формуле $RE = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ [3, 17]. Нормализацию проводили по референсному гену *GAPDH* и экспрессии соответствующих генов в образцах

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СПЕЦИФИЧНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ

TABLE 1. SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PRIMER SEQUENCES USED IN THIS STUDY

№	Название генетического Локуса Locus name	Последовательности праймеров 5'→3' Primer sequences 5'→3'	
		Прямой Sense	Обратный Antisense
1	<i>MAGEA1</i>	GAAGGAACCTGACCCAGGC	AGGGAATCCTGTCCTCTGGG
2	<i>MAGEA2</i>	CGCAGGCTCCGTGAGG	CTGTGTTGACCTGAGTCACCT
3	<i>MAGEA3</i>	TGAGCAACGAGCGACGG	TCAGCCTGTCCCCTCAGAA
4	<i>MAGEB1</i>	TTCAGTGTGGTGTCCAGCAG	CGAGTTGTA CTCTGGATGATCT
5	<i>MAGEB2</i>	AGCCAGGGGTGAATTCTCAG	GGCACGGAGCTTACTCTTCT
6	<i>GAGE-1</i>	CTGATGGGCAGGAGATGGAC	CCAGTCTGGGCAACATAGTGA
7	<i>GAGE3</i>	TCACACAGATGAGTTGGCGA	CTGTGTGAAATATGAGTTGGCGA
8	<i>GAGE4</i>	GAGGAGGTGAAAACGCCTGA	GCATCATTTCAACGTGCCTTCT
9	<i>MAGEC1</i>	ACGAGGATCGTCTCAGGTCA	CCAGGTCTTCAACTCCTGCT
10	<i>MAGEA4</i>	CTGACCAGCAGCTTGGGAT	TCCAGGGAATCCTGTCTCTCC
11	<i>BAGE</i>	GCCGGCTCCTTTCAGGATT	ACATCTTTCAGGAGCTTGGTCA
12	<i>NY-ESO1</i>	TCACTGTGTCCGGCAACATA	TGATGGAGAGCTGCAGTTGG
13	<i>XAGE3</i>	ACTTGCCCTGAGACTTAGTTCCG	ACTTGCCCTGAGACTTAGTTCCG
14	<i>SSX2</i>	CACGGTTGGTGTCTCAAATACC	CCGAGGCTTTCATCTTTTCCC
15	<i>SYCP1</i>	CGGTGAAACCTCAGACCCT	AGTCTTTGCAAATGGAAACTCAAA
16	<i>PRAME1</i>	GCTGAGCCATTGTCTCGTTC	AGGTCTCAGTCACTTGTGGCC
17	<i>GAPDH</i>	GTCAGGCTGAGAACGGGAA	TCGCCCCACTTGATTTTGGGA

нормальной ткани, последовательно по схеме, приведенной ниже:

1. Нормализация по референсному гену:
 $\Delta C(t) = C(t)_{\text{target}} - C(t)_{\text{reference}}$

2. Расчет медианы $\Delta C(t)$ по каждому гену для контрольной (условно нормальной) и опытной (опухолевой) групп.

3. Нормализация по контрольной группе:
 $\Delta \Delta C(t) = \Delta C(t)_{\text{Медиана опытной группы}} - \Delta C(t)_{\text{Медиана контрольной группы}}$

4. Окончательный результат (кратное различие): $2^{-\Delta \Delta C(t)}$ [3].

Статистический анализ результатов выполняли с использованием пакета прикладных статистических программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США) и STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США). Статистическую значимость различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Нулевую статистическую гипотезу об отсутствии различий отвергали при $p < 0,05$.

Для проведения статистического анализа пациентки были разбиты на следующие независимые группы:

1) группа А(1) – пациентки с возрастом до 55 лет (медиана возраста 45 лет, $n = 18$) и группу Б(2) – пациентки с возрастом старше 55 лет (медиана возраста 68 лет, $n = 14$);

2) группа пациенток В (3) с гистологически подтвержденным диагнозом РМЖ люминального типа А (16 пациенток) и группа Г(4) – пациентки с люминального типа В (16 пациенток).

Статистический анализ проводили с использованием критерия Манна–Уитни.

Результаты

В ходе проведенного исследования обнаружено статистически достоверное ($p < 0,005$) увеличение транскрипционной активности генов РТА *MAGEA3* в 2,7 раза (у 65% пациентов), *MAGEA4* в 2,7 раза (у 41% пациентов) и *GAGE3* в 2,9 раза (у 57% пациентов) в опухолевой ткани молочной железы относительно нормальной ткани у пациенток объединенной группы ($n = 32$, рис. 1).

Следующие результаты были получены при разделении общей группы пациенток в зависимости от возраста на две группы: группа А – пациентки не старше 55 лет (пременопаузальная группа, медиана возраста 45 лет, $n = 18$) и группа Б – пациентки старше 55 лет (постменопаузальная группа, медиана возраста 68 лет, $n = 14$). В группе А наблюдалось статистически достоверное увеличение экспрессии гена *MAGEA3* в 2,8 раза ($p < 0,05$, у 60% пациентов), в группе Б – достоверное ($p < 0,05$) увеличение экспрессии генов *MAGEA1*, *MAGEB1*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE* и *NY-ESO1* в 6,0 (у 75% пациентов), 3,2 (у 65% пациентов), 4,3 (у 75% пациентов), 9,9 (у 75% пациентов), 1,6 (у 63% пациентов) и в 4,0 (у 75% пациентов) раза, соответственно, в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью молочной железы (рис. 2).

При сравнении пациенток с РМЖ люминальных типов А и В были получены следующие результаты:

1) у пациенток с РМЖ люминального типа А обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение экспрессии генов РТА *MAGEA1* в 6,2 раза, *MAGEA2* в 3,5 раза, *MAGEA4*

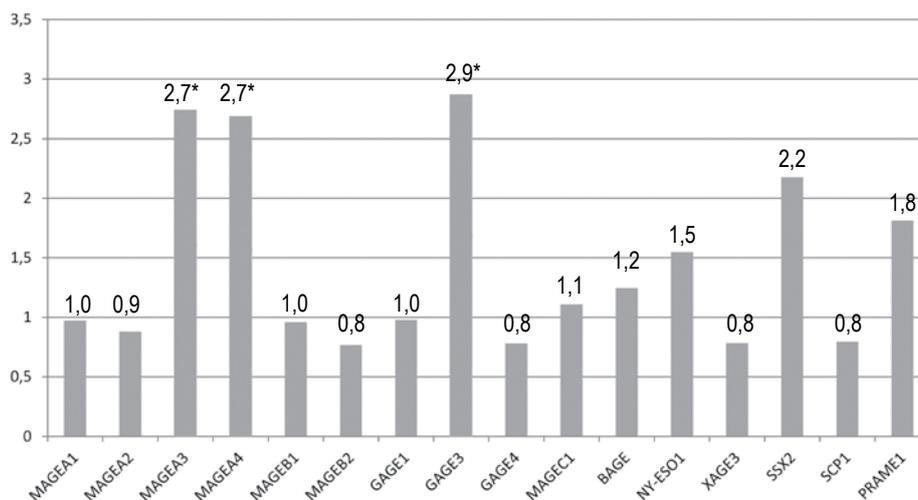


Рисунок 1. Соотношение экспрессии генов РТА в опухолевой ткани относительно нормальной у пациенток в возрасте 38-86 лет ($n = 32$)

Примечание. * – статистически достоверные ($p < 0,005$) отличия.

Figure 1. The CTA gene expression ratio in tumor tissue relative to normal tissue in patients aged 38-86 years ($n = 32$)

Note. *, statistically significant differences ($p < 0.005$).

в 14,9 раза, *MAGEB1* в 15,0 раза, *MAGEB2* в 4,1 раза, *GAGE3* в 36,2 раза, *GAGE4* в 8,5 раза, *MAGEC1* в 9,7 раза и *PRAME1* в 30,4 раза в опухолевой ткани относительно нормальной ткани (рис. 3А);

2) у пациенток с РМЖ люминального типа В обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение транскрипционной активности генов РТА *MAGEB2* и *GAGE4* в 8,0 и 3,0 раза, соответственно, в опухолевой ткани относительно нормальной ткани. Достоверного изменения экспрессии других РТА генов не обнаружено (рис. 3Б).

Обсуждение

В объединенной группе пациенток с РМЖ обнаружена статистически значимая гиперэкспрес-

сия только 3 из 16 исследованных генетических локусов: *MAGEA3*, *MAGEA4* и *GAGE3*, причем у 22% пациенток наблюдается одновременная гиперэкспрессия этих локусов, у 16% – только гиперэкспрессия *MAGEA3* и *GAGE3*, у 6% – только *GAGE3*, у 16% – только *MAGEA4*, у 11% – только *MAGEA3*, а у 29% пациенток экспрессия не одного из этих локусов не повышена. Следует отметить, что данные по гиперэкспрессии генов семейства *MAGEA* и *GAGE* при РМЖ подтверждаются в литературных источниках [1, 12, 16].

У пациенток разных возрастных групп обнаружен дифференциальный профиль экспрессии генетических локусов РТА, причем для возрастной группы пациенток до 55 лет характерно увеличение транскрипционной активности только

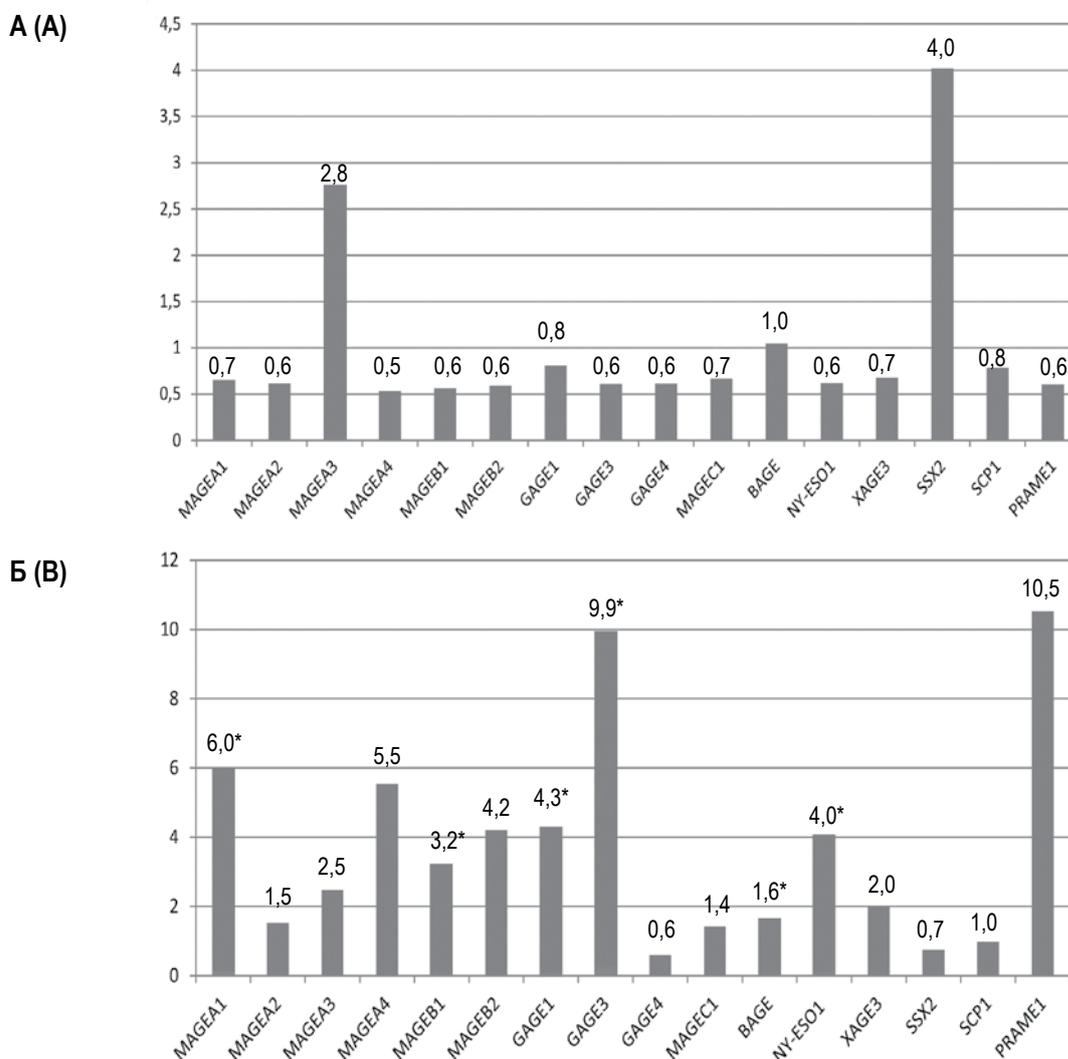


Рисунок 2. Соотношение экспрессии генов РТА в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью у пациенток: (А) не старше 55 лет (медиана возраста 45 лет, n = 18), (Б) старше 55 лет (медиана возраста 68 лет, n = 14)

Примечание. * – статистически достоверные ($p < 0,05$) отличия.

Figure 2. The CTA gene expression ratio when comparing tumor tissue with normal tissue in patients: (A) under 55 years old (median age = 45 years, n = 18), (B) older than 55 years (median age = 68 years, n = 14)

Note. *, statistically significant differences ($p < 0.05$).

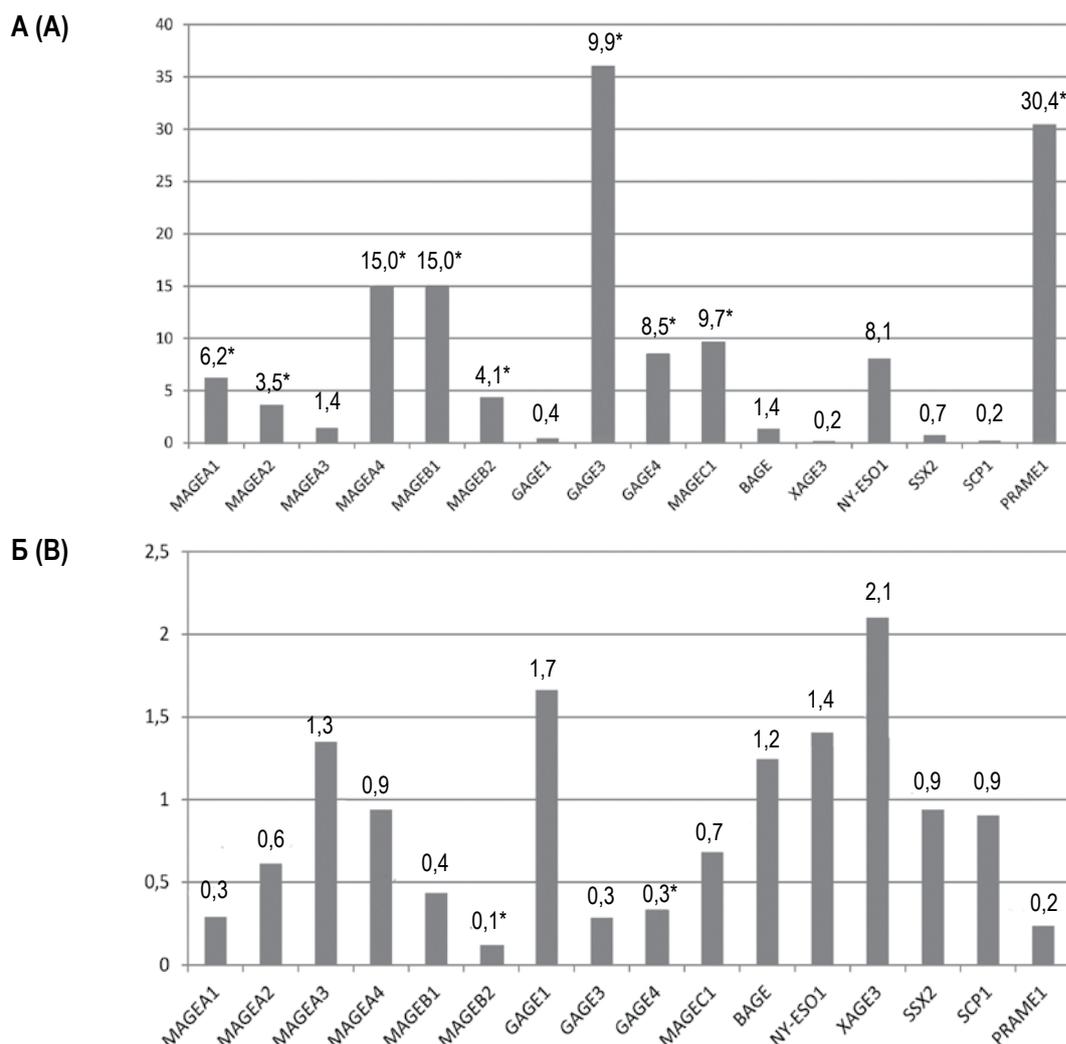


Рисунок 3. Соотношение экспрессии генов РТА в опухолевой ткани относительно нормальной у пациенток РМЖ: (А) люминального типа А (n = 16), (Б) люминального типа В (n = 16)

Примечание. * – статистически достоверные ($p < 0.05$) отличия.

Figure 3. The CTA gene expression ratio in tumor tissue compared to normal tissue in patients with breast cancer: A) luminal type A (n = 16), B) luminal type B (n = 16)

Note. *, statistically significant differences ($p < 0.05$).

1 локуса *MAGEA3*, относящегося к классу СТ-Х и тестикулярно-селективных РТА, а в группе пациенток старше 55 лет – 6 локусов (*MAGEA1*, *MAGEB1*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE* и *NY-ESO1*), относящихся как к классам СТ-Х и non-X, так и к тестикулярно-селективным и тестикулярно-ограниченным РТА. Обращает на себя внимание, что паттерны экспрессии РТА-локусов не совпадают при сравнении этих двух групп, и амплитуда отношения транскрипционной активности между опухолевой тканью и прилегающей к ней немалигнизированной тканью (условная норма) в группе пациенток старше 55 лет выражены значительно сильнее. Наличие возрастных особенностей в профиле экспрессии РТА можно объяснить изменением гормонального статуса пациенток после 55 лет (постменопаузальный период), а также использованием в исследовании

опухолей молочной железы двух типов люминального А и В, экспрессирующих, соответственно, выражено и умеренно рецепторы эстрогена.

Основываясь на данных, представленных в исследованиях Theurillat J.-P. и соавт. [19], Grigoriadis A. и соавт. [12], Sugita Y. и соавт. [18], Nama A. и соавт. [13] о связи экспрессии генов некоторых РТА (например, NY-ESO-1, MAGE-A3 и MAGE-A6) со статусом опухоли по наличию эстрогеновых рецепторов и рецепторов HER2/neu, интересно оценить значимую ассоциацию экспрессии более широкого спектра генов РТА с клинико-патологическими характеристиками не РМЖ в целом, а некоторых подгрупп РМЖ, в частности HER2-позитивных и HER2-негативных.

Сегодня выделяют две большие группы опухолей молочной железы, происходящие, соот-

ветственно, из базального (миоэпителиального) и люминального эпителия, которые можно отличить друг от друга по экспрессии специфических цитокератинов. Создана молекулярная классификация, согласно которой выделяют варианты РМЖ, различающиеся по прогнозу и чувствительности к различным видам лекарственной терапии [6]. Внутри люминальной подгруппы выделяют два варианта – люминальный А, наиболее прогностически благоприятный, и люминальный В, который примерно в 30% случаев является HER2-позитивным, оставшиеся 70% случаев люминального В РМЖ, имея формальные признаки люминального А варианта (т.е. ER(+) и/или PgR(+)/HER2/neu(-)) отличаются от него высоким пролиферативным потенциалом и в силу этого характеризуются неблагоприятным прогнозом, мало отличающимся от HER2(-) и тройного негативного вариантов.

В нашем исследовании опухоли люминального типа В в 100% случаев экспрессировали HER2/NEU (но в разной степени). Полученные нами закономерности в изменении транскрипционной активности РТА-локусов двух групп пациенток с люминальным А и люминальным В типом хорошо согласуются с прогнозом развития заболевания. В отличие от опухолей люминального типа А у опухолей люминального типа В не наблюдалось существенного увеличения транскрипционной активности исследованных РТА-локусов, что свидетельствует об их низком иммунотерапевтическом потенциале при лечении РМЖ данного типа. А достоверное снижение экспрессии генов *MAGEB2* и *GAGE4* может служить диагностическим маркером РМЖ люминального типа В, так же как и увеличение экспрессии 9 локусов при РМЖ люминального типа В.

Следует отметить, что часто используемый в качестве мишени для иммунотерапии *NY-ESO1*

в нашем исследовании показал повышенную экспрессию только у группы пациенток старше 55 лет. А анализ данных базы BioGPS (<http://ds.biogps.org/?dataset=GSE1133&gene=1485>) показал, что уровень экспрессии мРНК *NY-ESO1* (*CTAG1B*) достаточно высок в различных органах и тканях (например, сердечной мышце). Все это в совокупности может свидетельствовать о низкой эффективности и потенциально нежелательных системных эффектах подобной терапии.

Заключение

Обнаруженное увеличение экспрессии генов *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *BAGE*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGEC1*, *PRAME1*, *GAGE4* и *GAGE3* создает предпосылки для использования этих РТА в качестве наиболее эффективных мишеней при иммунотерапии РМЖ. Но для разных возрастных групп пациенток в качестве такой мишени выступают разные группы РТА: для пациенток до 55 лет – *MAGEA3*, для пациенток старше 55 лет – *MAGEA1*, *MAGEB1*, *BAGE*, *NY-ESO1*, *GAGE1* и *GAGE3*, так же как и для люминального типа А (*MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1* и *PRAME1*) и В (локусов с повышенной экспрессией не обнаружено).

Данные отличия транскрипционного профиля РТА, ассоциированные с возрастом и люминальным А/В типом РМЖ, необходимо учитывать при планировании и проведении иммунотерапии. Исходя из полученных нами данных, можно сделать предположение, что наибольшую экспрессию РТА-локусов будет проявлять группа пациенток старше 55 лет с люминальным типом А опухоли. Следовательно, именно эта группа пациенток должна иметь наилучший прогноз при терапии РМЖ с использованием дендритно-клеточных вакцин, ориентированных на эти РТА.

Список литературы / References

1. Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., Ващенко Л.Н., Никитина В.П., Кит О.И. Транскрипционная активность раково-тестикулярных антигенов у больных раком молочной железы люминальных подтипов А и В // *Современные проблемы науки и образования*, 2017. № 4. [Vodolazhskiy D.I., Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A., Vashchenko L.N., Nikitina V.P., Kit O.I. Transcriptional activity of cancer-testis antigens in patients with breast cancer of luminal subtypes A and B. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2017, no. 4. (In Russ.)]
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2013 году. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2014. 236 с. [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. Status of cancer care for the population of Russia in 2013]. Moscow: MNI OI them. P.A. Herzen, Ministry of Health and Social Development of Russia, 2014. 236 p.
3. Кутилин Д.С., Димитриади С.Н., Водолажский Д.И., Франциянц Е.М., Кит О.И. Влияние тепловой ишемии-реперфузии на экспрессию апоптоз-регулирующих генов в почечной ткани больных с почечно-клеточным раком // *Нефрология*, 2017. № 21 (1). С. 80-86. [Kutilin D.S., Dimitriadi S.N., Vodolazhskiy D.I., Frantsiyants E.M., Kit O.I. Effect of thermal ischemia-reperfusion on expression of apoptosis-regulating genes in the renal tissue of patients with renal cell carcinoma. *Nefrologiya = Nephrology (St. Petersburg)*, 2017, no. 21 (1), pp. 80-86. (In Russ.)]
4. Пак Д.Д., Усов Ф.Н., Фетисова Е.Ю., Волченко А.А., Ефанов В.В. Современные подходы к лечению больных с карциномой *in situ* молочной железы // *Онкология*, 2013. № 4. С. 34-39. [Pak D.D., Usov F.N., Fetisova E.Yu., Volchenko A.A., Efanov V.V. Current treatment options for breast carcinoma *in situ*. *Onkologiya = Herzen Journal of Oncology*, 2013, no. 4, pp. 34-39. (In Russ.)]
5. Пржедецкий Ю.В., Водолажский Д.И., Шатова Ю.С., Комова Е.А., Двадненко К.В. BRCA-мутации у больных с клиническими признаками наследственного рака молочной железы в Южном федеральном округе // *Злокачественные*

опухоли, 2015. Т. 16, № 4-2. С.196-197. [Przedetskiy Yu.V., Vodolazhskiy D.I., Shatova Yu.S., Komova E.A., Dvadenko K.V. In the RCA mutation in patients with clinical signs of hereditary breast cancer in the Southern Federal District. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors*, 2015, Vol. 16, no. 4-2, pp. 196-197. (In Russ.)]

6. Стенина М.Б., Фролова М.А. Рак молочной железы: наиболее важные научные события и выводы последних лет // Практическая онкология, 2011. № 12 (1). С. 6-11. [Stenina M.B., Frolova M.A. Breast cancer: the most important scientific events and conclusions of recent years. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*, 2011, no. 12 (1), pp. 6-11. (In Russ.)]

7. Ahmad A. Pathways to breast cancer recurrence. *ISRN Oncol.*, 2013, pp. 1-16.

8. Aoki M., Ueda S., Nishikawa H., Kitano S., Hirayama M., Ikeda H., Toyoda H., Tanaka K., Kanai M., Takabayashi A., Imai H., Shiraishi T., Sato E., Wada H., Nakayama E., Takei Y., Katayama N., Shiku H., Kageyama S. Antibody responses against NY-ESO-1 and HER2 antigens in patients vaccinated with combinations of cholesteryl pullulan (CHP)-NY-ESO-1 and CHP-HER2 with OK-432. *Vaccine*, 2009, no. 49, pp. 6854-6861.

9. Bandic D., Juretic A., Sarcevic B., Separovic V., Kujundzic-Tiljak M., Hudolin T., Spagnoli G.C., Covic D., Samija M. Expression and possible prognostic role of MAGE-A4, NY-ESO-1, and HER-2 antigens in women with relapsing invasive ductal breast cancer: retrospective immunohistochemical study. *Croat. Med. J.*, 2006, no. 1, pp. 32-41.

10. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 2006, no. 2, pp. 581-585.

11. Curigliano G., Locatelli M., Fumagalli L., Goldhirsch A. Immunizing against breast cancer: a new swing for an old sword. *Breast*, 2009, no. 18, pp. 951-954.

12. Grigoriadis A., Caballero O.L., Hoek K.S., da Silva L., Chen Y.T., Shin S.J., Jungbluth A.A., Miller L.D., Clouston D., Cebon J., Old L.J., Lakhani S.R., Simpson A.J., Neville A.M. CT-X antigen expression in human breast cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2009, no. 32, pp. 13493-13498.

13. Hamai A., Duperrier-Amouriaux K., Pignon P., Raimbaud I., Memeo L., Colarossi C., Canzonieri V., Perin T., Classe J.M., Campone M., Jezequel P., Campion L., Ayyoub M., Valmori D. Antibody responses to NY-ESO-1 in primary breast cancer identify a subtype target for immunotherapy. *PLoS ONE*, 2011, no. 6, e21129. doi: 10.1371/journal.pone.0021129.

14. Kavalari R., Sarcevic B., Spagnoli G.C., Separovic V., Samija M., Terracciano L., Heberer M., Juretic A. Expression of MAGE tumour-associated antigens is inversely correlated with tumour differentiation in invasive ductal breast cancers: an immunohistochemical study. *Virchows Arch.*, 2001, Vol. 439, no. 2, pp. 127-131.

15. Kruger S., Ola V., Feller A.C., Fischer D., Friedrich M. Expression of cancer-testis antigen CT7 (MAGE-C1) in breast cancer: an immunohistochemical study with emphasis on prognostic utility. *Pathol. Oncol. Res.*, 2007, no. 2, pp. 91-96.

16. Matkovic B., Juretic A., Spagnoli G.C., Separovic V., Gamulin M., Separovic R., Saric N., Basic-Koretic M., Novosel I., Kruslin B. Expression of MAGE-A and NY-ESO-1 cancer/testis antigens in medullary breast cancer: retrospective immunohistochemical study. *Croat. Med. J.*, 2011, no. 2, pp. 171-177.

17. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 2008, no. 3, pp. 1101-1108.

18. Sugita Y., Wada H., Fujita S., Nakata T., Sato S., Noguchi Y., Jungbluth A.A., Yamaguchi M., Chen Y.T., Stockert E., Gnjjatic S., Williamson B., Scanlan M.J., Ono T., Sakita I., Yasui M., Miyoshi Y., Tamaki Y., Matsuura N., Noguchi S., Old L.J., Nakayama E., Monden M. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in malignant and benign breast tumors. *Cancer Research*, 2004, no. 6, pp. 2199-2204.

19. Theurillat J.P., Ingold F., Frei C., Zippelius A., Varga Z., Seifert B., Chen Y.T., Jager D., Knuth A., Moch H. NY-ESO-1 protein expression in primary breast carcinoma and metastases: correlation with CD8⁺ T-cell and CD79a⁺ plasmacytic/B-cell infiltration. *Int. J. Cancer*, 2007, no. 11, pp. 2411-2417.

Авторы:

Водолажский Д.И. — к.б.н., руководитель лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Кутилин Д.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Могущкова Х.А. — аспирант ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Кит О.И. — д.м.н., профессор, генеральный директор ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Vodolazhskiy D.I., PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Kutinin D.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Mogushkova Kh.A., Research Fellow, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Kit O.I., PhD, MD (Medicine), Professor, General Director, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 14.09.2017

Принята к печати 25.09.2017

Received 14.09.2017

Accepted 25.09.2017

ФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНО- КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ДО И ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Куртасова Л.М.¹, Савченко А.А.^{1,2}, Зуков Р.А.¹, Толмачева Т.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

² ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения
Российской академии наук“, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт
медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение показателей активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови у больных почечно-клеточным раком (ПКР) в период до операции и в динамике через 14 и 30 дней после хирургического лечения. Обследованы пациенты в возрасте 45-55 лет с местно-распространенным ПКР в период до хирургического лечения, через 14 и 30 дней после оперативного вмешательства. Контрольную группу составили здоровые доноры аналогичного возрастного диапазона. Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ определяли с помощью биoluminesцентного метода с применением биферментного комплекса, выделенного из люминесцирующих бактерий. Установлены изменения ферментного профиля лимфоцитов периферической крови у больных ПКР в до и послеоперационном периоде. Метаболизм лимфоцитов у больных ПКР в дооперационном периоде характеризуется сниженной активностью пентозофосфатного цикла и глутатион-зависимой антиоксидантной системы. Изменение активности данных процессов может привести к снижению уровня реакций макромолекулярного синтеза в лимфоцитах и активации перекисных реакций. Обнаружено снижение активности анаэробной реакции лактатдегидрогеназы, что характеризует ингибирование терминальных реакций анаэробного гликолиза. Уровни метаболических реакций в лимфоцитах крови у больных ПКР в дооперационном периоде, определяющие интенсивность аэробного дыхания, соответствуют контрольным значениям, но выявляется увеличение интенсивности НАД-зависимого оттока субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена. В послеоперационном периоде у больных ПКР в лимфоцитах крови сохраняется низкая активность терминальных реакций анаэробного гликолиза, умеренно активизируется аэробная реакция лактатдегидрогеназы. В течение всего послеоперационного периода в лимфоцитах крови больных ПКР сохраняется повышенный НАД-зависимый отток субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена. Тем не менее наблюда-

Адрес для переписки:

Куртасова Людмила Михайловна
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный
медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-
Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 1.
Тел.: 8 (391) 220-06-28.
Факс: 8 (391) 221-16-38.
E-mail: sibmed-obozenie@yandex.ru

Address for correspondence:

Kurtasova Lyudmila M.
Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasensky Medical University
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan
Zheleznyak str., 1.
Phone: 7 (391) 220-06-28.
Fax: 7 (391) 221-16-38.
E-mail: sibmed-obozenie@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.М. Куртасова, А.А. Савченко, Р.А. Зуков, Т.В. Толмачева
«Ферментный спектр лимфоцитов периферической
крови у больных почечно-клеточным раком до и после
хирургического лечения» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 3. С. 391-400.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-391-400

© Куртасова Л.М. и соавт., 2018

For citation:

L.M. Kurtasova, A.A. Savchenko, R.A. Zukov, T.V. Tolmacheva
“Enzyme profile of peripheral blood lymphocytes in patients with the
renal cell carcinoma before and after surgical treatment”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20,
no. 3, pp. 391-400. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-391-400

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-391-400

ется значительное увеличение интенсивности терминальных реакций цикла Кребса, определяющее повышение активности аэробного дыхания, что является энергетически более выгодным для клеток. В то же время вызванное подобным перераспределением субстратных потоков «обеднение» метаболитами пентозофосфатного цикла в лимфоцитах у больных ПКР приводит к снижению пластических процессов в клетках. Даже через 30 дней после хирургического лечения сохраняется снижение глутатион-зависимой антиоксидантной защиты клеток. Следовательно, больные ПКР в послеоперационном периоде нуждаются в коррекции метаболических процессов в клетках иммунной системы, что необходимо учитывать при разработке реабилитационных программ у данной категории пациентов.

Ключевые слова: почечно-клеточный рак, лечение, лимфоциты, активность ферментов, метаболизм, энергетические процессы, пластический обмен

ENZYME PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH THE RENAL CELL CARCINOMA BEFORE AND AFTER SURGICAL TREATMENT

Kurtasova L.M.^a, Savchenko A.A.^{a, b}, Zukov R.A.^a, Tolmacheva T.V.^a

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

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

Abstract. The aim of the study was to investigate activities of NAD- and NADP-dependent dehydrogenases in peripheral blood lymphocytes of the patients with renal cell carcinoma (RCC) at the terms before surgery and 14 and 30 days after surgical treatment. The patients at the age of 45-55 years with locally advanced RCC were examined before surgical treatment, 14 and 30 days after surgery. The control group consisted of healthy donors of the same age range. Activity of NAD- and NADP-dependent dehydrogenases was determined by bioluminescence method using bienzyme complex isolated from luminescent bacteria. The enzyme profile changes of peripheral blood lymphocytes in the patients with RCC in pre- and postoperative period have been revealed. The lymphocyte metabolism in patients with RCC at the pre-operative period was characterized by decreased activity of pentose phosphate cycle, and glutathione-dependent antioxidant system. The changes in activity of these processes may lead to decreased levels of macromolecular synthetic reactions in the lymphocytes and activation of peroxide reactions. We have registered a decreased activity of lactate dehydrogenase anaerobic reaction which characterizes inhibition of the terminal anaerobic glycolysis reactions. The levels of metabolic reactions in blood lymphocytes from the RCC patients in preoperative period determining the intensity of aerobic respiration corresponded to control values, along with an increased intensity of the NAD-dependent substrates outflow from the tricarboxylic acid cycle to the amino acid exchange reaction. In the postoperative period in patients with RCC in blood lymphocytes the activity of the terminal reactions of the anaerobic glycolysis hold on, the aerobic lactate dehydrogenase reaction moderately activated. During the entire postoperative period, an increased outflow of NAD-dependent substrates from the tricarboxylic acid cycle to the amino acid exchange reaction is registered in blood lymphocytes of RCC patients. Nevertheless, there is a significant increase in the intensity of the Krebs cycle terminal reactions, which determines an increase in aerobic respiration activity being energetically more beneficial to the cells. At the same time, «impoverishment» of the pentose phosphate cycle metabolites in the lymphocytes of the patients with RCC, due to similar redistribution of the substrate flows, leads to decreased plastic processes in cells. Even 30 days after surgical treatment, a decrease remains in glutathione-dependent antioxidant protection of the cells. Therefore, the patients with RCC need correction of metabolic processes in the immune cells during postoperative period. This fact should be taken into account by developing rehabilitation programs in this category of the patients.

Keywords: renal cell carcinoma, treatment, lymphocytes, enzyme activity, metabolism, energy processes, plastic metabolism

Введение

Почечно-клеточный рак (ПКР) составляет более 90% всех злокачественных новообразований почки. При этом число случаев поздней диагностики рака почти в 3 раза выше, чем при других урологических новообразованиях, а результаты лечения данного заболевания до сих пор остаются неутешительными – у 40-50% больных в течение первого года лечения появляются метастазы [2, 3, 9].

В мире ежегодно диагностируется около 270 тыс. новых случаев ПКР, что соответствует 13-му месту в общей структуре онкологической заболеваемости [9, 20]. При сравнительном анализе территориальных особенностей заболеваемости и смертности от ПКР в Российской Федерации необходимо отметить, что наиболее высокие показатели наблюдаются в Сибирском федеральном округе (показатель заболеваемости составляет 15,45 на 100 тысяч населения, а показатель смертности – 6,59). Красноярский край по показателям заболеваемости ПКР находится на 8-м месте в Сибирском федеральном округе, а по смертности входит в пятерку лидеров [1, 3].

На сегодняшний день не вызывает сомнений участие иммунной системы в противоопухолевой защите [4, 6, 22]. Теория иммунологического надзора определяет наличие в иммунной системе постоянного мониторинга организма для обнаружения злокачественных трансформированных клеток, их элиминации либо подавления роста.

Учитывая, что все модуляторы функциональной активности лимфоцитов – основного структурно-функционального элемента иммунной системы – прежде всего, изменяют метаболизм клетки, переключая субстратные потоки с одного метаболического пути на другой, влияя на энергетические и синтетические процессы, нарушения иммунной системы не могут не иметь метаболической основы [8, 12, 14]. Известны результаты исследований, которые позволяют представить некоторые механизмы, связывающие внутриклеточные процессы в лимфоцитах с их функциональной активностью. Так, в работе Xu Y. et al. (2016) показано, что интенсивность субстратного потока по гликолизу регулирует трансляцию гипоксия-индуцибельного фактора 1 α (HIF1 α), который осуществляет потенциальный механизм контроля функции лимфоцитов периферической ткани [25]. Обосновывается, что экспрессия переносчика глюкозы (GLUT1) и, соответственно, уровень транспорта глюкозы в клетку является лимитирующим для пролиферации лимфоцитов. Направленность и интенсивность биоэнергетических процессов в клетках иммунной системы в значительной степени определяет функциональную активность клеток [8, 12].

Значимость изменений уровней активности внутриклеточных ферментов для реализации функциональной активности лимфоцитов подтверждается не только результатами экспериментальных исследований, но и клинико-лабораторными данными. Например, у детей с атопическим дерматитом обнаружены нарушения метаболических процессов в лимфоцитах периферической крови, которые зависят от периода, характера течения заболевания [6]. Доказано, что при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях метаболизм CD4⁺ клеток значительно различается [14]. Обнаружено, что при острых лимфобластных лейкозах в лимфоцитах периферической крови значительно снижена интенсивность анаэробного и аэробного дыхания [23]. Выявлена зависимость активности ферментов в лимфоцитах от исхода распространенного гнойного перитонита [8]. Причем сопоставление показателей, характеризующих внутриклеточный метаболизм лимфоцитов с физиологическими параметрами организма, показало, что изменения на клеточном уровне выявляются раньше, чем на организменном.

Целью данного исследования явилось изучение показателей активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови у больных ПКР в период до операции и в динамике через 14 и 30 дней после хирургического лечения.

Материалы и методы

На базе онкоурологического отделения Красноярского краевого клинического онкологического диспансера имени А.И. Крыжановского проведено открытое проспективное клиническое исследование. Обследованы пациенты с местнораспространенным почечно-клеточным раком в период до хирургического лечения (101 человек), через 14 (90 человек) и 30 дней (44 человека) после оперативного вмешательства. Критерии включения в исследование: возраст 45-55 лет, морфологически верифицированный ПКР, III стадия заболевания (T₃N₀M₀), радикальная нефрэктомия. Критериями исключения явились: тяжелая сопутствующая патология, печеночная и почечная недостаточность, статус пациента по шкале EGOC > 2, опухоль другой локализации, химио- или лучевая терапия, отказ пациента от участия в исследовании. Контрольную группу составили 35 здоровых доноров аналогичного возрастного диапазона.

Выделение общей фракции лимфоцитов осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-урографина с последующей очисткой от прилипающих клеток. Для биолюминесцентного анализа использовали

1 млн выделенных лимфоцитов. Клетки разрушали путем осмотического лизиса с добавлением 2,0 мМ дитиотреитола. Затем осуществляли биолюминесцентное определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и НАДН-ЛДГ соответственно), НАДФ-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (НАДФМДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и НАДН-ГДГ соответственно), НАДФ- и НАДФН-зависимой реакции глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ и НАДФН-ГДГ соответственно), НАД- и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ соответственно), НАД- и НАДФ-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ соответственно) и глутатионредуктазы (ГР). Для этого к 50 мкл инкубационной смеси разрушенных CD8⁺ лимфоцитов добавляли 150 мкл смеси субстратов и коферментов в концентрациях и рН среды, указанных в используемой нами методике [7]. После инкубации исследуемых проб при 37 °С в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)⁺) или 5 минут (для реакций с окислением НАД(Ф)Н) к 200 мкл инкубационной смеси добавляли 50 мкл флавиномононуклеотида (ФМН, Applichem GmbH, Германия) и 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н:ФМНоксидоредуктаза-люцифераза. Биферментный препарат НАД(Ф)Н:ФМНоксидоредуктаза-люцифераза изготовлен из очищенных методом ионообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из *Photobacterium leiognathi* и НАД(Ф)Н:ФМНоксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* в Институте биофизики СО РАН (г. Красноярск) [18]. Все реактивы биолюминесцентной системы разведены в 0,1 М К⁺, Na⁺-фосфатном буфере (Реахим, Россия) с рН 7,0. Измерение биолюминесценции осуществляли с помощью биолюминометрического анализатора «БЛМ-3607» (г. Красноярск, Россия). Активность исследуемых оксидоредуктаз выражали в ферментативных единицах (1Е = 1 мкмоль/мин) на 10⁴ клеток [8].

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.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica v. 6.0 (Statsoft Inc., США). Количественные параметры в группах сравнения представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q_{0,25}-Q_{0,75}), где Q_{0,25} – 25% процентиль, Q_{0,75} – 75% процентиль. Проверку гипотезы о достоверности выборки проводили с помощью критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test). Достоверность различий в динамике послеоперационного периода определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test).

Результаты

Анализ исследуемых НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у больных ПКР в период до хирургического лечения показал статистически значимое снижение активности Г6ФДГ относительно показателей контрольной группы (рис. 1А). Следует отметить значительное снижение активности НАДН-ЛДГ по сравнению с величинами контрольной группы (рис. 2А). Кроме того, установлено повышение в 3,2 раза уровня активности НАДН-ГДГ (рис. 2Б) и снижение в 6,2 раза активности ГР (рис. 1Б) относительно параметров контроля.

В период через 14 дней после оперативного вмешательства у больных ПКР в лимфоцитах крови показатели активности Г6ФДГ сохраняются пониженными по сравнению с величинами контрольной группы и соответствуют уровню, зарегистрированному в период до хирургического лечения (рис. 1А). Анаэробная реакция ЛДГ по-прежнему остается сниженной относительно контрольных показателей, а также по сравнению с величинами, зафиксированными в период до операции (рис. 2А). Сохраняются повышенными показатели активности НАДН-ГДГ относительно контрольных значений (рис. 2Б), и отмечается увеличение уровня активности Г3ФДГ по сравнению с показателями, зарегистрированными в период до хирургического лечения (рис. 3А). По-прежнему наблюдается статистически значимое снижение активности ГР по сравнению с контролем, в то время как уровни активности фермента на период через 14 дней после операции почти в 2 раза превосходят значения, установленные в период до оперативного вмешательства (рис. 1Б). Необходимо отметить статистически значимое увеличение активности ЛДГ относительно показателей группы контроля (рис. 3Б).

Исследование активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у больных ПКР в период через 30 дней после хирургического лечения позволило

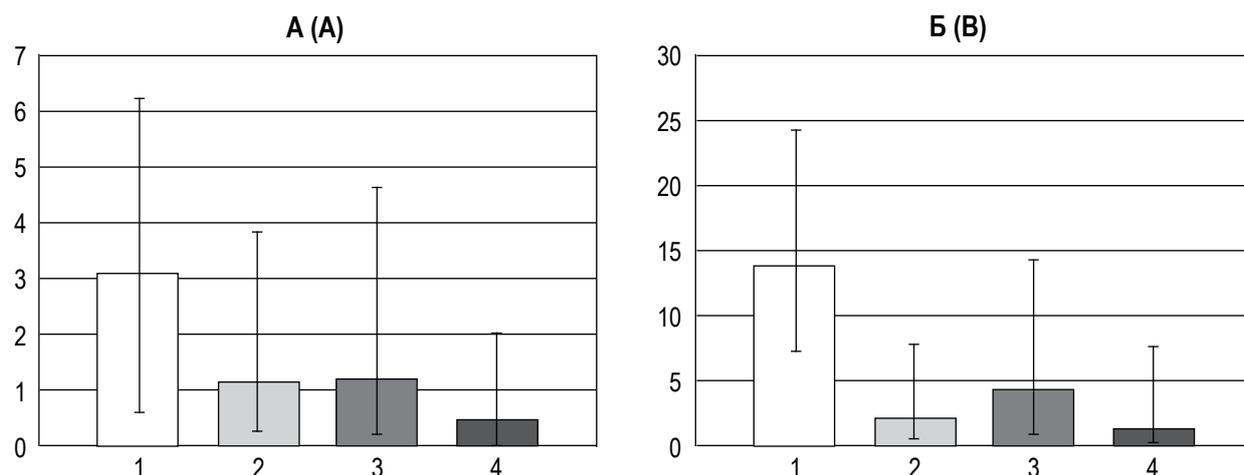


Рисунок 1. Активность Г6ФДГ (А) и ГР (Б) в лимфоцитах крови у больных ПКР до и после операции

Примечание. По оси абсцисс – группы обследованных (1 – группа контроля; 2 – больные ПКР до операции; 3 – через 14 суток после операции; 4 – через 30 суток после операции); по оси ординат – активность фермента (мкЕ); p_1 – статистически значимые различия с контрольными значениями; p_2 – статистически значимые различия с показателями больных ПКР до операции; p_3 – статистически значимые различия с показателями больных ПКР через 14 суток после операции.

Figure 1. Glu6PDH (A) and GR (B) activities in blood lymphocytes from the patients with RCC before and after surgery

Note. Abscissa, groups of examined persons (1, controls; 2, patients with RCC before surgery; 3, 14 days after surgery; 4, 30 days after surgery). Ordinate, enzyme activity (mкU); p_1 , statistically significant differences with control values; p_2 , difference against appropriate parameters of patients with RCC before the operation; p_3 , difference against appropriate parameters of the RCC patients 14 days after the surgery.

Англоязычный список ферментов

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) – Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Glu6PDH)

Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (Г3ФДГ) – Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Gly3PDH)

Лактатдегидрогеназа, НАД-зависимая реакция (ЛДГ) – Lactate dehydrogenase, NAD-dependent reaction (LDH)

Малатдегидрогеназа, НАД-зависимая реакция (МДГ) – Malate dehydrogenase, NAD-dependent reaction (MDH)

НАДН-зависимая реакция лактатдегидрогеназы (НАДН-ЛДГ) – NADH-dependent reaction of lactate dehydrogenase (NADH-LDH)

Глутатионредуктаза (ГР) – Glutathione reductase (GR)

НАДН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы (НАДН-ГДГ) – NADH-dependent reaction of glutamate dehydrogenase (NADH-GluDH)

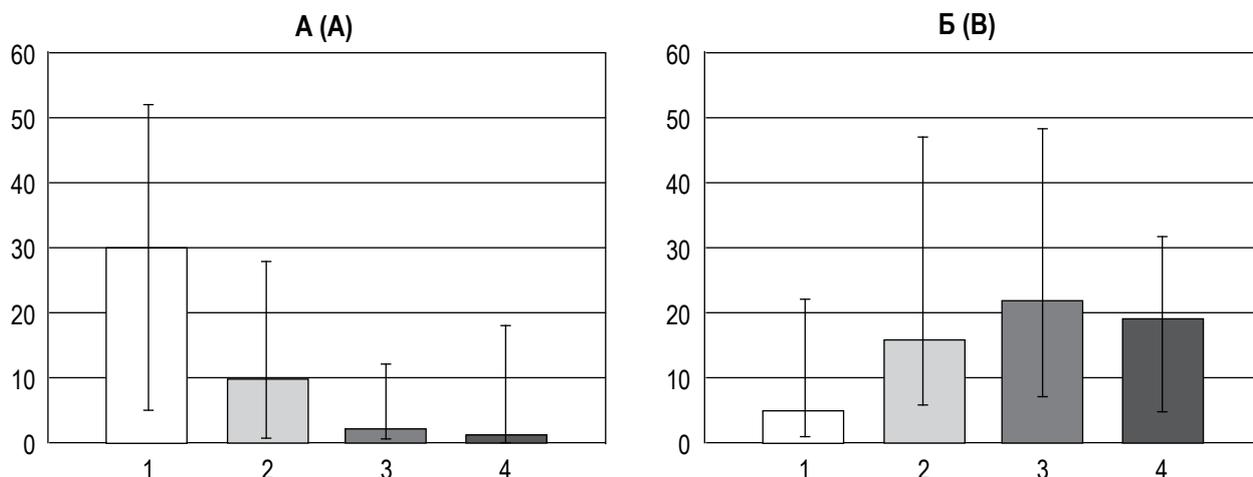


Рисунок 2. Активность НАДН-ЛДГ (А) и НАДН-ГДГ (Б) в лимфоцитах крови у больных ПКР до и после операции

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. NADH-LDH (A) and NADH-GluDH (B) activities in blood lymphocytes from the patients with RCC before and after surgery

Note. As for Figure 1.

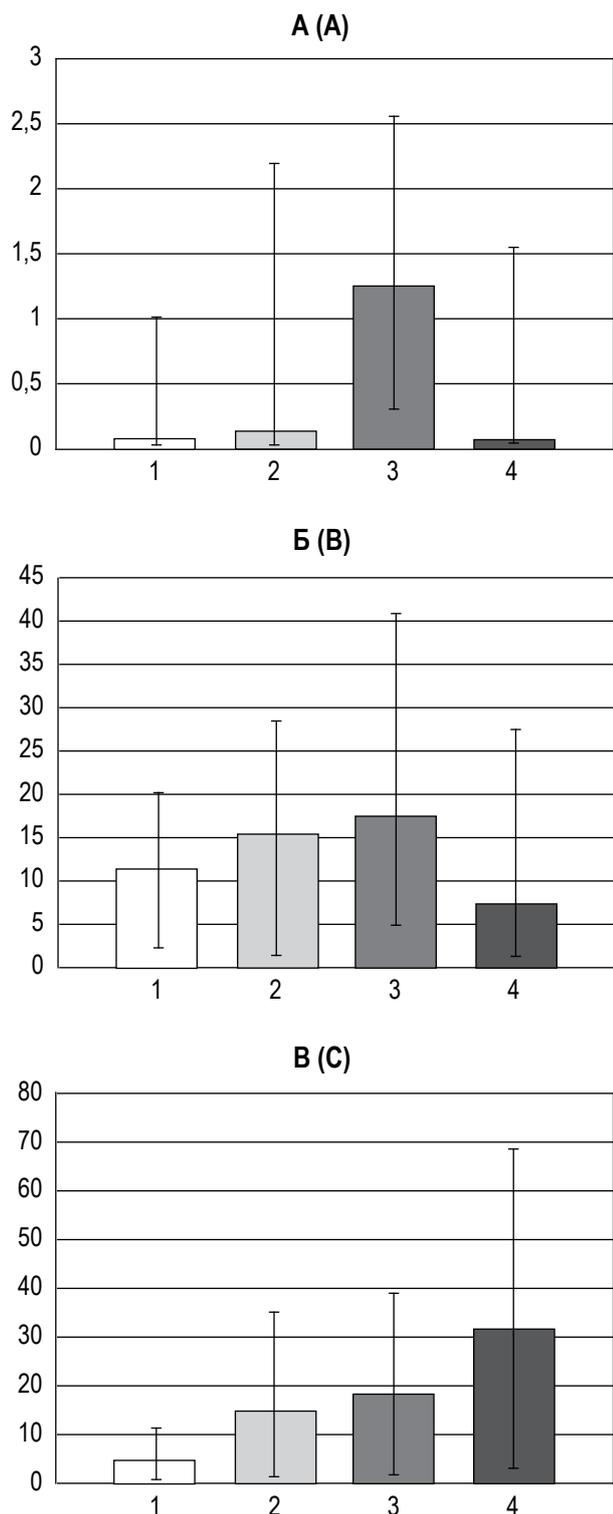


Рисунок 3. Активность ГЗФДГ (А), ЛДГ (Б) и МДГ (В) в лимфоцитах крови у больных ПКР до и после операции

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Gly3PDH (A), LDH (B) and MDH (C) activities in blood lymphocytes from the patients with RCC before and after surgery

Note. As for Figure 1.

установить продолжающееся снижение активности Г6ФДГ по сравнению с контролем, а также снижение в 2,7 раза относительно показателей, зарегистрированных в период через 14 дней после операции (рис. 1А). Кроме того, сохраняются статистически значимо пониженными показатели активности ГР (рис. 1Б), НАДН-ЛДГ (рис. 2А) и повышенными НАДН-ГДГ (рис. 2Б) по сравнению с показателями контрольной группы. Следует отметить, что только в данный период наблюдения в лимфоцитах крови у больных ПКР обнаружено увеличение активности МДГ в 7 раз относительно значений контроля (рис. 3В).

Обсуждение

Известно, что лимфоциты относятся к клеткам, где энергетические процессы определяются активностью как аэробных, так и анаэробных реакций [8, 14, 17]. Активность анаэробной реакции ЛДГ (НАДН-ЛДГ) характеризует интенсивность субстратного потока на терминальной стадии анаэробного гликолиза. Полученные нами данные свидетельствуют о снижении активности НАДН-ЛДГ у больных ПКР как в период до операции, так и во все наблюдаемые периоды после хирургического лечения. Это позволяет предположить понижение интенсивности терминальных реакций анаэробного гликолиза в лимфоцитах периферической крови у больных ПКР. Между тем в исследовании, проведенном Chang С.Н. и соавт. (2013), отмечается, что при активации лимфоцитов наблюдается переход от аэробной биоэнергетики к анаэробной [12]. Причем при ингибировании гликолиза Т-лимфоциты не проявляли необходимой пролиферативной активности.

Субстратным конкурентом гликолиза является пентозофосфатный цикл, инициирующую и ключевую реакцию которого катализирует Г6ФДГ [8, 10, 24]. В результате нашего исследования установлено, что активность Г6ФДГ, осуществляющая ключевую и инициирующую реакцию пентозофосфатного цикла, снижена в лимфоцитах периферической крови у больных ПКР в период до оперативного вмешательства и в послеоперационном периоде. Между тем продуктами пентозофосфатного цикла являются рибозо-5-фосфат и НАДФН, которые используются для дальнейшего макромолекулярного синтеза [6, 16].

Компенсировать недостаточность анаэробного гликолиза может перенос продуктов липидного катаболизма через ГЗФДГ на окислительно-восстановительные реакции гликолиза [19, 21]. Однако повышение активности ГЗФДГ в лимфоцитах больных ПКР наблюдается только на 14 сутки после оперативного вмешательства. Также

следует отметить, что при снижении интенсивности гликолиза концентрация пирувата может быть стабилизирована аэробной реакцией ЛДГ, чем, возможно, определяется повышение активности ЛДГ в лимфоцитах периферической крови у больных ПКР в период через 14 дней после хирургического лечения.

Известно, что НАДН- и НАДФН-зависимые реакции глутаматдегидрогеназ определяют уровень оттока интермедиатов с цикла трикарбоновых кислот на метаболические пути аминокислотного обмена [11, 26]. Обнаруженное повышение активности НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы в лимфоцитах крови у больных ПКР в период до и после операции отражает увеличение оттока энергетических интермедиатов на реакции аминокислотного обмена. При этом необходимо подчеркнуть, что активируется именно НАДН-ГДГ, это позволяет предположить повышение НАДН в митохондриальном компартменте клеток.

Характеризуя ферментный профиль лимфоцитов периферической крови у больных ПКР, следует также отметить, что в период через 30 дней после хирургического лечения значительно повышается уровень МДГ, активность которой определяет интенсивность субстратного потока на терминальном этапе цикла Кребса, вносящего наибольший вклад в процессы внутриклеточного энергообразования [5, 6, 15].

Увеличение интенсивности терминальных реакций цикла Кребса отражает повышение активности аэробного дыхания, что является энергетически более выгодным для клетки. В то же время вызванное подобным перераспределением субстратных потоков «обеднение» метаболитами пентозофосфатного цикла у больных ПКР приводит к снижению пластических функций клетки. Кроме того, даже через 30 дней после хирургического лечения сохраняется снижение глутатион-зависимой антиоксидантной защиты клетки.

Обращает на себя внимание факт снижения активности ГР в лимфоцитах крови у больных ПКР как в период до операции, так и в послеоперационном периоде. Данный фермент входит в состав одной из систем антиоксидантной защиты клетки, что может отражать активацию перекисных процессов, играющих важную патофизиологическую роль в онкогенезе [6, 13].

Общей закономерностью изменений энзиматической активности лимфоцитов периферической крови у больных ПКР в период до и после оперативного вмешательства является уменьшение интенсивности терминальных анаэробных реакций гликолиза, ингибирование пластических процессов, зависящих от НАДФН и рибозо-5-

фосфата, определяемых реакциями пентозофосфатного цикла, повышением НАДН-зависимого оттока субстратов с цикла Кребса на реакции аминокислотного обмена и снижением глутатион-зависимой антиоксидантной системы клетки. В послеоперационном периоде наблюдается субстратная стимуляция гликолиза продуктами липидного катаболизма, что обычно происходит при необходимости быстрой мобилизации энергии в клетке. Активируется аэробная реакция ЛДГ, повышается интенсивность аэробного клеточного дыхания за счет увеличения активности реакций терминального этапа цикла трикарбоновых кислот.

Следовательно, метаболические процессы в лимфоцитах периферической крови у больных ПКР в послеоперационном периоде направлены в основном на повышение выработки энергетических возможностей, что, вероятно, связано с активацией лимфоцитов в данный период наблюдения.

Заключение

В результате проведенного исследования установлены изменения ферментного профиля лимфоцитов периферической крови у больных ПКР в до и послеоперационном периоде. Метаболизм лимфоцитов у больных ПКР в дооперационном периоде характеризуется сниженной активностью пентозофосфатного цикла, анаэробной реакцией ЛДГ и глутатион-зависимой антиоксидантной системы, но при повышенном уровне НАД-зависимого оттока субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена. В послеоперационном периоде происходит увеличение субстратного питания гликолиза за счет продуктов метаболизма липидов и жирных кислот, умеренно активируется аэробная реакция лактатдегидрогеназы. Значительное увеличение терминальных реакций цикла Кребса отражает повышение активности аэробного дыхания, что является энергетически более выгодным для клеток. В то же время вызванное подобным перераспределением субстратных потоков «обеднение» метаболитами пентозофосфатного цикла у больных ПКР приводит к снижению пластических функций клетки. Даже через 30 дней после хирургического лечения сохраняется снижение глутатион-зависимой антиоксидантной защиты клетки. Следовательно, больные ПКР в послеоперационном периоде нуждаются в коррекции метаболических процессов в клетках иммунной системы, что необходимо учитывать при разработке реабилитационных программ у данной категории пациентов.

Список литературы / References

1. Александрова Л.М., Грецова О.П., Калинина А.М., Петрова Г.В., Старинский В.В., Каприн А.Д., Бойцов С.А. Роль диспансеризации в выявлении рака почки в России // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена, 2015. Т. 4, № 5. С. 44-48. [Aleksandrova L.M., Gretsova O.P., Kalinina A.M., Petrova G.V., Starinskiy V.V., Kaprin A.D., Boytsov S.A. Role of prophylactic medical examination in the detection of kidney cancer in Russia. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A. Gertsena = Oncology. P.A. Herzen Journal*, 2015, Vol. 4, no. 5, pp. 44-48. (In Russ.)]
2. Вторушин С.В., Тараканова В.О., Завьялова М.В. Молекулярно-биологические факторы прогноза рака почки // Архив патологии, 2016. Т. 78, № 1. С. 56-61. [Vtorushin S.V., Tarakanova V.O., Zavyalova M.V. Molecular biological predictors for kidney cancer. *Arkhiv patologii = Archive of Pathology*, 2016, Vol. 78, no. 1, pp. 56-61. (In Russ.)]
3. Зуков Р.А., Дыхно Ю.А., Модестов А.А., Шкапова Е.А. Почечно-клеточный рак. Новосибирск: Наука, 2015. 244 с. [Zukov R.A., Dykhno Yu.A., Modestov A.A., Shkarova E.A. Renal cell cancer]. Novosibirsk: Science, 2015. 244 p.
4. Кадагидзе З.Г., Чертова А.И., Славина Е.Г., Заботина Е.Н., Борунова А.А., Короткова О.В. Фенотип иммунокомпетентных клеток и его значение в противоопухолевом иммунитете // Вестник РАМН, 2011. № 12. С. 21-25. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Slavina E.G., Zabolina E.N., Borunova A.A., Korotkova O.V. Phenotype of immunocompetent cells and its role in antitumour immune response. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2011, no. 12, pp. 21-25. (In Russ.)]
5. Коленчукова О.А., Савченко А.А. Сравнительная характеристика НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и лимфоидной ткани при хроническом аденоидите // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 3. С. 229-234. [Kolenchukova O.A., Savchenko A.A. Comparative characteristics of NAD(P) – dependent dehydrogenases in blood lymphocytes and lymphoid tissue in chronic adenoiditis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 229-234. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-3-229-234.
6. Куртасова Л.М., Манчук В.Т., Савченко А.А. Основы метаболической иммунореабилитации детей с атопическим дерматитом. Красноярск: КрасГМА, 2002. 153 с. [Kurtasova L.M., Manchuk V.T., Savchenko A.A. Fundamentals of the metabolic immunorehabilitation of children with atopic dermatitis]. Krasnoyarsk: KrasGMA, 2002. 153 p.
7. Савченко А.А. Определение активности НАД(Р)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2015. Т. 159, № 5. С. 656-660. [Savchenko A.A. Evaluation of NAD(P)-dependent dehydrogenase activities in neutrophilic granulocytes by the bioluminescent method. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol. 159, no. 5, pp. 656-660. (In Russ.)]
8. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Новосибирск: Наука, 2013. 142 с. [Savchenko A.A., Zdzitovetskiy D.E., Borisov A.G. The immune and metabolic disorders by the widespread purulent peritonitis]. Novosibirsk: Science, 2013. 142 p.
9. Basappa N., Pouliot F. New research in kidney cancer, ASCO-GU 2017. *Can. Urol. Assoc. J.*, 2017, Vol. 11, Suppl. 12, pp. S163-S165.
10. Boonyuen U., Chamchoy K., Swangsri T., Junkree T., Day N.P.J., White N.J., Imwong M. A trade off between catalytic activity and protein stability determines the clinical manifestations of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, Vol. 104, Pt A, pp. 145-156.
11. Bunik V., Artiukhov A., Aleshin V., Mkrtchyan G. Multiple forms of glutamate dehydrogenase in animals: Structural determinants and physiological implications. *Biology (Basel)*, 2016, Vol. 5, no. 4, pii: E53.
12. Chang C.H., Curtis J.D., Maggi L.B. Jr., Faubert B., Villarino A.V., O'Sullivan D., Huang S.C., van der Windt G.J., Blagih J., Qiu J., Weber J.D., Pearce E.J., Jones R.G., Pearce E.L. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*, 2013, Vol. 153, no. 6, pp. 1239-1251.
13. Couto N., Wood J., Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, Vol. 95, pp. 27-42.
14. Gerriets V.A., Kishton R.J., Nichols A.G., Macintyre A.N., Inoue M., Ilkayeva O., Winter P.S., Liu X., Priyadharshini B., Slawinska M.E., Haerberli L., Huck C., Turka L.A., Wood K.C., Hale L.P., Smith P.A., Schneider M.A., MacIver N.J., Locasale J.W., Newgard C.B., Shinohara M.L., Rathmell J.C. Metabolic programming and PDHK1 control CD4⁺ T cell subsets and inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2015, Vol. 125, no. 1, pp. 194-207.
15. Leoni V., Nury T., Vejux A., Zarrouk A., Caccia C., Debbabi M., Fromont A., Sghaier R., Moreau T., Lizard G. Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α -tocopherol: Impacts on the cellular profil of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2017, Vol. 169, pp. 96-110.
16. Li L., Fath M.A., Scarbrough P.M., Watson W.H., Spitz D.R. Combined inhibition of glycolysis, the pentose cycle, and thioredoxin metabolism selectively increases cytotoxicity and oxidative stress in human breast and prostate cancer. *Redox Biol.*, 2015, Vol. 4, pp. 127-135.

17. Li M., Song M., Ren L.M., Xiu C.Y., Liu J.Y., Zhu Y.Z., Li Y.F. AlCl₃ induces lymphocyte apoptosis in rats through the mitochondria-caspase dependent pathway. *Environ. Toxicol.*, 2016, Vol. 31, no. 4, pp. 385-394.
18. Medvedeva S.E., Tyulkova N.A., Kuznetsov A.M., Rodicheva E.K. Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 2009, Vol. 2, no. 4, pp. 418-452.
19. Melis D., Carbone F., Minopoli G., La Rocca C., Perna F., De Rosa V., Galgani M., Andria G., Parenti G., Matarese G. Cutting edge: Increased autoimmunity risk in glycogen storage disease type 1b is associated with a reduced engagement of glycolysis in t cells and an impaired regulatory T cell function. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 10, pp. 3803-3808.
20. Nassif E., Thibault C., Vano Y., Fournier L., Mauge L., Verkarre V., Timsit M.O., Mejean A., Tartour E., Oudard S. Sunitinib in kidney cancer: 10 years of experience and development. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2017, Vol. 17, no. 2129-2142.
21. Previte D.M., O'Connor E.C., Novak E.A., Martins C.P., Mollen K.P., Piganelli J.D. Reactive oxygen species are required for driving efficient and sustained aerobic glycolysis during CD4⁺ T cell activation. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 4, pp. e0175549. doi: 10.1371/journal.pone.0175549.
22. Sharabi A. Editorial: Molecules balancing immunological surveillance against cancer and autoimmune diseases. *Front. Oncol.*, 2016, Vol. 6, p. 86.
23. Smirnova O.V., Manchouk V.T., Savchenko A.A. Immune status and enzymes activity in blood lymphocytes in adult patients at different stages of acute lymphoblastic leukemia. *Indian Journal of Medical Research*, 2011, Vol. 133, pp. 280-286.
24. Thakor P., Subramanian R.B., Thakkar S.S., Ray A., Thakkar V.R. Phytol induces ROS mediated apoptosis by induction of caspase 9 and 3 through activation of TRAIL, FAS and TNF receptors and inhibits tumor progression factor Glucose 6 phosphate dehydrogenase in lung carcinoma cell line (A549). *Biomed. Pharmacother.*, 2017, Vol. 92, pp. 491-500.
25. Xu Y., Chaudhury A., Zhang M., Savoldo B., Metelitsa L.S., Rodgers J., Yustein J.T., Neilson J.R., Dotti G. Glycolysis determines dichotomous regulation of T cell subsets in hypoxia. *J. Clin. Invest.*, 2016, Vol. 126, no. 7, pp. 2678-2688.
26. Zhu M., Fang J., Zhang J., Zhang Z., Xie J., Yu Y., Ruan J.J., Chen Z., Hou W., Yang G., Su W., Ruan B.H. Biomolecular interaction assays identified dual inhibitors of glutaminase and glutamate dehydrogenase that disrupt mitochondrial function and prevent growth of cancer cells. *Anal. Chem.*, 2017, Vol. 89, no. 3, pp. 1689-1696.

Авторы:

Куртасова Л.М. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

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

Authors:

Kurtasova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology, Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Зуков Р.А. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой онкологии и лучевой терапии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Zukov R.A., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Oncology and Radiation Therapy, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Толмачева Т.В. — к.м.н., доцент кафедры физиологии имени проф. А.Т. Пшоники ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Tolmacheva T.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Physiology, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 08.07.2017
Принята к печати 22.09.2017

Received 08.07.2017
Accepted 22.09.2017

КОРРЕКЦИЯ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

**Шульгинова А.А.¹, Конопля А.И.¹, Быстрова Н.А.¹, Гаврилюк В.П.¹,
Караулов А.В.²**

¹ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Курск, Россия

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

Резюме. Целью исследования было определение эффективности применения глутоксима в коррекции иммунных нарушений у больных с первой и второй стадией хронической ишемии головного мозга на фоне гипертонической болезни. При обеих стадиях заболевания установлено повышение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, IFN γ , IL-2, G-CSF и активация системы комплемента. У пациентов со второй стадией хронической ишемии головного мозга выявлено повышение маркеров кислород-зависимой активности полиморфно-ядерных лейкоцитов (повышение спонтанного и стимулированного теста восстановления нитросинего тетразолия, фагоцитарного резерва и индекса стимуляции нейтрофилов) в отличие от нормальных значений теста восстановления нитросинего тетразолия, функционального резерва нейтрофилов и сниженного индекса стимуляции нейтрофилов при первой стадии. Из 26 исследованных параметров иммунного статуса у пациентов с первой и второй стадией хронической ишемии головного мозга оказались измененными от значений здоровых доноров, соответственно, 73,1% и 80,8% показателей, из которых 66,7% параметров у больных с обеими стадиями заболевания оказались одинаковыми по величине и по направленности изменений, еще 33,3% идентичны по направленности. Использование в лечении хронической ишемии головного мозга первой стадии церетона и актовегина нормализует 5,3% измененных на начало лечения параметров иммунного статуса, корригирует 26,3% и оставляет без изменения или повышает в еще большей степени 68,4%. Более эффективным оказалось включение в комплексную фармакотерапию глутоксима, так как нормализованы оказались 52,6%, корригированы 21,1% и оказались без изменений 26,3% показателей. Применение при второй стадии заболевания церетона и актовегина корригирует 47,6% измененных до лечения параметров иммунного статуса. Использование глутоксима более эффективно, так как нормализует 19,0% и корригирует 57,1% показателей.

Ключевые слова: хроническая ишемия мозга, иммунные нарушения, глутоксим, цитокины, компоненты комплемента

Адрес для переписки:

Шульгинова Анастасия Александровна
ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
305040, Россия, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3.
Тел.: 8 (920) 703-19-83.
Факс: 8 (4712) 58-81-52.
E-mail: wvas@mail.ru

Address for correspondence:

Shulginova Anastasiya A.
Kursk State Medical University
305040, Russian Federation, Kursk, Karl Marks str., 3.
Phone: 7 (920) 703-19-83.
Fax: 7 (4712) 58-81-52.
E-mail: wvas@mail.ru

Образец цитирования:

А.А. Шульгинова, А.И. Конопля, Н.А. Быстрова,
В.П. Гаврилюк, А.В. Караулов «Коррекция иммунных
нарушений при хронической ишемии головного мозга»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 401-410.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-401-410

© Шульгинова А.А. и соавт., 2018

For citation:

A.A. Shulginova, A.I. Konoplya, N.A. Bystrova, V.P. Gavriiliuk,
A.V. Karaulov "Correction of immune disturbances in chronic
cerebral ischemia", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 401-410.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-401-410

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-401-410

CORRECTION OF IMMUNE DISTURBANCES IN CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA

Shulginova A.A.^a, Konoplya A.I.^a, Bystrova N.A.^a, Gavriliuk V.P.^a, Karaulov A.V.^b

^a Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

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

Abstract. The aim of the study was to determine efficiency of Glutoxim, aimed for correction of immune disorders. The drug was administered to the patients with chronic cerebral ischemia (CCI, Stage I and II) complicated by arterial hypertension. Increased contents of pro- and anti-inflammatory cytokines, IFN γ , IL-2, G-CSF, and activation of the complement system have been revealed for these conditions, at both functional stages of the disease. The patients with stage II CCI showed elevated markers of oxygen-dependent activity in polymorphonuclear leukocytes (increased levels of spontaneous and stimulated nitroblue tetrazolium (NBT) reduction tests, phagocytic capacity and stimulation index of neutrophils). Stage I of chronic cerebral ischemia was characterized by normal values of NBT reduction tests and functional reserve of neutrophils, along with decreased stimulation index of neutrophils. Among 26 parameters of immune status, 73.1% and 80.8% of indices proved to be changed, respectively, in the patients with stage I and II CCI. 66.7% of immune indices appeared similar in magnitude and direction of changes, whereas the resting 33% are identical in orientation. Usage of Cereton and Actovegin in treatment of the stage I CCI caused normalization of 5.3% immune parameters, with partial normalization of 26.3% tests, and 68.4% of the indexes remaining unchanged or increased post-treatment. Inclusion of Glutoxim into the combined pharmacotherapy proved to be more effective since it totally normalized 52.6% of the indexes, along with partial normalization of 21.1%, while 26.3% of the indicators were not affected by the therapy. Administration of Cereton and Actovegin at the second stage of chronic brain ischemia was followed by partial normalization for 47,6% of the tests, while leaving unchanged or increased 52.4% of the indicators. Glutoxim Use fully normalize 19.0% and partially normalizes 57.1% of immune parameters.

Keywords: chronic cerebral ischemia, immune disorders, glutoxim, cytokines, complement components

Введение

Хроническая ишемия головного мозга (ХИМ, или дисциркуляторная энцефалопатия, хроническое цереброваскулярное заболевание, хроническая недостаточность мозгового кровообращения и др.) является одной из самых распространенных патологий среди взрослых в неврологической практике. Это связано с возрастанием доли пожилого населения в развитых странах и полиэтиологичностью заболевания, основными причинами которого являются атеросклероз, артериальная гипертензия, сахарный диабет. В патогенезе формирования ХИМ большую роль играют длительно существующая гипоперфузия головного мозга, вследствие локальных стенозов церебральных артерий и других механических препятствий кровотоку, микро- и макроангиопатия, эндотелиальная дисфункция, оксидантный стресс [6, 7, 12].

Известно, что характер иммунного ответа и особенности развития патофизиологических изменений при ишемических/гипоксических тканевых расстройствах зависит от преимущественной активации субпопуляций Т-лимфоцитов, синтеза ими цитокинов раз-

личных типов и формирования «цитокинового каскада», а именно соотношения провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [6, 10, 20]. За последние годы накапливается все больше фактов о существенной роли иммунной системы при цереброваскулярной патологии. Так, в патогенезе атеросклероза и артериальной гипертензии, являющихся основными причинами возникновения и развития ХИМ, ключевую роль играют иммуновоспалительные механизмы. Цитокины Т-лимфоцитов-хелперов (Th1) – IL-2, IFN γ , а также макрофагальные хемокины, прежде всего MCP-1, рассматриваются в качестве проатерогенных, тогда как цитокинам Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) отводят антиатерогенную роль [11, 24, 33]. Хроническая ишемизация головного мозга, вызванная АГ, вызывает развитие иммунного воспаления и нарушение липидного обмена, приводящее к необратимым повреждениям фосфолипидных мембранных комплексов и деструктивному процессу в нейроглии [5, 14, 15].

Совершенствование представлений о патогенезе ХИМ имеет большое значение для выбора приоритетных направлений фармакологической коррекции нарушений. В соответствии с этим,

кроме вазотропной терапии, устранению причин микроангиопатий (артериальной гипертензии, сахарного диабета и др.), коррекции эндотелиальной дисфункции оксидантного стресса, обеспечению нейропротекции, на повестку дня выступает применение иммуномодуляторов для устранения иммунных нарушений на ранних стадиях заболевания [2, 9, 17].

Цель исследования — установление эффективности применения глутоксима в коррекции иммунных нарушений при ХИМ I и II стадий.

Материалы и методы

Обследовано 42 пациента неврологического отделения БМУ «Курская областная клиническая больница» с ХИМ на фоне гипертонической болезни, из них: 21 больной с I стадией ХИМ (2-я и 3-я основные группы, соответственно, 10 и 11 пациентов) и 21 со II стадией ХИМ (4-я и 5-я основные группы, также 10 и 11 больных) в возрасте 50 ± 5 лет. Кроме того, изучены иммунологические и метаболические показатели в образцах плазмы крови и эритроцитах 15 здоровых доноров (52 ± 2 года), сформировавших контрольную группу; полученные результаты приняты как условная норма.

Критерии включения в основную группу: мужской пол; наличие ХИМ I и II стадии на фоне гипертонической болезни, диагностированной 5 и более лет тому назад в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения и Международного общества по АГ (МОГ, 1999). Всем пациентам проводили комплексное клинично-инструментальное обследование по общепринятым стандартам, при этом во всех случаях имела место верификация диагноза ХИМ I и II стадии.

Оценка клинично-лабораторных данных и неврологического статуса в основной и контрольной группах осуществляли в начале лечения и через 2 недели после его окончания. Пациенты основных групп получали базовую терапию (ингибитор ангиотензин-превращающего фермента эналаприл (Berlin-Chemie AG [Menarini Group], Германия) и вазоактивный препарат винпоцетин (кавинтон, «Гедеон Рихтер», Венгрия) и дополнительную терапию (во 2-й и 4-й группах препарат ноотропного действия церетон [«Сотекс Фармфирма», Россия] и антигипоксанта — актовегин [«Никомед Австрия ГмбХ», Австрия]; в 3-й и 5-й группах дополнительно к ним препарат иммуномодулирующего действия — глутоксим [«Фарма Вам», Россия]).

Уровень цитокинов, компонентов комплемента и их ингибиторов определяли в плазме крови. Цитокины (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, IL-4, IL-10, IL-1ra, IFN γ , IL-2, G-CSF), хемокин (IL-8) выявляли методом твердофазного иммунофермент-

ного анализа (ИФА) с детекцией продуктов реакции в диапазоне длины волны 405–630 нм с использованием коммерческих наборов ЗАО «Вектор-Бест». Компоненты системы комплемента (C3, C3a, C4, C5 и C5a) и фактор Н определяли с помощью диагностических наборов ООО «Цитокин» с использованием двух принципов: гемолитического метода учета активации системы комплемента и ИФА-метода детекции терминального комплекса, выявляемого специфическими антителами. Активность C1-ингибитора определяли хромогенным методом по способности ингибировать C1-эстеразу. Регистрация всех результатов иммуноферментного анализа осуществлялась на микропланшетном фотометре Sunrise, Tecan (Австрия).

Фагоцитарную активность полиморфно-ядерных лейкоцитов крови после их выделения из крови на градиенте плотности фиколл-урографин ($d = 1,077$) оценивали по общепринятой методике, определяя фагоцитарный индекс (ФИ), фагоцитарное число (ФЧ) и индекс активности фагоцитоза (ИАФ). Активность кислород-зависимых систем нейтрофилов оценивали на спектрофотометре PD 303 S Apel (Япония) по реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), спонтанного и стимулированного зимозаном (НСТ-сп., НСТ-ст.), индексу стимуляции и функциональному резерву нейтрофилов (ИСН, ФРН).

Статистическую обработку результатов исследования проводили в соответствии с общепринятыми принципами вариационно-статистического анализа с вычислением средних величин (M), ошибки средней арифметической (m) с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel (2010). Существенность различий независимых выборок оценивали по U-критерию Манна–Уитни, связанных (показателей до и после лечения в одной и той же группе) — по критерию Вилкоксона. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

В плазме крови больных ХИМ с I стадией до начала лечения установлено повышение концентрации провоспалительных цитокинов: TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-18 и противовоспалительных: IL-4, IL-10 и IL-1ra. Кроме этого, выявлено также повышение содержания IFN γ , IL-2 и G-CSF. После проведенной фармакотерапии, содержащей церетон и актовегин, концентрация провоспалительных цитокинов и хемокина (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8) корригировалась в сторону значений контроля, уровень IFN γ и IL-10 повышался в еще большей степени, содержание остальных исследованных цитокинов не изменялось. Использование глутоксима, по сравнению с лечением церетоном и актовеги-

ном, дополнительно нормализовало содержание в плазме TNF α , IL-1 β , IL-17, IL-1ra, корригировало уровень IL-6 и IL-18 и в еще большей степени повышало концентрацию IL-4 (табл. 1).

У пациентов со II стадией ХИМ при поступлении в клинику в плазме крови выявлены в целом сходные по направленности и величине изменения содержания исследованных цитокинов: повышение провоспалительных TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-18, противовоспалительных: IL-4, IL-10 и IL-1ra и IFN γ , IL-2, G-CSF. Применение церетона и актовегина корригировало, но не до параметров здоровых доноров, концентрацию всех исследованных провоспалительных цитокинов и хемокина, IL-2 и G-CSF, в еще большей степени повышался уровень IFN γ и IL-10, содержание IL-4 и IL-1ra не изменялось. Использование глутоксима, по сравнению с использованием церетона и актовегина, дополнительно нормализовало содержание IL-1 β и IL-17, еще в большей степени повышало концентрацию противовоспа-

лительных цитокинов и приближало к значениям контроля уровень TNF α , IL-6, IL-8, IL-18, IL-2 и G-CSF (табл. 1).

У больных с ХИМ I стадии перед началом лечения в плазме крови выявлено снижение содержания C3- и C5-компонентов комплемента и C1-ингибитора, повышение компонентов C3a и C5_a, уровень C4 и ингибитора фактора Н остался в пределах нормы. После проведенного лечения, включавшего церетон и актовегин нормализовалась концентрация C3-компонента комплемента и повышение, но не до уровня здоровых доноров, содержания компонента C5a. Включение в схему фармакотерапии иммуномодулятора глутоксима дополнительно, по сравнению с церетоном и актовегином, нормализовало содержание C3a-, C5- и C1-ингибитора и повысило на сторону значений контроля концентрацию C5a-компонента комплемента (табл. 2).

У больных со II стадией ХИМ перед началом лечения в плазме крови выявлено снижение со-

ТАБЛИЦА 1. ЦИТОКИНОВЫЙ СПЕКТР ПЛАЗМЫ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА I И II СТАДИИ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ (M \pm m)

TABLE 1. LEVEL OF CYTOKINES IN BLOOD PLASMA AT PATIENTS WITH CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA I AND II STAGES BEFORE TREATMENT (M \pm m)

Показатели Indicators	Единицы измерения Units of measure	1	2	3	4	5	6	7
		Здоровые Healthy	Хроническая ишемия головного мозга I Chronic cerebral ischemia I			Хроническая ишемия головного мозга II Chronic cerebral ischemia II		
			До лечения Before treatment	После лечения After treatment		До лечения Before treatment	После лечения After treatment	
				Церетон + актовегин Cereton + Actovegin	Церетон + актовегин + глутоксим Cereton + Actovegin + Glutoxim		Церетон + актовегин Cereton + Actovegin	Церетон + актовегин + глутоксим Cereton + Actovegin + Glutoxim
TNF α	pg/ml	2,9 \pm 0,1	13,0 \pm 0,4 ^{*1}	6,9 \pm 0,3 ^{*1,2}	3,1 \pm 0,1 ^{*2,3}	13,4 \pm 0,4 ^{*1}	8,4 \pm 0,6 ^{*1,5}	5,9 \pm 0,3 ^{*1,5,6}
IL-1 β	pg/ml	5,3 \pm 0,2	11,9 \pm 0,3 ^{*1}	5,8 \pm 0,2 ^{*1,2}	5,1 \pm 0,2 ^{*2,3}	11,3 \pm 0,5 ^{*1}	9,4 \pm 0,6 ^{*1,5}	5,7 \pm 0,2 ^{*5,6}
IL-6	pg/ml	2,4 \pm 0,1	13,4 \pm 1,3 ^{*1}	10,1 \pm 0,9 ^{*1,2}	6,9 \pm 0,8 ^{*1,3}	14,3 \pm 1,0 ^{*1}	10,4 \pm 1,2 ^{*1,5}	4,3 \pm 0,7 ^{*1,5,6}
IL-8	pg/ml	1,8 \pm 0,05	10,5 \pm 1,2 ^{*1}	7,1 \pm 1,1 ^{*1,2}	5,5 \pm 0,9 ^{*1,2}	15,9 \pm 1,2 ^{*1,2}	12,1 \pm 1,1 ^{*1,5}	5,2 \pm 0,6 ^{*1,5,6}
IL-17	pg/ml	8,7 \pm 0,2	10,6 \pm 0,5 ^{*1}	9,8 \pm 0,5 ^{*1}	9,0 \pm 0,4 ^{*2}	22,2 \pm 1,0 ^{*1,2}	16,2 \pm 2,2 ^{*1,5}	7,9 \pm 1,0 ^{*5,6}
IL-18	pg/ml	47,6 \pm 2,2	127,3 \pm 9,4 ^{*1}	112,5 \pm 8,7 ^{*1}	84,3 \pm 4,1 ^{*1,3}	134,7 \pm 8,4 ^{*1}	100,2 \pm 7,7 ^{*1,5}	78,5 \pm 6,2 ^{*1,5,6}
IL-4	pg/ml	0,41 \pm 0,04	3,3 \pm 0,3 ^{*1}	3,7 \pm 0,2 ^{*1}	5,2 \pm 0,3 ^{*1,3}	8,2 \pm 0,4 ^{*1,2}	8,7 \pm 0,4 ^{*1}	12,1 \pm 0,9 ^{*1,5,6}
IL-10	pg/ml	2,7 \pm 0,1	3,7 \pm 0,2 ^{*1}	6,1 \pm 0,1 ^{*1,2}	6,3 \pm 0,2 ^{*1,2}	3,9 \pm 0,1 ^{*1}	6,8 \pm 0,3 ^{*1,5}	10,2 \pm 1,2 ^{*1,5,6}
IL-1ra	pg/ml	137,7 \pm 1,7	149,7 \pm 2,6 ^{*1}	152,6 \pm 3,3 ^{*1}	141,4 \pm 4,2 ^{*2,3}	167,7 \pm 3,7 ^{*1,2}	170,5 \pm 3,7 ^{*1}	179,1 \pm 3,1 ^{*1,5,6}
IFN γ	pg/ml	15,6 \pm 0,3	22,3 \pm 0,8 ^{*1}	34,6 \pm 1,7 ^{*1,2}	30,4 \pm 2,8 ^{*1,2}	23,9 \pm 0,9 ^{*1}	26,8 \pm 1,4 ^{*1,5}	27,3 \pm 1,1 ^{*1,5}
IL-2	pg/ml	0,14 \pm 0,03	6,3 \pm 0,9 ^{*1}	5,6 \pm 0,8 ^{*1}	5,0 \pm 0,4 ^{*1}	6,8 \pm 0,9 ^{*1}	5,1 \pm 0,7 ^{*1,5}	3,4 \pm 0,3 ^{*1,5,6}
G-CSF	pg/ml	12,3 \pm 1,0	20,5 \pm 1,9 ^{*1}	18,2 \pm 1,2 ^{*1}	16,7 \pm 1,3 ^{*1}	23,5 \pm 2,1 ^{*1}	19,2 \pm 1,7 ^{*1,2}	14,5 \pm 1,1 ^{*1,5,6}

Примечание. * – p < 0,05; цифры рядом со звездочкой – по отношению к показателям какой группы даны эти различия.

Note. * – p < 0.05; figures marked with an asterisk beside – with respect to which group indexes are given to these differences.

ТАБЛИЦА 2. СИСТЕМА КОМПЛЕМЕНТА И ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА I И II СТАДИИ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ (M±m)
TABLE 1. THE COMPLEMENT SYSTEM AND FUNCTIONAL-METABOLIC ACTIVITY OF BLOOD NEUTROPHILS AT PATIENTS WITH CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA I AND II STAGES BEFORE TREATMENT (M±m)

Показатели Indicators	Единицы измерения Units of measure	1		2		3		4		5		6		7	
		Здоровые Healthy		Хроническая ишемия головного мозга I Chronic cerebral ischemia I		Хроническая ишемия головного мозга I Chronic cerebral ischemia I		Хроническая ишемия головного мозга I Chronic cerebral ischemia I		Хроническая ишемия головного мозга II Chronic cerebral ischemia II		Хроническая ишемия головного мозга II Chronic cerebral ischemia II		Хроническая ишемия головного мозга II Chronic cerebral ischemia II	
				До лечения Before treatment		После лечения After treatment		До лечения Before treatment		После лечения After treatment		До лечения Before treatment		После лечения After treatment	
C3	mg/dL	82,2±1,8	67,6±3,8 ¹	78,2±2,7 ²	81,3±2,1 ²	65,1±2,5 ¹	68,3±3,0 ¹	72,3±2,6 ^{1,5}	72,3±2,6 ^{1,5}	42,4±1,1 ^{1,5,6}	45,2±1,3 ¹	42,4±1,1 ^{1,5,6}	42,4±1,1 ^{1,5,6}	42,4±1,1 ^{1,5,6}	42,4±1,1 ^{1,5,6}
C3a	ng/ml	38,2±2,1	46,8±1,4 ¹	45,4±1,2 ¹	37,2±0,9 ^{2,3}	47,0±1,8 ¹	45,2±1,3 ¹	42,4±1,1 ^{1,5,6}	42,4±1,1 ^{1,5,6}	26,8±1,6	26,0±1,3	26,8±1,6	26,8±1,6	26,8±1,6	26,8±1,6
C4	mg/dL	24,0±0,5	25,1±1,4	26,6±1,0	27,1±1,4	25,7±1,0	26,0±1,3	26,8±1,6	26,8±1,6	0,103±0,02 ^{5,6}	0,061±0,02 ^{1,5}	0,103±0,02 ^{5,6}	0,103±0,02 ^{5,6}	0,103±0,02 ^{5,6}	0,103±0,02 ^{5,6}
C5	mg/dL	0,101±0,01	0,052±0,02 ¹	0,08±0,0,0 ^{1,1}	0,091±0,01 ^{2,3}	0,049±0,01 ¹	0,061±0,02 ^{1,5}	0,103±0,02 ^{5,6}	0,103±0,02 ^{5,6}	99,5±5,8 ^{1,5,6}	114,7±6,2 ^{1,5}	99,5±5,8 ^{1,5,6}	99,5±5,8 ^{1,5,6}	99,5±5,8 ^{1,5,6}	99,5±5,8 ^{1,5,6}
C5a	ng/ml	78,4±4,5	125,3±7,8 ¹	101,4±3,8 ^{1,2}	94,5±4,7 ^{1,3}	131,5±8,1 ¹	114,7±6,2 ^{1,5}	99,5±5,8 ^{1,5,6}	99,5±5,8 ^{1,5,6}	291,2±2,6 ^{5,6}	272,2±3,3 ¹	291,2±2,6 ^{5,6}	291,2±2,6 ^{5,6}	291,2±2,6 ^{5,6}	291,2±2,6 ^{5,6}
C ₁ -ing.	ng/ml	288,5±3,7	274,0±4,3 ¹	275,6±4,4 ¹	290,4±5,1 ^{2,3}	272,2±3,3 ¹	268,5±4,0 ¹	291,2±2,6 ^{5,6}	291,2±2,6 ^{5,6}	41,9±1,0	39,5±2,7	41,9±1,0	41,9±1,0	41,9±1,0	41,9±1,0
Factor H	ng/ml	39,7±1,0	39,4±1,1	39,3±0,8	38,4±1,2	36,7±2,1	39,5±2,7	41,9±1,0	41,9±1,0	84,9±7,2	82,0±6,3	84,9±7,2	84,9±7,2	84,9±7,2	84,9±7,2
ФИ Phagocytic index	%	85,6±5,3	80,2±4,7	81,5±3,9	82,3±5,1	79,1±5,2	82,0±6,3	84,9±7,2	84,9±7,2	8,0±0,79	8,2±0,88	8,0±0,79	8,0±0,79	8,0±0,79	8,0±0,79
ФЧ Phagocytic number	абс. abs.	7,9±0,37	7,4±0,4	8,0±0,9	8,1±0,85	8,1±0,96	8,2±0,88	8,0±0,79	8,0±0,79	6,8±0,4	6,7±0,6	6,8±0,4	6,8±0,4	6,8±0,4	6,8±0,4
ИАФ Index of activity of phagocytes	–	6,8±0,8	5,9±0,3	6,5±0,45	6,7±0,58	6,4±0,5	6,7±0,6	6,8±0,4	6,8±0,4	11,2±1,4 ¹	11,2±1,4 ¹	11,2±1,4 ¹	11,2±1,4 ¹	11,2±1,4 ¹	11,2±1,4 ¹
НСТ-сп. NBT-spontaneous	%	8,1±0,45	10,1±0,33 ¹	10,4±0,5 ¹	8,5±0,6 ^{2,3}	11,0±1,2 ¹	11,2±1,4 ¹	11,2±1,4 ¹	11,2±1,4 ¹	30,5±2,7 ^{1,5,6}	38,1±3,8 ¹	30,5±2,7 ^{1,5,6}	30,5±2,7 ^{1,5,6}	30,5±2,7 ^{1,5,6}	30,5±2,7 ^{1,5,6}
НСТ-стим. NBT-stimulated	%	24,1±3,2	25,1±2,7	26,2±3,0	24,1±3,1	37,5±2,9 ^{1,2}	38,1±3,8 ¹	30,5±2,7 ^{1,5,6}	30,5±2,7 ^{1,5,6}	21,4±2,0 ^{1,5,6}	26,9±3,1 ¹	21,4±2,0 ^{1,5,6}	21,4±2,0 ^{1,5,6}	21,4±2,0 ^{1,5,6}	21,4±2,0 ^{1,5,6}
ФРН Functional reserve of neutrophils	%	16,0±2,3	15,0±1,4	15,8±1,3	15,6±1,7	26,5±2,1 ^{1,2}	26,9±3,1 ¹	21,4±2,0 ^{1,5,6}	21,4±2,0 ^{1,5,6}	3,4±0,03 ^{1,2}	3,4±0,03 ¹	3,4±0,03 ^{1,2}	3,4±0,03 ^{1,2}	3,4±0,03 ^{1,2}	3,4±0,03 ^{1,2}
ИСН Stimulation index of neutrophils	–	3,0±0,15	2,5±0,05 ¹	2,5±0,04 ¹	2,8±0,15 ^{2,3}	3,4±0,03 ^{1,2}	3,4±0,03 ¹	3,4±0,03 ^{1,2}	3,4±0,03 ^{1,2}	3,4±0,03 ^{1,2}	3,4±0,03 ¹	3,4±0,03 ^{1,2}	3,4±0,03 ^{1,2}	3,4±0,03 ^{1,2}	3,4±0,03 ^{1,2}

Примечание. * – p < 0,05; цифры рядом со звездочкой – по отношению к показателям какой группы даны эти различия.
Note. * – p < 0.05; figures marked with an asterisk beside – with respect to which group indexes are given to these differences.

ТАБЛИЦА 3. ИММУНОКОРРЕГИРУЮЩАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА I И II СТАДИИ

TABLE 3. IMMUNOCORRECTIVE EFFICIENCY OF VARIOUS SCHEMES OF PHARMACOLOGICAL THERAPY AT PATIENTS WITH CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA I AND II STAGES

№ п/п	Схемы фармакокоррекции Schemes of pharmacological correction	Измененные показатели иммунного статуса до лечения (%) The changed indicators of the immune status before treatment (%)	Из них после проведения фармакологической коррекции (%): From them after carrying out pharmacological correction (%):		
			нормализованы normalized	корректированы corrected	не изменены или увеличены aren't changed or increased
Хроническая ишемия головного мозга I (Chronic cerebral ischemia I)					
1.	Церетон, актовегин Cereton, Actovegin	73,1	5,3	26,3	68,4
2.	Церетон, актовегин, глутоксим Cereton, Actovegin, Glutoxim		52,6	21,1	26,3
Хроническая ишемия головного мозга II (Chronic cerebral ischemia II)					
1.	Церетон, актовегин Cereton, Actovegin	80,8	0	47,6	52,4
2.	Церетон, актовегин, глутоксим Cereton, Actovegin, Glutoxim		19,0	57,1	23,8

держания С3- и С5-компонентов комплемента и С1-ингибитора, повышение компонентов С3а и С5а, уровень С4 и ингибитора фактора Н остался в пределах нормы. После проведенного лечения, включавшего церетон и актовегин, в сторону значений здоровых доноров корректировался уровень компонентов комплемента С5 и С5а. Применение глутоксима дополнительно, по сравнению с церетоном и актовегином, нормализовало содержание С5- и С1-ингибитора, изменило, но не до параметров здоровых доноров, концентрацию С3-, С3а- и С5а-компонентов комплемента (табл. 2).

При поступлении в клинику и после проведенного лечения у больных ХИМ I стадии показатели активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов (ФИ, ФЧ и ИАФ) и параметры кислород-зависимого метаболизма (НСТ-ст., ФРН) остались на уровне нормы. До фармакотерапии выявлено увеличение НСТ-сп. и снижение ИСН, нормализующиеся только после включения в лечение глутоксима (табл. 2).

При II стадии заболевания показатели фагоцитоза до и после лечения были на уровне здоровых доноров. Все параметры активности кислород-зависимых систем полиморфно-ядерных лейкоцитов (НСТ-сп., НСТ-ст., ФРН, ИСН) при поступлении в клинику были повышенными. После фармакотерапии с включением церетона и актовегина показатели функционально-метаболической активности нейтрофилов не изме-

нились. Применение глутоксима, по сравнению с его отсутствием в лечении, сдвигает в сторону показателей здоровых доноров НСТ-сп., НСТ-ст. и ФРН (табл. 2).

Таким образом, у пациентов с I и II стадией ХИМ на момент поступления в клинику оказались измененными от значений здоровых доноров, соответственно, 73,1% и 80,8% исследованных параметров иммунного статуса, из которых 66,7% параметров у больных с обеими стадиями ХИМ оказались одинаковыми по величине и по направленности изменений, еще 33,3% идентичны по направленности. На этом основании можно сделать вывод о значительных иммунных нарушениях, которые можно рассматривать как иммунное воспаление уже на I стадии развития заболевания. Использование в лечении ХИМ I стадии церетона и актовегина нормализует 5,3% измененных на момент поступления в клинику пациентов параметров иммунного статуса, корректирует 26,3% и оставляет без изменения или повышает от значений начала лечения 68,4%. Более эффективным оказалось включение в комплексную фармакотерапию иммуномодулятора глутоксима, так как нормализованы оказались 52,6%, корректированы 21,1% показателей и оказались без изменений 26,3% (табл. 3).

Применение при II стадии ХИМ церетона и актовегина не нормализует ни один из показателей иммунного статуса, измененных на начало

лечения, корригирует 47,6% и оставляет без изменения или повышает от параметров начала фармакотерапии 52,4%. Более эффективным, как и при I стадии заболевания, оказалось дополнение лечения глутоксимом, так как нормализованы оказались 19,0%, корригированы 57,1% показателей и оказались без изменений 23,8% (табл. 3).

Обсуждение

В наше исследование включены пациенты ХИМ на фоне гипертонической болезни II стадии, следовательно, имеющаяся у них церебральная гипоперфузия связана с микроангиопатиями, обусловленными АГ. Возникающая при этом гипоксия приводит к развитию воспалительной реакции, носящей метаболический характер и формирующей «цитокиновый каскад» с обнаруженным увеличением в системной циркуляции пациентов на обеих стадиях заболевания содержания провоспалительных цитокинов и хемокинов (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-18) [4, 13, 16, 21, 27].

TNF α – первичный медиатор воспаления, участвует в возникновении и развитии большинства инфекционных и иммунопатологических заболеваний, координирует цитокиновый каскад (IL-1 β , IL-6, IL-8). IL-1 – медиатор развития местной воспалительной реакции, участвует в трансформации местного воспаления в системное, экспрессию молекул адгезии на эндотелиоцитах, участвует в продукции белков острой фазы воспаления, проявляет нейрорегуляторную активность, массивная продукция IL-1 β развивается при ишемии. IL-6 – провоспалительный цитокин широкого действия, участвует в индукции практически всего комплекса местных проявлений воспаления. Провоспалительный хемокин IL-8 обеспечивает экстравазацию нейтрофилов и их направленную миграцию в очаг воспаления, где его источниками выступают макрофаги воспалительного очага и эндотелиальные клетки сосудов в зоне воспаления. IL-17 оказывает проатерогенный провоспалительный эффект через активацию выделения иммунными и эндотелиальными клетками IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ , G-CSF. IL-18 активирует моноциты и макрофаги, инициирует процессы апоптоза, индуцирует продукцию IL-8 и IFN γ в Т-лимфоцитах, макрофагах и NK-клетках, способствует дифференцировке Т-лимфоцитов в Th1-клеточную линию, которая лежит в основе развития провоспалительного и проатерогенного Th1-иммунного ответа, дестабилизирует атеросклеротическую бляшку [29, 30, 32, 34].

Кроме этого, выявлено существенное увеличение содержания IFN γ , колониестимулирующего фактора G-CSF и IL-2. IFN γ активирует NK-лимфоидные клетки врожденного иммунитета

1-го типа (ILC-1), которые обеспечивают поляризацию дифференцировки Т-клеток в сторону Т-хелперов 1-го типа (Th1), активирующих макрофаги, экспрессирующие ферменты, ответственные за формирование активных форм кислорода, NO-синтазы, образование NO. G-CSF активирует зрелые нейтрофилы и поддерживает рост как смешанных гранулоцитарно-моноцитарных колоний, так и отдельных колоний гранулоцитов и моноцитов/макрофагов. IL-2 обладает выраженной способностью индуцировать активность практически всех клонов цитотоксических клеток, повышает цитолитическую функцию Т-киллеров и NK-клеток, активирует моноциты и макрофаги, повышая тем самым синтез и секрецию провоспалительных цитокинов, хемокинов, колониестимулирующих факторов GM-CSF [8, 10, 20, 28, 35].

Повышение при обеих стадиях ХИМ провоспалительных цитокинов (IL-10, IL-1ra, IL-4) носит компенсаторный характер, ограничивающий воспалительную реакцию, одновременно высокий уровень IL-6 и IL-17 также может оказывать противовоспалительный эффект при значительном повышении провоспалительных цитокинов за счет стимуляции выработки IL-10, IL-1ra, кортизола [8, 24].

У пациентов с ХИМ I и II стадии установлена активация системы комплемента с отсутствием компенсаторного повышения ингибитора фактора H со снижением C1-инг., о чем свидетельствовало снижение начальных компонентов комплемента C3 и C5 с повышением уровня освобождающихся при активации фрагментов C3a и C5a – активных хемотаксических и сосудорасширяющих факторов, обладающих анафилактической активностью и участвующих в реакциях воспаления и гиперчувствительности [3, 19, 25, 28].

При ХИМ II стадии установлено повышение показателей кислород-зависимого метаболизма полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови, не компенсируемое проведенной фармакотерапией и свидетельствующее о повышенной продукции активных форм кислорода в результате респираторного взрыва, что, возможно, можно рассматривать, как важнейшее звено дальнейшего развития воспаления при данной стадии ХИМ [1, 22].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у пациентов с ХИМ I и II стадии на фоне гипертонической болезни выявлены сходные на обеих стадиях заболевания изменения параметров иммунного статуса, свидетельствующие о наличии иммунного воспаления. Отличительное повышение показателей кислород-зависимой активности циркулирующих нейтрофилов при II стадии ХИМ можно рассматри-

вать как важнейшее звено дальнейшего развития воспаления.

Корректирующие иммунные эффекты церетона и актовегина, в первую очередь, можно объяснить улучшением мозгового кровотока, нейромедиаторным и метаболическим действием холина альфосцерата (церетон), плейотропным, нейрометаболическим действием актовегина с его выраженным антиоксидантным, антигипоксантичным и антиапоптотическим механизмом действия, поскольку улучшает транспорт и окисление глюкозы клетками, стимулирует потребление кислорода, что приводит к стабилизации клеточных мембран и снижению процессов анаэробного

гликолиза [26, 31]. В то же время нельзя исключить и прямое воздействие церетона и актовегина на клетки иммунной системы за счет указанных фармакодинамических эффектов. Более выраженные иммунокорректирующие эффекты глутоксима обеспечиваются избирательным влиянием на функционально-метаболическую активность моноцитов/макрофагов, нейтрофилов, НК-клеток, повышая или снижая их активность в зависимости от исходных значений. Кроме того, препарат оказывает выраженное противовоспалительное, антиоксидантное и регенеративное действие [18, 23].

Список литературы / References

1. Беляева А.С., Ванько Л.В., Матвеева Н.К., Кречетова Л.В. Нейтрофильные гранулоциты как регуляторы иммунитета // Иммунология, 2016. Т. 37, № 2. С. 129-133. [Belyaeva A.S., Vanko L.V., Matveyeva N.K., Krechetova L.V. Neutrophils as regulators of immunity. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 2, pp. 129-133. (In Russ.)]
2. Бережная С.В., Якупов Э.З. Нейропротективная терапия хронической ишемии головного мозга в амбулаторных условиях // Журнал неврологии и психиатрии, 2015. № 6. С. 48-52. [Berezhnaya S.V., Yakupov E.Z. Neuroprotective therapy of chronic cerebral ischemia in the outpatient setting. *Zhurnal neurologii i psikiatrii = Journal of Neurology and Psychiatry*, 2015, no. 6, pp. 48-52. (In Russ.)]
3. Бояджян А.С., Цаканова Г.В., Жангарян Л.Г., Сим Р.Б., Нагапетян К.М. Вовлечение лектинового каскада комплемента в постшемический воспалительный ответ // Цитокины и воспаление, 2010. Т. 9, № 3. С. 35-39. [Boyajian A.S., Tsakanova G.V., Gangaram L.G., SIM R.B., Nahapetyan K.M. Involvement of the lectin of the complement cascade in the postischemic inflammatory response. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2010, Vol. 9, no. 3, pp. 35-39. (In Russ.)]
4. Воронина Е.Ю., Ласков В.Б., Шульгинова А.А., Конопля А.И. Цитокиновый спектр у больных хронической ишемией мозга (дисциркуляторной энцефалопатией) и коррекция его нарушений // Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье», 2014. № 1. С. 52-58. [Voronina E.Yu., Laskov V.B., Shulginova A.A., Konoplya A.I. Cytokine spectrum in patients with chronic ischemia of the brain (discirculatory encephalopathy) and correction of its disorders. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i ego zdorovyе" = Kursk Scientific Practical Bulletin "Man and his Health"*, 2014, no. 1, pp. 52-58. (In Russ.)]
5. Гаврилюк Е.В., Конопля А.И., Караулов А.В. Роль иммунных нарушений в патогенезе артериальной гипертонии // Иммунология, 2016. Т. 37, № 1. С. 29-34. [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. 29-34. (In Russ.)]
6. Гусев Е.И., Чуканова А.С. Современные патогенетические аспекты формирования хронической ишемии мозга // Журнал неврологии и психиатрии, 2015. № 3. С. 4-8. [Gusev E.I., Chukanova A.S. Modern pathogenetic aspects of chronic cerebral ischemia. *Zhurnal neurologii i psikiatrii = Journal of Neurology and Psychiatry*, 2015, no. 3, pp. 4-8. (In Russ.)]
7. Захаров В.В., Вахнина Н.В., Громова Д.О., Тараповская А.В. Хроническая недостаточность мозгового кровообращения: описание клинического случая // Терапевтический архив, 2016. № 4. С. 93-99. [Zakharov V.V., Vakhnina N.V. Gromova D.O., Tarapovskaya A.V. Chronic cerebrovascular insufficiency: a clinical case description. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2016, no. 4, pp. 93-99. (In Russ.)]
8. Зурочка А.В., Давыдова Е.В., Альтман Д.Ш. Цитокиновый контроль регуляции гематоэнцефалического барьера и уровни неспецифических маркеров повреждения нервной ткани у пациентов с ранними формами хронической ишемии мозга // Российский иммунологический журнал, 2013. № 7. С. 451-455. [Zurochka A.V., Davydova E. V., Altman D.Sh. Control of cytokine regulation of blood-brain barrier and levels of nonspecific markers of nervous tissue damage in patients with early forms of chronic ischemia of the brain. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, no. 7, pp. 451-455. (In Russ.)]
9. Камчатнов П.Р., Сальникова Г.С., Михайлова Н.А. Хронические расстройства мозгового кровообращения и возможности их фармакологической коррекции // Журнал неврологии и психиатрии, 2012. № 6. С. 72-75. [Kamchatnov P.R., Salnikova S.G., Mikhailova N.A. Chronic disorders of cerebral circulation and possibility of their pharmacological correction. *Zhurnal neurologii i psikiatrii = Journal of Neurology and Psychiatry*, 2012, no. 6, pp. 72-75. (In Russ.)]
10. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines]. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.
11. Меньшиков И.В., Макарова М.И., Булагова Н.И., Бедулева Л.В., Абишева Н.Н., Поздеева М.Г., Сиднева Н.А., Санникова А.А., Обухова Е.В. Аутоиммунные реакции в патогенезе атеросклероза // Имму-

нология, 2010. № 5. С. 242-246. [Menshikov I.V., Makarova M.I., Bulatova N.I., Beduleva L.V., Abisheva N.N., Pozdeeva M.G., Sidneva N.A., Sannikova A.A., Obukhova E.V. Autoimmunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Immunologiya = Immunology*, 2010, no. 5, pp. 242-246. (In Russ.)]

12. Неврология. Национальное руководство / под ред. Е.И. Гусева. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 637 с. [Neuroscience. National leadership / ed. by E. I. Gusev]. Moscow: GEOTAR-Media, 2009. 637 p. (In Russ.)]

13. Отман И.Н., Зозуля С.А., Сарманова З.В., Ключник Т.П. Воспалительные и аутоиммунные реакции при различных формах нарушения функционирования нервной системы // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2015. Т. 59, № 3. С. 81-88. [Othman I.N., Zozulya S.A., Sarmanova Z.V., Klushnik T.P. Inflammatory and autoimmune reactions in various forms of dysfunction of the nervous system. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 2015, Vol. 59, no. 3, pp. 81-88. (In Russ.)]

14. Пёхова К.А., Михин В.П., Гаврилюк Е.В., Конопля А.И. Иммунометаболические нарушения при гипертонической болезни различной степени тяжести // Вестник новых медицинских технологий, 2012. Т. XIX, № 1. С. 172-173. [Pekhova K.A., Mikhin V.P., Gavrilyuk E.V., Konoplya A.I. Immunometabolic disorders with hypertension of various severity level. *Vestnik novykh meditsinskikh tehnologiy = Bulletin of New Medical Technologies*, 2012, Vol. XIX, no. 1, pp. 172-173. (In Russ.)]

15. Путилина М.В. Роль артериальной гипертензии в развитии хронического нарушения мозгового кровообращения // Журнал неврологии и психиатрии, 2014. № 9. С. 124-128. [Putilina M.V. The role of arterial hypertension in development of chronic disorders of cerebral circulation. *Zhurnal neurologii i psichiatrii = Journal of Neurology and Psychiatry*, 2014, no. 9, pp. 124-128. (In Russ.)]

16. Радаева О.А., Симбирцев А.С. Клинико-патогенетические особенности взаимодействия системы интерлейкина 1 и классических вазопрессорных факторов у больных эссенциальной артериальной гипертензией // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 3. С.83-89. [Radaeva O.A., Simbirtsev A.S. Clinical and pathogenetic features of interaction of interleukin-1 and the classical vasopressor factors in patients with essential arterial hypertension. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 3, pp. 83-89. (In Russ.)]

17. Румянцева С.А., Афанасьев В.В., Силина Е.В. Патофизиологическая основа комплексной нейропротекции при ишемии мозга // Журнал неврологии и психиатрии, 2009. № 3. С. 64-68. [Rumyantseva S.A., Afanasiev V.V., Silina E.V. Pathophysiological basis of complex neuroprotection in cerebral ischemia. *Zhurnal neurologii i psichiatrii = Journal of Neurology and Psychiatry*, 2009, no. 3, pp. 64-68. (In Russ.)]

18. Свистушкин В.М., Леонова М.В., Никифорова Г.Н., Покозий И.Ю. Применение иммуномодулятора Галавит в лечении хронического тонзиллита // Российский медицинский журнал, 2015. № 6. С. 342. [Svistushkin V.M., Leonov M.V., Nikiforova G.N., Pokoziy I.Yu. The application of immunomodulator Galavit in the treatment of chronic tonsillitis. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2015, no. 6, p. 342. (In Russ.)]

19. Серебряная Н.Б., Лобзин С.В., Кула И.И., Ищенко А.М. Состояние системы комплемента при первой атаке демиелинизирующих заболеваний – рассеянного склероза и клинически изолированного синдрома // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 3. С. 42-46. [Serebryanaya N.B., Lobzin V.S., Kula, I.I., Ishchenko A.M. The status of the complement system at the first attack of demyelinating diseases – multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 3, pp. 42-46. (In Russ.)]

20. Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление, 2002. Т. 1, № 1. С. 9-11. [Simbirtsev A.S. Cytokines – a new system of regulation of defense reactions of the organism. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2002, Vol. 1, no. 1, pp. 9-11. (In Russ.)]

21. Скворцова В.И., Соколов К.В., Шамалов Н.А. Артериальная гипертензия и цереброваскулярные нарушения // Журнал неврологии и психиатрии, 2006. № 11. С. 57-65. [Skvortsova V.I., Sokolov K.V., Shamalov N.A. Hypertension and cerebrovascular. *Zhurnal neurologii i psichiatrii = Journal of Neurology and Psychiatry*, 2006, no. 11, pp. 57-65.

22. Соловьева Э.Ю., Баранова О.А., Чеканов А.В., Панасенко О.М., Чипова Д.Т., Тлапшокова Л.Б., Мячин И.В., Карнеев А.Н., Федин А.И. Исследование острого и хронического воспаления при ишемии мозга на модели изолированных нейтрофилов // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 3. С. 60-64. [Solovyova E.Yu., Baranova O.A., Chekanov A.V., Panasenko O.M., Chipova D.T., Tlapshokova L.B., Myachin I.V., Karneev A.N., Fedin A.I. Study of acute and chronic inflammation in cerebral ischemia by the model of isolated neutrophils. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 3, pp. 60-64. (In Russ.)]

23. Сологуб Т.В., Осиновец О.Ю. Иммуномодуляторы в комплексном лечении ОРВИ: возможности применения препарата Галавит // Русский медицинский журнал, 2013. № 3. С. 144-146. [Sologub T.V., Osinovets O.Yu. Immunomodulators in complex treatment of SARS: possible use of the drug Galavit. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2013, no. 3, pp. 144-146. (In Russ.)]

24. Турмова Е.П., Маркелова Е.В., Силаев А.А., Лукьянов П.А., Чикаловец И.В. Особенности цитокинового статуса у больных с атеросклерозом // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 4. С. 323-331. [Turova E.P., Markelova E.V., Silaev A.A., Lukyanov P.A., Chikalovets I.V. Peculiarities of cytokine status in patients with atherosclerosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 4, pp. 323-331. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-4-323-332.

25. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология. М.: Медицина, 2010. 752 с. [Khaitov R.M., Ignatyeva G.A., Sidorovich I.G. Immunology. The norm and pathology]. Moscow: Medicine, 2010. 752 p. (In Russ.)]

26. Шавловская О.А. Применение актовегина при нейропротективной терапии больных с цереброваскулярными заболеваниями // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2013. Т. 113, № 6. С. 74-76. [Shavlovskaya O.A. The use of Actovegin in neuroprotective therapy of patients with cerebrovascular disease. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii imeni S.S. Korsakova* = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry, 2013, Vol. 113, no. 6, pp. 74-76. (In Russ.)]

27. Шульгинова А.А. Хроническая ишемия головного мозга: иммунометаболические нарушения, коррекция // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 4. С. 382. [Shulginova A.A. Chronic ischemia of the brain: immunometabolic violations, correction. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 4, p. 382. (In Russ.)]

28. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 749 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 749 p.

29. Ярилин Д.А. Роль фактора некроза опухолей в регуляции воспалительного ответа моноцитов и макрофагов // Иммунология, 2014. № 4. С. 195-201. [Yarilin D.A. The role of tumor necrosis factor in the regulation of the inflammatory response of monocytes and macrophages. *Immunologiya* = *Immunology*, 2014, no. 4, pp. 195-201. (In Russ.)]

30. Chen C.J., Kono H., Golenbock D., Reed G., Akira S., Rock K.L. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 27, pp. 851-856.

31. Elmlinger M.W., Kriebel M., Ziegler D. Neuroprotective and anti-oxidative effects of the hemodialysate actovegin on primary rat neurons *in vitro*. *Neuromolecular Med.*, 2011, Vol. 13, no. 4, pp. 266-274.

32. Khaden S.A., Gaffen S.L., Kolls J.K. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosa Immunol.*, 2009, Vol. 2, no. 5, pp. 403-411.

33. Libby R., Ridker P.M., Hansson G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 2011, Vol. 473, pp. 317-325.

34. Lukens J.R., Gross J.M., Kanneganti T.D. IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Front. Immunol.*, 2012, no. 3, p. 315.

35. Spits H., Artis D., Colonna M., Diefenbach A., DiSanto J.P., Eberl G., Koyasu S., Locksley R.M., McKenzie A.N., Mebius R.E., Powrie F., Vivier E. Innate lymphoid cells – a proposal for a uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, pp. 145-149.

Авторы:

Шульгинова А.А. — д.м.н., ассистент кафедры неврологии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Курск, Россия

Конопля А.И. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Курск, Россия

Быстрова Н.А. — д.м.н., профессор, профессор кафедры биологической химии ГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Курск, Россия

Гаврилюк В.П. — д.м.н., доцент, профессор кафедры детской хирургии и педиатрии факультета последипломного образования ГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Курск, Россия

Караулов А.В. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Shulginova A.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Neurology and Neurosurgery, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

Konoplya A.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Biological Chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

Bystrova N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Biological Chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

Gavriliuk V.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Pediatric Surgery and Pediatrics, Faculty of Postgraduate Education, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

Karaulov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, First Moscow I.M. Sechenov State Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 13.11.2016
Принята к печати 29.12.2016

Received 13.11.2016
Accepted 29.12.2016

ПОЛИМОРФИЗМ ПРОМОТОРНОГО РЕГИОНА *rs1800629* ГЕНА *TNF α* И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА СОДЕРЖАНИЕ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ РОЖЕЙ

Емельянов А.С., Емельянова А.Н., Пушкарев Б.С., Витковский Ю.А.

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ,
г. Чита, Россия

Резюме. Рожь – актуальная проблема медицины. Заболеваемость до настоящего времени остается высокой без тенденции к снижению, ухудшая качество жизни, занимая существенное место в структуре временной утраты трудоспособности. При этом учащается переход острых форм в хроническое течение с частыми рецидивами. Известно, что в патогенезе рожки важная роль принадлежит изменениям иммунологической реактивности, которая, в свою очередь, зависит от генетических особенностей индивидуума. Прогнозирование течения и исходов рожки является важным и пока еще не решенным вопросом. В прогнозировании клинического течения рожки не исключается участие генетических особенностей организма, в частности полиморфизма генов некоторых цитокинов, одним из которых является фактор некроза опухолей (*TNF α*). Исследования SNP (single nucleotide polymorphism) гена *TNF α* показали возрастание транскрипции гена, а также увеличение продукции *TNF α* . Целью исследования явилось изучение частоты полиморфных аллелей и генотипов промотора гена *TNF α* *rs1800629*, а также их влияния на содержание фактора некроза опухолей в крови здоровых лиц и больных рожкой при первичном и рецидивирующем течении. В исследовании принимали участие 104 больных рожкой (54 пациента с первичной рожкой, 50 пациентов с рецидивирующей формой заболевания) и 94 здоровых резидента. Для анализа полиморфизма гена *TNF α* *rs1800629* использован метод аллель-специфической полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией. Измерение концентрации *TNF α* проводилось методом иммуноферментного анализа. В ходе молекулярно-генетического исследования обнаружены все искомые мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии с частотным подчинением эквilibriumу Харди–Вайнберга ($p > 0,05$). Среди пациентов с рожкой значительно реже ($p < 0,001$) регистрировалась минорная аллель А (в 2,9 раза), в 88,7% случаев выявлялись носители гомозигот *G/G* гена *TNF α* *rs1800629*. При этом среди больных и здоровых резидентов не выявлено ни одного случая носительства мутантных генотипов *A/A*. Таким образом, аллель *G* гена *TNF α* *rs1800629* и генотип *G/G* предрасполагают к развитию рожки. Носительство аллели *A* гена *TNF α* *rs1800629* и гетерозиготный вариант *G/A* снижают вероятность развития данного инфекционного процесса. Присутствие *G*-аллели сопровождается уменьшением продукции *TNF α* у больных рожкой при гетерозиготном *G/G* варианте носительства полиморфизма гена *TNF α* *rs1800629*.

Ключевые слова: рожь, генетический полиморфизм, фактор некроза опухоли альфа, цитокины, воспаление, *rs1800629*

Адрес для переписки:

Емельянов Артур Сергеевич
ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ
672000, Россия, Забайкальский край, г. Чита,
ул. Токмакова, 46-68.
Тел.: 8 (964) 466-39-62.
E-mail: artur1926@yandex.ru

Address for correspondence:

Emelyanov Artur S.
Chita State Medical Academy
672000, Russian Federation, Transbaikal Region, Chita,
Tokmakova str., 46-68.
Phone: 7 (964) 466-39-62.
E-mail: artur1926@yandex.ru

Образец цитирования:

А.С. Емельянов, А.Н. Емельянова, Б.С. Пушкарев, Ю.А. Витковский «Полиморфизм промоторного региона *rs1800629* гена *TNF α* и его влияние на содержание фактора некроза опухолей альфа в крови здоровых лиц и больных рожкой» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 411-416. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-411-416

© Емельянов А.С. и соавт., 2018

For citation:

A.S. Emelyanov, A.N. Emelyanova, B.S. Pushkarev, Yu.A. Vitkovsky "Promoter region *rs1800629* *TNF α* polymorphism and its influence on tumor necrosis factor alpha concentration in blood of healthy individuals and patients with erysipelas", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 411-416. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-411-416

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-411-416

PROMOTER REGION *rs1800629* *TNF α* POLYMORPHISM AND ITS INFLUENCE ON TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA CONCENTRATION IN BLOOD OF HEALTHY INDIVIDUALS AND PATIENTS WITH ERYSIPELAS

Emelyanov A.S., Emelyanova A.N., Pushkarev B.S., Vitkovsky Yu.A.

Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Abstract. Erysipelas is an actual problem of health care. It is characterized by consistently high morbidity, excepted tendency to recur, reduced the life quality and took important place in the structure of temporary disability. The changes of immunological reactivity, depended on genetic characteristics of the individual were established to play important role in the pathogenesis of erysipelas. The prediction of the course of erysipelas is unresolved problem yet. The genetic features of the organism, such as the genetic polymorphisms of some cytokines, involved on the prediction of the course of erysipelas. Investigations of *TNF α* genes demonstrated that their transcriptions increased and productions enhanced. Aim was to study the influence of polymorphism of *TNF α* gene promoter *rs1800629* on the concentration of *TNF α* in the blood of healthy individuals and patients with erysipelas in primary and recurrent course. The study was performed at 104 patients with erysipelas (54 patients with primary erysipelas and 50 patients with recurrent course) and 94 healthy residents. Gene polymorphism of *TNF α* *rs1800629* was detected by PCR method. Measurement of the concentration of *TNF α* was performed by immunoassay analysis. Homo- and heterozygous SNP of the *TNF α* *rs1800629* gene were conformed to Hardy–Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). Minor allele *A* was found to be registered in erysipelas patient less frequently by 2.9 times than in healthy individuals. The patients who carried homozygous *G/G* were observed in 88.7% of cases. At that heterozygous *G/A* were registered in any case. In other case, among the patients, no cases of the carriage of the mutant genotypes *A/A* were detected. Thus, allele *G* and genotypes *G/G* of promoter gene of *TNF α* *rs1800629* predisposed to erysipelas. Heterozygous *G/A* of promoter gene of *TNF α* *rs1800629* increased the risk of erysipelas. *G*-allele carrier led to decrease of *TNF α* concentration homozygous *G/G* patients.

Keywords: erysipelas, genetic polymorphism, *TNF α* , cytokines, inflammation, *rs1800629*

Введение

Рожа — актуальная проблема здравоохранения [8]. Заболеваемость до настоящего времени остается высокой без тенденции к снижению, ухудшая качество жизни, занимая существенное место в структуре временной утраты трудоспособности [4, 8]. При этом учащается переход острых форм в хроническое течение с частыми рецидивами. В настоящее время активно изучается патогенез данной патологии, в котором иммунологические и гемостазиологические звенья являются ведущими и определяют характер течения заболевания [12].

Реагирование иммунитета при внедрении β -гемолитического стрептококка группы А характеризуется продукцией целого каскада цитокинов, важной функцией которых является регуляция взаимодействия иммунокомпетентных клеток и определение направления иммунного ответа [3, 4, 5].

В прогнозировании клинического течения рожи не исключается участие генетических особенностей организма, в частности полиморфизма генов некоторых цитокинов, что может являться одним из факторов определения индивидуальной восприимчивости (устойчивости) к инфицирова-

нию, тяжести, развитию осложнений заболеваний, в том числе и рожи [1].

Особый интерес представляют не только полиморфизмы структурных генов, но и некодируемые участки — интроны, промоторы, мутации которых сказываются на экспрессии и количестве кодируемого белка [6].

Для гена фактора некроза опухолей (tumor necrosis factors — *TNF α*) описано несколько замен единичных нуклеотидов (англ. single nucleotide polymorphism — SNP), вызывающих количественные изменения функционирования гена. Исследования SNP гена *TNF α* показали возрастание транскрипции гена, а также увеличение экспрессии *TNF α* , что при определенных условиях может способствовать более выраженному развитию системной воспалительной реакции и в значительной степени отражать восприимчивость к инфекциям.

В связи с этим важно проследить уровень цитокина в зависимости от полиморфных вариантов его гена при роже.

Целью исследования явилось изучение частоты полиморфных аллелей и генотипов промотора гена *TNF α* *rs1800629*, а также их влияния на содержание фактора некроза опухолей в крови здоровых лиц и больных рожей при первичном и рецидивирующем течении.

Материалы и методы

В исследование были включены больные рожей (по МКБ-10 рубрики, А-46) в возрасте от 34 до 52 лет (средний возраст $47,5 \pm 3,0$ года), 49 мужчин и 55 женщин, с локализацией в области лица, верхних и нижних конечностей, эритематозной, эритематозно-буллезной, эритематозно-геморрагической, буллезно-геморрагической формами, первичного и рецидивирующего течения. Диагноз установлен на основании клинико-anamnestических данных, согласно классификации В.Л. Черкасова (1986) [10]. Клиническое проявление заболевания характеризовалось симптомами интоксикации, лихорадкой, появлением на коже яркой гиперемии и отека, болезненности пораженного участка при пальпации регионарного лимфаденита. Критериями исключения из настоящего исследования служили: повторная и послеродовая формы рожи, беременность, пневмония, сахарный диабет 1 и 2 типов, острые сердечно-сосудистые заболевания, кишечные инфекции, острые и хронические вирусные инфекции.

По кратности течения заболевания пациенты были распределены на 2 группы: 1) 54 пациента с первичной рожей, 2) 50 пациентов с рецидивирующей рожей. В группу контроля включены 94 практически здоровых доноров, не имеющих острых и обострения хронических инфекционных и аутоиммунных заболеваний, аллергических реакций. Группы сопоставимы по возрастным и половым характеристикам (средний возраст $45,1 \pm 4,0$ лет, 45 мужчин и 49 женщин).

Все обследованные – представители европеоидной расы, родившиеся и проживающие на территории Забайкальского края.

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией всемирной медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki) (1964, 2013 – поправки) и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом Минздрава РФ (от 19.06.2003 г., № 266).

Для исследования использовали цельную кровь пациентов и здоровых лиц. Образцы крови пациентов коллекционировали в начале разгара заболевания в 1-2 день поступления в стационар.

Измерение концентрации TNF α проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Определение SNP промотора гена TNF α rs1800629 осуществлялось методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) с использованием наборов для определения полиморфизмов в геноме человека НПФ «Литех» (Москва). Амплификация фрагментов гена проводилась в термоциклере (модель «Бис»-M111, ООО «Бис-Н», г. Ново-

сибирск). Детекцию продукта амплификации проводили в 3% агарозном геле.

Полученные данные обработаны с использованием пакета программ Statistica 10. При сравнении частот аллелей и генотипов по качественно-му бинарному признаку пользовались критерием χ^2 . Степень риска развития событий оценивали по величине отношения шансов (odd ratio [OR]) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI95%). Для описания характера распределения количественных признаков определялись медиана (Me) и интерквартильная широта (25%-75%). При определении межгрупповых различий в уровне цитокинов применялся критерий Кра-скалеса–Уоллиса. При наличии статистически значимых различий попарное сравнение групп осуществлялось с помощью критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони.

Результаты

В результате проведенного генетического анализа среди больных рожей и здоровых резидентов обнаружено, что распределение частот аллелей и генотипов исследуемого полиморфизма TNF α rs1800629 соответствует равновесию Харди–Вайнберга ($p > 0,05$).

Выявлено, что среди больных рожей встречаемость полиморфных вариантов исследуемого гена существенно отличалась от группы контроля.

В группе пациентов в 1,1 раза чаще встречалась мажорная аллель G с частотой 0,943 и в 2,9 раза реже – минорная аллель A с частотой 0,057, чем в группе здоровых лиц ($\chi^2 = 11,42$; $p = 0,0007$).

В группе больных рожей гомозиготный генотип G/G встречался в 88,7%, гетерозиготные варианты G/A – в 11,3% ($\chi^2 = 13,03$; $p = 0,001$). Распределение генотипов среди здоровых резидентов оказалось следующим: G/G – 67,0%, G/A – 33,0% ($\chi^2 = 13,03$; $p = 0,001$). При этом в исследуемых группах не выявлено случаев носительства генотипов A/A гена TNF α (табл. 1).

Исходя из полученных данных о распределении частот, шанс развития рожи у носителей генотипа G/G гена TNF α rs1800629 равен 3,85 [CI95%: 1,80-8,23], у обладателей генотипа G/A гена TNF α – 0,26 [CI95%: 0,12-0,56] ($p = 0,001$). Вероятность развития заболевания для лиц, имеющих мажорную аллель G, составляет 3,28 [CI95%: 1,60-6,75], для резидентов, несущих минорную аллель A – 0,30 [CI95%: 0,15-0,63] ($p = 0,0007$).

Анализируя распределение аллелей и генотипов в группах пациентов с различной кратностью течения рожи, было установлено, что полученные результаты в группе с рецидивирующим процессом достоверно не отличаются от группы с первичной формой ($p > 0,05$) (табл. 2).

Таким образом, полиморфизм промоторного региона rs1800629 гена TNF α влияет на возникновение рожи, но не является прогностически

ТАБЛИЦА 1. ВСТРЕЧАЕМОСТЬ SNP *TNFα* (G308A) У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ РОЖЕЙ

TABLE 1. OCCURRENCE OF A SNP OF *TNFα* (G308A) FROM HEALTHY INDIVIDUALS AND PATIENTS WITH ERYSIPELAS

Генотипы (%) Genotypes Аллели (P) Alleles	Контрольная группа Control group n = 94	Больные рожей Patients with erysipelas n = 104	χ^2 (p)
G/G	67,0%	88,7%	13,03 p = 0,001
G/A	33,0%	11,3%	
A/A	0%	0%	
G	0,835	0,943	11,42 p = 0,0007
A	0,165	0,057	

ТАБЛИЦА 2. ВСТРЕЧАЕМОСТЬ SNP *TNFα* (G308A) У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ С ПЕРВИЧНОЙ И РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ФОРМАМИ РОЖИ

TABLE 2. OCCURRENCE OF SNP OF *TNFα* (G308A) FROM HEALTHY INDIVIDUALS AND PATIENTS WITH PRIMARY AND RECURRENT FORMS OF ERYSIPELAS

Генотипы (%) Genotypes Аллели (P) Alleles	Контрольная группа Control group n = 94	Первичная рожа ¹ Primary erysipelas ¹ n = 54	Рецидивирующая рожа ² Recurrent erysipelas ² n = 50	χ^2 (p ₁)	χ^2 (p ₂)	χ^2 (p ₃)
G/G	67,0%	87,0%	78,0%	6,14 p = 0,01	1,90 p = 0,39	1,48 p = 0,48
G/A	33,0%	13,0%	22,0%			
A/A	0%	0%	0%			
G	0,835	0,935	0,890	7,20 p = 0,03	1,58 p = 0,21	1,34 p = 0,25
A	0,165	0,065	0,110			

Примечание. p₁, p₂ – значимость различий по сравнению со здоровыми; p₃ – значимость различий распределения частот генотипов и аллелей групп больных первичной и рецидивирующей рожей. Курсивом отмечены достоверные различия.

Note. p₁, p₂ – significant differences with group of healthy people; p₃ – significant differences of genotypes and alleles in groups on patients with primary and recurrent erysipelas; Significant differences marked by italic.

значимым фактором развития рецидивов заболевания.

Исходя из того, что исследуемый SNP *rs1800629* гена *TNFα* расположен в промоторном регионе, мы выяснили влияние данного полиморфизма на уровень продукции кодируемого цитокина (табл. 3).

Обнаружено, что у пациентов с различной кратностью процесса вне зависимости от генотипа увеличивается концентрация цитокина *TNFα* по сравнению со здоровыми донорами (p < 0,05). Одновременно с этим его уровень у больных-носителей разных генотипов различен.

При первичной и рецидивирующей роже у обладателей генотипа *G/G* повышается концентрация *TNFα* до 23,4 (21,3–25,5) пкг/мл (p₁ = 0,002) и 27,2 (24,9–29,0) пкг/мл (p₁ = 0,004) соответственно, что значительно выше по сравнению с группой контроля при отсутствии антигенного воздействия. Содержание *TNFα* у резидентов-носителей гетерозигот *G/A* при первичной роже достигало уровня 26,7 (24,2–27,6) пкг/мл (p₁ = 0,005, p₂ = 0,008), при рецидивирующей форме – 28,4 (25,5–31,4) пкг/мл (p₁ = 0,003, p₂ = 0,006) (табл. 3).

При парном сравнении уровня *TNFα* у больных первичной и рецидивирующей рожей в зависимости от генотипа статистически значимых различий обнаружено не было (критерий Манна–Уитни, p > 0,05).

Таким образом, полученные данные указывают, что полиморфизм *rs1800629* гена *TNFα* влияет на уровень *TNFα* в крови больных рожей. Однако изменение концентрации исследуемого цитокина не является прогностическим фактором развития рецидива заболевания, равно как и полиморфизм гена *TNFα* в регионе *rs1800629*.

Обсуждение

Известно, что для рожи характерен высокий уровень провоспалительных цитокинов, в том числе и *TNFα*. Вероятно, это носит благоприятный характер, поскольку способствует развитию клеточно-опосредованного адаптивного иммунного ответа [1]. В физиологических условиях *TNFα* вырабатывается в организме в крайне малом количестве, локально проявляя свои эффекты. При патологических процессах активируется его продукция, и, попадая в кровь, фактор некро-

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ TNF α В КРОВИ БОЛЬНЫХ РОЖЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА TNF α (G308A), пкг/мл (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. CONTENTS OF TNF α IN THE BLOOD IN PATIENTS WITH ERYSIPELAS, DEPENDING ON THE GENOTYPE OF THE GENE POLYMORPHISM OF TNF α (G308A), pкг/ml (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контрольная группа Control group n = 94		Первичная рожа Primary erysipelas n = 54		Рецидивирующая рожа Recurrent erysipelas n = 50	
	1		2		3	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
G/G	0,64	0,48-0,94	23,4	21,3-25,5	27,2	24,9-29,9
			p ₁ = 0,002		p ₁ = 0,004	
G/A	0,52	0,34-0,82	26,7	24,2-27,6	28,4	25,5-31,4
			p ₁ = 0,005 p ₂ = 0,008		p ₁ = 0,003 p ₂ = 0,006	
A/A	0	0	0	0	0	0

Примечание. Критерий Краскела–Уоллиса; p₁ – статистическая значимость различий с контролем; p₂ – статистическая значимость различий по сравнению с гомозиготами G/G.

Note. Kraskel-Wallis criterion; p₁ – significant differences with control group; p₂ – significant differences with carriers of homozygotes G/G.

за опухолей оказывает стимулирующее действие на нейтрофилы и эндотелиальные клетки. Это, в свою очередь, влияет на миграцию лейкоцитов и пролиферацию фибробластов и эндотелия при заживлении раны.

Уровень продукции TNF α значительно возрастает при поступлении бактериальных эндотоксинов в организм человека. Ряд авторов в своих исследованиях, с использованием нейтрализующих действие фактора некроза антителами, подтвердили центральную роль цитокина в возникновении токсического шока и сепсиса [11, 13, 14].

Биологические эффекты TNF α зависят от его концентрации. Данный цитокин может выступать в роли медиатора защитной реакции в ответ на различные инфекционные агенты, а также в качестве белка, обладающего пагубным влиянием на организм [9, 11, 13, 14].

По мнению ряда авторов, продукция цитокинов под влиянием стрептококкового токсина коррелирует с тяжестью течения заболевания [2, 7]. Ранее нашими работами было установлено, что концентрация IL1B при наличии аллели С полиморфизма rs1143623 гена IL1B значимо

уменьшается независимо от клинического течения заболевания. Особенно это наблюдается у носителей гомозиготного варианта С/С.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что уровень TNF α при наличии аллели G полиморфизма rs1800629 гена TNF α заметно уменьшается, независимо от кратности возникновения патологического процесса.

При этом отсутствие точечной замены в участке rs1800629 гена TNF α оказывает влияние на концентрацию одноименного цитокина, вызывая у носителей немутантного варианта G/G снижение концентрации молекулы, что, в свою очередь, может не обеспечивать достаточную реализацию саногенных механизмов защиты.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что аллель G и генотип G/G промотора гена TNF α rs1800629 предрасполагают к развитию рожи. Носительство аллели A и генотип G/A промотора гена фактора некроза опухолей- α rs1800629 снижают вероятность развития рожи. Присутствие G-аллели сопровождается уменьшением продукции TNF α у больных рожей при гетерозиготном G/G варианте носительства полиморфизма гена TNF α rs1800629.

Список литературы / References

1. Бекенова Н.Б., Гржибовский А.М., Муковозова Л.А., Смаил Е.М., Токаева А.З. Полиморфизм rs8193036 гена IL-17A в казахской популяции и его связь с продукцией IL-17A у больных рожей // Экология человека, 2016. № 4. С. 50-55. [Bekenova N.B., Grzybowski, A.M., Mukovozova L.A., Smail E.M., Tokayeva A.Z. Rs8193036 polymorphism of IL-17A gene in a kazakh population and its association with plasma IL-17A among erysipelas patients. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2016, no. 4, pp. 50-55. (In Russ.)]
2. Громова А.Ю., Симбирцев А.С. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека // Цитокины и воспаление, 2005. Т. 4, № 2. С. 5-7. [Gromova A.Yu., Simbirtsev A.S. Gene polymorphisms of interleukin 1 family cytokines. *Tsitokiny i vospaleniye = Cytokines and Inflammation*, 2005, Vol. 4, no. 2, pp. 5-7. (In Russ.)]
3. Емельянов А.С., Емельянова А.Н., Пушкарев Б.С., Витковский Ю.А. Полиморфизм промотора гена IL1B (G1473C) и его влияние на содержание интерлейкина 1 в крови больных рожей // Медицинская гене-

тика, 2017. Т. 16, № 8. С. 32-35. [Emelyanov A.S., Emelyanova A.N., Pushkarev, B.S., Vitkovsky Yu.A. Promoter gene IL1B (G1473C) polymorphism and its influence on interleukin 1B concentration in blood of patients with erysipelas. *Meditsinskaya genetika = Medical Genetics*, 2017, Vol. 16, no. 8, pp. 32-35. (In Russ.)]

4. Емельянова А.Н., Витковский Ю.А. Рожа (патогенез, особенности течения). Томск: Иван Федоров, 2014. 132 с. [Emelyanova A.N., Vitkovsky Yu.A. Erysipelas (pathogenesis, features of course)]. Tomsk: Ivan Fedorov, 2014. 132 p.

5. Емельянова А.Н., Емельянов А.С., Витковский Ю.А. Генетический полиморфизм промотора гена IL-2 (T330G) и его влияние на содержание интерлейкина 2 в крови больных рожей // Забайкальский медицинский вестник, 2014. № 2. С. 98-103. [Emelyanova A.N., Emelyanov A.S., Vitkovsky Yu.A. The genetic polymorphism of promoter gene IL-2 (T330G) and its influence on the maintenance of interleukin 2 in blood of patients with the erysipelas. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik = Transbaikalian Medical Bulletin*, 2014, no. 2, pp. 98-103. (In Russ.)]

6. Наследникова И.О., Уразова О.И., Воронкова О.В. Иммунопатогенез бактериальных и вирусных инфекций: роль полиморфизма генов цитокинов // Аллергология и иммунология, 2008. № 3. С. 294. [Naslednikova I.O., Urazova O.I., Voronkova O.V. Immunopathogenesis of bacterial and viral infections: role of cytokine gene polymorphism. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2008, Vol. 9, no. 3, p. 294. (In Russ.)]

7. Петров А.А., Страмбовская Н.Н., Говорин А.В., Витковский Ю.А. Генетический полиморфизм CD14, TNF α и FCGR2A у больных гриппом А H1N1 в Забайкальском крае // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 1. С. 83-86. [Petrov A.A., Strambovskaya N.N., Govorin A.V., Vitkovsky Yu.A. Genetic polymorphisms of CD14, TNF α and FCGR2A in the patients with influenza A H1N1 in Transbaikalian region. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, Vol. 13, no. 1, pp. 83-86. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2011-1-83-86.

8. Пшеничная Н.Ю., Московская Т.В., Шишканова Л.В., Пасечник Д.Г. Диагностическое и прогностическое значение ключевых провоспалительных адипокинов у больных рожей нижних конечностей // Современные проблемы науки и образования, 2015. № 3. С. 31. [Pshenichnaya N.Yu., Moskovaya T.V., Shishkanova L.V., Pasechnik D.G. Diagnostic and prognostic value of proinflammatory adipokines in patients with erysipelas of the lower extremities. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2015, no. 3, p. 31. (In Russ.)]

9. Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций // Цитокины и воспаление, 2002. № 1. С. 9-16. [Simbirtsev A.S. Cytokines as a new system, regulating body defense reactions. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2002, no. 1, pp. 9-16. (In Russ.)]

10. Черкасов В.Л. Рожа. Л.: Медицина, 1986. 200 с. [Cherkasov V.L. Erysipelas]. Leningrad: Medicine, 1986. 200 p.

11. Ashkenazi A., Marsters S.A., Capon D.J., Chamow S.M., Figari I.S., Pennica D., Goeddel D.V., Palladino M.A., Smith D.H. Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor immunoadhesin. *Procl. Natl. Acad. Sci.*, 1991, no. 88, pp. 10535-10539.

12. Vitkovsky Yu. Interleukins modulate fibrinolytic properties of lymphocytes. *Fibrinolysis and Proteolysis*, 2000, Vol. 14, Suppl. 1, p. 68.

13. Beutler B., Grau G. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit. Care Med.*, 1993, Vol. 21, pp. 423-435.

14. Stuber F., Petersen M., Bokelmann F., Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.*, 1996, Vol. 24. pp. 381-384.

Авторы:

Емельянов А.С. – младший научный сотрудник кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

Емельянова А.Н. – д.м.н., доцент, заведующая кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

Пушкарёв Б.С. – ассистент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

Витковский Ю.А. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

Authors:

Emelyanov A.S., Junior Research Associate, Department of Normal Physiology, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Emelyanova A.N., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Pushkarev B.S., Assistant, Department of Normal Physiology, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Vitkovsky Yu.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Normal Physiology, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Поступила 13.02.2018
Принята к печати 15.02.2018

Received 13.02.2018
Accepted 15.02.2018

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 α (rs1800587 5' UTR ОБЛАСТИ ГЕНА) С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Лапштаева А.В., Сычев И.В., Гончарова Л.Н.

*ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика
Мордовия, Россия*

Резюме. Ввиду достаточно низкой эффективности и высокой стоимости протоколов экстракорпорального оплодотворения существует необходимость в разработке новых диагностических критериев отбора пациенток. Цель работы состояла в комплексном изучении ассоциации полиморфизма гена IL-1 α в rs1800587 5'UTR области и основных диагностических критериев репродуктивного потенциала с эффективностью экстракорпорального оплодотворения у женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия. Нами было обследовано 120 женщин с трубно-перитонеальным бесплодием, которым был проведен короткий протокол стимуляции суперовуляции, завершившийся переносом эмбрионов. Концентрацию IL-1 α в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью тест-систем фирмы ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия). Полиморфный маркер rs1800587 в 5' UTR области гена IL-1 α исследовали методом ПЦР с последующим секвенированием. Различий в распределении полиморфных вариантов гена IL-1 α у женщин с наступившей беременностью выявлено не было. Генотип Т/Т выступает как условно прогностически благоприятный для наступления беременности в результате проведенного экстракорпорального оплодотворения. У женщин с наступившей беременностью в ходе проведенного экстракорпорального оплодотворения выявлено увеличение содержания IL-1 α в сыворотке по сравнению с женщинами с ненаступившей беременностью. У женщин с генотипом Т/Т выявлены более высокие сывороточные уровни IL-1 α по сравнению с другими генотипами. У женщин с генотипом Т/Т в группе с наступившей беременностью при проведении трансвагинальной пункции получено больше ооцитов, чем у женщин с генотипом С/С. Не выявлено достоверных различий по содержанию 17-оксипрогестерона, эстрадиола, фолликулостимулирующего гормона, тестостерона в зависимости от генотипов IL-1 α внутри групп. На основании проведенного исследования стал более очевидным факт участия IL-1 α в процессе имплантации плодного яйца. Требуется дальнейшие исследования, проясняющие механизмы влияния IL-1 α на фолликулогенез, овуляцию, имплантацию, децидуализацию и формирование плаценты.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, IL-1 α , трубно-перитонеальное бесплодие, экстракорпоральное оплодотворение

Адрес для переписки:

*Лапштаева Анна Васильевна
ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет
имени Н.П. Огарева»
430005, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск,
ул. Большевикская, 68.
Тел.: 8 (927) 177-35-55.
E-mail: av_lapshtaeva@mail.ru*

Address for correspondence:

*Lapshtaeva Anna V.
National Research N.P. Ogarev Mordovia State University
430005, Russian Federation, Republic of Mordovia, Saransk,
Bolshevistskaya str., 68.
Phone: 7 (927) 177-35-55.
E-mail: av_lapshtaeva@mail.ru*

Образец цитирования:

А.В. Лапштаева, И.В. Сычев, Л.Н. Гончарова «Ассоциация полиморфизма гена интерлейкина-1 (rs1800587 5'UTR области гена) с эффективностью экстракорпорального оплодотворения» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 417-424. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-417-424

© Лапштаева А.В. и соавт., 2018

For citation:

A.V. Lapshtaeva, I.V. Sychev, L.N. Goncharova "Association of interleukin-1 gene polymorphism (encoded region rs1800587 5'UTR) with efficiency of in vitro fertilization", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 417-424. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-417-424

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-417-424

ASSOCIATION OF INTERLEUKIN-1 α GENE POLYMORPHISM (ENCODED REGION rs1800587 5' UTR) WITH EFFICIENCY OF *IN VITRO* FERTILIZATION

Lapshataeva A.V., Sychev I.V., Goncharova L.N.

National Research N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Abstract. Due to quite low efficiency and high costs of *in vitro* fertilization protocols, there is a necessity for development of new diagnostic criteria for selection of patients. The purpose of this study was complex analysis of association of polymorphic variants of IL-1 α gene (rs1800587 5' UTR region) and main diagnostic criteria of women with tubo-peritoneal infertility and success rate of *in vitro* fertilization procedure. We have examined 120 women with tubo-peritoneal infertility who were subjected to the microflare protocol of controlled ovarian hyperstimulation which was followed by embryo transfer. Concentration of IL-1 α in blood serum was defined by ELISA method by means of test systems of the "Cytokine LLC" (St. Petersburg, Russian Federation). Polymorphic marker rs1800587 at 5' UTR region was analysed with PCR method followed by the sequencing. We have detected no particular features in distribution of polymorphic IL-1 α gene variants in pregnant women. The T/T genotype seems to be a conditionally favorable predictor for pregnancy resulting from *in vitro* fertilization. It has been shown that the IL-1 α content in blood serum of pregnant women was increased as compared to women who did not become pregnant. It was also shown that pregnant women with T/T genotype had higher serum IL-1 α levels than women with other genotypes. During transvaginal puncture, we have detected that pregnant women with T/T genotype had more oocytes than women with C/C genotype. We have not found significant differences in 17-oxypregesterone, estradiol, follicle-stimulating hormone, testosterone contents for groups of women with different IL-1 α genotypes. As based on this study, the IL-1 α involvement in the implantation become more evident. Further studies are required concerning influence of IL-1 α on folliculogenesis, ovulation, implantation, decidualization and placenta formation.

Keywords: gene polymorphism, IL-1 α , tubo-peritoneal infertility, *in vitro* fertilization

Введение

Бесплодный брак существенно влияет на демографические показатели, являясь как медико-биологической, так и социальной проблемой. Особую актуальность приобретает проблема бесплодия в связи с низким естественным приростом населения.

По сведениям различных авторов, ведущей причиной женского бесплодия в 40-50% случаев является трубно-перитонеальный фактор [2, 4, 5, 6]. Хронические воспалительные заболевания женских половых органов приводят к анатомическим изменениям, к расстройству кровообращения в очаге поражения, а также и к вторичным нарушениям в эндокринной, иммунной и нервной системах. Благодаря революционному развитию вспомогательных репродуктивных технологий появился инновационный способ преодоления бесплодия – экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), подаривший большие надежды супружеским парам.

Однако частота наступления беременности в результате данной процедуры даже в настоящее время остается низкой. Так, в 2014 г. в России в ре-

зультате проведенных циклов ЭКО лишь в 31,5% случаев наступила беременность [3]. В последние годы появляется все больше сведений, что в регуляции репродуктивного процесса – фолликулогенезе, овуляции, имплантации, децидуализации и формировании плаценты – немаловажную роль играют компоненты иммунной системы [5, 7, 8]. Также цитокины и иммунокомпетентные клетки играют значительную роль при взаимодействии эмбриона и эндометрия в формировании иммунологической толерантности [8]. Имплантация эмбриона – важный процесс в наступлении беременности, процесс внедрения эмбриона в слизистую оболочку матки, проходящий с участием большого количества гуморальных и клеточных факторов. Успешность имплантации зависит как от качества эмбриона, так и от исходного состояния эндометрия. Связывание IL-1 α с рецепторами в эндометрии является необходимым шагом в имплантации, что доказано путем блокады рецепторов I типа IL-1 α на материнском эндометрии, предотвращавшей имплантацию зародыша у мыши [13].

Несмотря на значительное количество исследований в области иммунологии репродукции,

остается малоизученным вопрос о роли полиморфизма генов наиболее значимых цитокинов в наступлении беременности.

Одним из центральных медиаторов местных воспалительных реакций является провоспалительный цитокин IL-1α, выступающий в роли мощного внутриклеточного регулятора экспрессии генов [9]. Известно о существовании как минимум трех полиморфных участков гена IL-1α. Наименее изучен в настоящее время полиморфизм в rs1800587 5'нетранслируемой области гена.

Поэтому вызывает интерес влияние полиморфизма гена IL-1α и концентрация в сыворотке IL-1α на процесс наступления беременности у женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия.

Таким образом, изучение механизмов иммуномодуляции и иммуногенетики при индуцированной беременности у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием, возможно, откроет новые перспективы для повышения эффективности циклов вспомогательных репродуктивных технологий, таких как ЭКО, и позволит проводить персонализированный подход для включения женщин в данную процедуру.

Цель исследования – изучить ассоциацию полиморфизма гена IL-1α (rs1800587 5'UTR области гена) и основные диагностические критерии репродуктивного потенциала с эффективностью экстракорпорального оплодотворения у женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия.

Материалы и методы

Было обследовано 120 женщин, проходящих процедуру ЭКО на базе ГБУЗ РМ «Мордовский республиканский клинический перинатальный центр» по поводу трубно-перитонеального бесплодия (ТПБ).

Диагноз «ТПБ» устанавливался на основании данных анамнеза, объективного осмотра, ультразвукового исследования (УЗИ) органов малого таза, диагностической лапароскопии, лабораторного исследования и спермограммы мужа/партнера (для исключения мужского фактора). Всем пациенткам был проведен короткий протокол стимуляции суперовуляции, завершившийся переносом эмбрионов. Первичным результатом считали наступление беременности по результатам УЗИ, проведенного через 14 дней после получения положительного результата β-хорионического гонадотропина человека (ХГЧ).

По результатам обследования все женщины были разделены на две группы – основную (n = 40) и группу сравнения (n = 80). В основную группу были включены женщины с наступив-

шей беременностью после проведенной программы ЭКО. Средний возраст составил 33,4±3,8 года, длительность бесплодия – 5,6±3,3 года. 47,5% женщин имели в прошлом беременности (внутриматочные беременности – 25%, искусственные аборт – 17,5%, самопроизвольные аборт – 5%, роды – 20%). В группу сравнения были включены женщины с ненаступившей беременностью после проведенной программы ЭКО. Средний возраст составил 32,6±4,3 года, длительность бесплодия – 5,1±3,6 года. 40% женщин имели в прошлом беременности (внутриматочные беременности – 25%, искусственные аборт – 18,75%, самопроизвольные аборт – 17,5%, роды – 15%). Данные группы были сопоставимы по возрасту и данным акушерско-гинекологического анамнеза (p > 0,05).

Всем обследуемым женщинам было проведено молекулярно-генетическое исследование, материалом для которого служили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови на автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот и белков QIAcube с использованием набора реагентов QIAamp DNA MiniKit (оборудование и реактивы производства QIAGEN, Германия). Забор крови проводили на 3-4 день менструального цикла. Полиморфный маркер rs1800587 в 5'UTR области гена IL-1α исследовали методом ПЦР с последующим секвенированием на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 с использованием наборов для циклического секвенса BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit и соответствующего программного обеспечения к прибору, согласно инструкции производителя (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей для исследуемых образцов выполняли с помощью программ Peak Trace, Sequence Scannerv.1.0, Chromas Lite 2.1.1, Vector NTI Advance 10. В качестве референтной использовали нуклеотидную последовательность NG_012303.1. Обозначения полиморфной позиции, установленной для исследованных образцов, приведены согласно Базе данных NCBI dbSNP. Молекулярно-генетические исследования проведены на базе лаборатории постгеномных молекулярно-генетических исследований ФГБУН «ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН» (Москва, Россия). Также определяли концентрацию IL-1α в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с помощью тест-систем фирмы ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия).

Гормональное исследование проводилось радиоиммунным и иммуноферментными методами с использованием стандартных наборов. Содержание в крови фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), эстрадиола, тестостерона, 17-ок-

сипрогестерона (17-ОПГ) определяли на 2-3 день менструального цикла. Ультразвуковое исследование проводилось перед началом стимуляции суперовуляции, в ходе ультразвукового мониторинга в цикле ЭКО и для диагностики предполагаемой беременности.

Право на проведение обследования подтверждалось юридически подписанием пациенткой добровольного информированного согласия. На проведение работы было получено разрешение локального этического комитета МГУ им. Н.П. Огарева.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета прикладных программ StatSoft Statistica 10.0. Технически корректными оказались данные 120 исследований. Для оценки нормальности распределения количественных данных применялись: графические (частотная гистограмма) и расчетные (критерий Колмогорова–Смирнова, Шапиро–Уилка) методы. Полученные данные не подчинялись нормальному закону распределения и представлены в виде медианы (Me) и квартилей ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Качественные значения отражены в виде абсолютных величин (n) и процентных долей. Для анализа количественных признаков использовалась описательная статисти-

стика с применением U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Для оценки ассоциаций генотипов с наступлением беременности использовался критерий χ^2 Пирсона и отношение шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (CI). Значимость выявленных различий и взаимосвязей во всех видах анализа была принята при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При сравнительной характеристике основной группы женщин и женщин из группы сравнения выявлено, что по содержанию эстрадиола, 17-ОПГ, ФСГ и тестостерона группы не имели достоверных отличий (табл. 1).

В то же время отмечается достоверно более высокий сывороточный уровень IL-1 α в группе женщин с наступившей беременностью по сравнению с группой женщин с ненаступившей беременностью (табл. 1). При сравнении количества ооцитов, полученных при трансвагинальной пункции, было выявлено, что у женщин с неэффективным ЭКО количество ооцитов было достоверно выше, чем у женщин из основной группы. Анализ показателей толщины эндометрия выявил, что у женщин данной группы от-

ТАБЛИЦА 1. ИЗУЧАЕМЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ЖЕНЩИН С ТРУБНО-ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ФОРМОЙ БЕСПЛОДИЯ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. STUDIED INDICATORS LABORATORY FINDINGS OF WOMEN WITH TUBO-PERITONEAL INFERTILITY, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Index	Основная группа Main group (n = 40)	Группа сравнения Comparison group (n = 80)	Достоверность различий Statistical significance
Сывороточный уровень IL-1 α , пг/мл Serum level of IL-1 α , pg/ml	26,6 (3,9; 40,2)	17,4 (4,2; 18,0)	$p = 0,038$
Количество ооцитов, полученных при пункции, n Oocytes obtained by TVP, n	8,6 (5,0; 10,0)	12,2 (5,0; 18,0)	$p = 0,036$
Толщина эндометрия до стимуляции, мм Thickness of endometrium before stimulation, mm	3,7 (2,2; 5,0)	4,6 (3,0; 5,1)	$p = 0,048$
Толщина эндометрия после стимуляции, мм Thickness of the endometrium after stimulation, mm	15,6 (14,9; 17,1)	8,9 (3,3; 9,5)	$p = 0,021$
Эстрадиол, пг/мл Estradiol, pg/ml	40,5 (26,0; 54,4)	43,3 (22,9; 56,2)	$p = 0,556$
17-ОПГ, нмоль/л 17-OPG, nmol/l	2,0 (0,8; 2,5)	2,8 (1,4; 3,8)	$p = 0,685$
ФСГ, мМЕ/мл FSH, mME/ml	8,8 (7,4; 9,8)	8,1 (7,1; 9,0)	$p = 0,170$
Тестостерон, нмоль/л Testosterone, nmol/l	1,9 (0,52; 3,0)	1,8 (1,0; 2,2)	$p = 0,684$

мечается более выраженная толщина эндометрия по сравнению с женщинами с успешным ЭКО (табл. 1). Однако следует отметить, что у женщин с наступившей беременностью эндометрий лучше отвечал на стимуляцию и составил 16,6 (15,4-17,1) мм в сравнении с группой сравнения – 8,9 (8,3-9,5) мм ($p = 0,0025$). По данным последних исследований, при толщине эндометрия выше 15 мм прогнозируется наиболее благоприятный исход наступления и вынашивания беременности при процедуре ЭКО [11].

Учитывая немногочисленные данные по изучению полиморфизма гена IL-1α у женщин с ТПБ, был проведен анализ распределения генотипов данного гена у обследуемых женщин.

При генотипировании однонуклеотидного полиморфизма rs1800587 в 5'UTR области гена IL-1α в группе женщин с эффективным ЭКО было установлено, что, несмотря на более высокий процент носительства генотипа Т/Т – 45%, не было выявлено достоверных отличий по носительству монозиготных и гетерозиготных вариантов ($p > 0,05$) (табл. 2). У женщин с неэффективным ЭКО выявлено, что количество женщин с носительством генотипа Т/Т (оцениваемый как «благоприятный» по отношению к наступлению беременности) достоверно встречалось реже по сравнению с женщинами, носителями генотипов С/Т и С/С (табл. 2).

При сравнительном анализе носительства генотипов гена IL-1α у женщин с эффективным и неэффективным ЭКО выявлено, что у женщин с наступившей беременностью генотип Т/Т встречался достоверно чаще по сравнению с женщинами с ненаступившей беременностью (табл. 2). В группе женщин с наступившей беременностью генотип Т/Т имеет OR = 4,8 с 95% ДИ = [1,7-13,3] $p = 0,0016$, что определяет данный генотип как условно прогностический бла-

гоприятный фактор для наступления беременности (табл. 2).

С учетом имеющихся данных [1] о связи генотипа Т/Т гена IL-1α с повышенным уровнем продукции IL-1α, был проведен анализ оценки сывороточного уровня IL-1α у женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия.

У женщин с наступившей беременностью на фоне процедуры ЭКО с генотипом Т/Т уровень IL-1α в периферической крови был достоверно выше, чем у пациенток с генотипами С/С и С/Т. А у женщин с носительством генотипа С/С в данной группе уровень IL-1α в периферической крови был достоверно ниже, чем у женщин с носительством генотипа С/Т и Т/Т (табл. 3). Аналогичные данные получены и у женщин с ненаступившей беременностью, что подтверждает данные авторов об ассоциации генотипа Т/Т с повышенным уровнем продукции IL-1α [1].

Важную роль в наступлении беременности при проведении вспомогательных репродуктивных технологий играет количество ооцитов, полученных при помощи трансвагинальной пункции. Есть свидетельства того, что IL-1α играет важную роль в физиологии яичников [10]. При анализе количества ооцитов в зависимости от генотипов IL-1α внутри группы женщин с наступившей беременностью выявлено, что у женщин с генотипом Т/Т получено достоверно больше ооцитов, чем у женщин с генотипом С/С (табл. 3). Данное обстоятельство может быть связано с влиянием IL-1α на синтез проапоптотических белков Вах и PARP в зернистых клетках и ооцитах [12].

При изучении толщины эндометрия (2 д.м.ц.) в зависимости от распределения носительства генотипов гена IL-1α не выявлено достоверных отличий у женщин обеих групп (табл. 3).

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА ГЕНА IL-1α У ОБСЛЕДУЕМЫХ ЖЕНЩИН

TABLE 2. DISTRIBUTION OF FREQUENCIES OF IL-1α GENE POLYMORPHIC MARKER IN WOMEN PARTICIPATING AT THE STUDY

Генотип Genotype	Основная группа Main group (n = 40)		Группа сравнения Comparison group (n = 80)		χ^2/p	OR (95% CI)
	%	Достоверность различий Statistical significance	%	Достоверность различий Statistical significance		
Т/Т, (1)	45	$p_{1-2} = 0,0608$ $p_{2-3} = 0,6166$ $p_{1-3} = 0,1659$	15	$p_{1-2} = 0,0004$ $p_{2-3} = 0,5225$ $p_{1-3} = 0,0001$	12,814/0,0016	4,8 (1,733-13,294)
С/Т, (2)	25		40		9,645/0,0019	0,208 (0,075-0,577)
С/С, (3)	30		45		9,555/0,0019	0,222 (0,083-0,592)

ТАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗУЧАЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ОБСЛЕДУЕМЫХ ЖЕНЩИН В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ ГЕНА IL-1 α

TABLE 3. COMPARATIVE ANALYSIS OF STUDIED INDICATORS OF BLOOD FROM WOMEN DEPENDENT OF ALLELIC FREQUENCIES OF IL-1 α GENE

Показатель Index	Обследованные лица Subjects under study						Достоверность различий, p Statistical significance, p
	Основная группа Main group (n = 40)			Группа сравнения Comparison group (n = 80)			
Генотип IL-1 α Genotype IL-1 α	T/T (1)	C/T (2)	C/C (3)	T/T (4)	C/T (5)	C/C (6)	
Сывороточный уровень IL-1 α , пг/мл Serum level of IL-1 α , pg/ml	47,6 (31-62,2)	14,4 (2,8-25)	5,2 (2-8)	59,7 (36-82,7)	14,8 (7,8-18)	5,7 (2,8-8)	p ₁₋₄ = 0,1326, p ₂₋₅ = 0,8593, p ₃₋₆ = 0,5673
	p ₁₋₂ = 0,0001, p ₁₋₃ = 0,0001, p ₂₋₃ = 0,0113			p ₄₋₅ = 0,0001, p ₅₋₆ = 0,0001, p ₄₋₆ = 0,0001			
Количество ооцитов при пункции, n Number of oocytes by TVP, n	9,9 (8-13)	10,1 (5,5-13)	5,2 (3-6)	8,5 (6-11)	13,8 (6,8-18)	11,1 (5-12)	p ₁₋₄ = 0,6734, p ₂₋₅ = 0,2323,
	p ₁₋₂ = 0,9343, p ₁₋₃ = 0,0031, p ₂₋₃ = 0,0508			p ₄₋₅ = 0,3595, p ₅₋₆ = 0,3242, p ₄₋₆ = 0,7061			p ₃₋₆ = 0,0361
Толщина эндометрия, мм Thickness of the endometrium, mm	3,6 (2,5-4)	4,2 (3,2-5,0)	3,7 (2,0-5,0)	4,5 (3,0-5,15)	4,1 (3,0-5,0)	4,8 (3,0-6,0)	p ₁₋₄ = 0,1524, p ₂₋₅ = 0,6579,
	p ₁₋₂ = 0,3216, p ₁₋₃ = 0,7672, p ₂₋₃ = 0,5829			p ₄₋₅ = 0,5757, p ₅₋₆ = 0,2627, p ₄₋₆ = 0,7454			p ₃₋₆ = 0,2967
17-ОПГ, нмоль/л 17-OPG, nmol/l	1,9 (1,5-2,3)	1,9 (0,8-4,0)	2,2 (0,7-5,0)	3,1 (2,4-3,8)	3,0 (1,4-4,6)	2,6 (1,8-3,3)	p ₁₋₄ = 0,0981, p ₂₋₅ = 0,1932,
	p ₁₋₂ = 0,9361, p ₁₋₃ = 0,8254, p ₂₋₃ = 0,8427			p ₄₋₅ = 0,9037, p ₅₋₆ = 0,5079, p ₄₋₆ = 0,5979			p ₃₋₆ = 0,1736
Эстрадиол, пг/мл Estradiol, pg/ml	43,2 (26-55)	37,0 (24-54,4)	39,3 (32-46,2)	40,3 (19,4-52)	37,5 (19-53,9)	48,1 (32,6-61)	p ₁₋₄ = 0,3733, p ₂₋₅ = 0,8521,
	p ₁₋₂ = 0,5231, p ₁₋₃ = 0,6142, p ₂₋₃ = 0,7899			p ₄₋₅ = 0,8082, p ₅₋₆ = 0,4286, p ₄₋₆ = 0,1339			p ₃₋₆ = 0,2134
ФСГ, мМЕ/мл FSH, mME/ml	8,7 (6,6-8,9)	8,3 (7,4-11,5)	9,5 (7,7-9,8)	43,2 (26-55)	43,2 (26-55)	43,2 (26-55)	p ₁₋₄ = 0,1524, p ₂₋₅ = 0,6421,
	p ₁₋₂ = 0,8078, p ₁₋₃ = 0,5247, p ₂₋₃ = 0,4204			p ₄₋₅ = 0,3738, p ₅₋₆ = 0,0546, p ₄₋₆ = 0,3075			p ₃₋₆ = 0,0189
Тестостерон, нмоль/мл Testosterone, nmol/l	1,8 (0,9-3,1)	1,9 (0,2-3,5)	2,2 (1,3-3,0)	2,1 (1,6-2,4)	1,9 (0,9-2,6)	1,6 (0,9-2,1)	p ₁₋₄ = 0,4404, p ₂₋₅ = 0,5612,
	p ₁₋₂ = 0,9602, p ₁₋₃ = 0,5921, p ₂₋₃ = 0,8131			p ₄₋₅ = 0,7438, p ₅₋₆ = 0,2473, p ₄₋₆ = 0,3514			p ₃₋₆ = 0,3157

Для наступления беременности также необходима достаточная рецептивность эндометрия, определяющая успешную имплантацию бластоцисты, которая зависит от циклических изменений гормонов, локальных аутокринных и паракринных факторов.

Синтезируемые иммунокомпетентными клетками, ростовые факторы и цитокины вовлечены

в рост и развитие фолликула, стимулируют пролиферацию и ингибируют апоптоз клеток granulosa, принимают участие в продукции стероидных гормонов яичника. Согласно данным Das и соавт., эстрогены и прогестерон являются негативными регуляторами продукции IL-1 α и IL-6. Благоприятный исход беременности коррелирует с присутствием на иммунокомпетентных клетках

рецепторов прогестерона, в то время как IL-1 α повышает количество рецепторов к стероидам, что показали исследования Szekeres-Bartho J. и соавт.

При анализе гормонального статуса у женщин с трубно-перитонеальной формой бесплодия было выявлено, что содержание в крови эстрогена, ФСГ, тестостерона, 17-ОПГ достоверно не различалось в группах в зависимости от распределения полиморфных вариантов гена IL-1 α (табл. 3).

Заключение

Таким образом, в данной работе представлены результаты по распределению полиморфизма гена IL-1 α у женщин с ТПБ с учетом эффективности процедуры ЭКО. Наибольшее количество женщин с ТПБ с благоприятным исходом процедуры ЭКО являлись носителями генотипа Т/Т, в то время как у женщин с ненаступившей беременностью данный генотип встречался до-

стоверно реже. Носительство генотипа Т/Т может выступать как условно прогностический благоприятный фактор для наступления беременности при процедуре ЭКО. Также выявлено, что у женщин с носительством генотипа Т/Т сывороточный уровень IL-1 α был выше у женщин с неблагоприятным исходом ЭКО по сравнению с женщинами-носителями генотипа Т/Т с положительным ответом на ЭКО, но данные различия не достигают критерия достоверности.

Полученные данные обосновывают актуальность дальнейшего изучения генетических особенностей IL-1 α у женщин с бесплодием, участвующих в программе ЭКО.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Новиковой Л.В. и Радаевой О.А. за оказанную помощь при проведении данного исследования.

Список литературы / References

1. Громова А.Ю., Симбирцев А.С. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека // Цитокины и воспаление, 2005. Т. 4, № 2. С. 5-7. [Gromova A.Yu., Simbirtsev A.S. Gene polymorphisms of interleukin-1 family cytokines. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2005, Vol. 4, no. 2, pp. 5-7. (In Russ.)]
2. Комиссарова Ю.В., Кузьмичев Л.Н. Трубно-перитонеальное бесплодие: клиническое значение определения сосудисто-эндотелиального фактора роста в прогнозировании синдрома гиперстимуляции яичников // Акушерство и гинекология, 2010. № 4. С. 50-54. [Komissarova Yu.V., Kuzmichev L.N. Tuboperitoneal infertility: clinical value of determination of vascular endothelial growth factor in the prediction of ovarian hyperstimulation syndrome. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2010, no. 4, pp. 50-54. (In Russ.)]
3. Корсак В. С., Смирнова А. А., Шурыгина О. В. Регистр центров ВРТ в России. Отчет за 2014 год // Проблемы репродукции, 2016. Т. 22, № 5. С. 10-21. [Korsak V.S., Smirnova A.A., Shurygina O.V. Russian VRT register, 2014. *Problemy reprodukcii = Russian Journal of Human Reproduction*, 2016, Vol. 22, no. 5, pp. 10-21. (In Russ.)]
4. Кулаков В.И., Леонов Б.В., Кузьмичев Л.Н. Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии. М.: МИА, 2005. 592 с. [Kulakov V.I., Leonov B.V., Kuzmichev L.N. Treatment of female and male infertility. Auxiliary reproductive technologies]. Moscow: MIA, 2005. 592 p.
5. Мотовилова Н.О., Коган И.Ю., Сысоев К.А., Буйнова А.Н., Грязнов А.Ю., Тотолян А.А. Роль некоторых цитокинов в эффективности лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 373-382. [Motovilova N.O., Kogan I.Yu., Syssoev K.A., Buianova A.N., Griaznov A.Yu., Totolian A.A. Impact of some cytokines to efficiency of infertility treatment by means of *in vitro* fertilization. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 373-382. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-373-3826.
6. Назаренко Т.А. Стимуляция функции яичников. М.: МЕДпресс-информ, 2015. 288 с. [Nazarenko T.A. Stimulation of ovarian function]. Moscow: MEDpress-inform, 2015. 288 p.
7. Сеидова Л.А., Яворовская К.А. Основы регуляции имплантации (молекулярно-биологические аспекты) // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии, 2010. Т. 9, № 3. С. 79-83. [Seidova L.A., Yavorovskaya K.A. Molecular-biological foundations of implantation control. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii = Questions of Gynecology, Obstetrics and Perinatology*, 2010, Vol. 9, no. 3, pp. 79-83. (In Russ.)]
8. Сельков С.А., Соколов Д. И. Иммунологические механизмы контроля развития плаценты // Журнал акушерства и женских болезней, 2010. Т. LIX, № 1. С. 6-10. [Sokolov D.I., Selkov S.A. Immunologic control of placenta development. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women Diseases*, 2010, Vol. LIX, no. 1, pp. 6-10. (In Russ.)]
9. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление, 2004. № 3. С. 16-22. [Simbirtsev A.S. Cytokines – classification and biologic functions. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2004, Vol. 3, no. 2, pp. 16-22. (In Russ.)]
10. Gérard N., Caillaud M., Martoriati A., Goudet G., Lalmanach A.-C. The interleukin-1 system and female reproduction. *Journal of Endocrinology*, 2004, Vol. 180, no. 2, pp. 203-212.

11. Ma N.-Z., Chen L., Dai W., Bu Z.-Q., Hu L.-L., Sun Y.-P. Influence of endometrial thickness on treatment outcomes following *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2017, Vol. 15, p. 5.
12. Uri-Belapolsky S., Shaish A., Eliyahu E., Grossman H., Levi M., Chuderland D., Kamari Y. Interleukin-1 deficiency prolongs ovarian lifespan in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, Vol. 111, no. 34, pp. 12492-12497.
13. Simon C., Frances A. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology*, 1994, Vol. 134, no. 2, pp. 521-528.

Авторы:

Лапштаева А.В. – ассистент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Сычев И.В. – студент Медицинского института ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Гончарова Л.Н. – д.м.н., доцент, профессор кафедры факультетской терапии с курсами физиотерапии, лечебной физкультуры ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Authors:

Lapshtaeva A.V., Assistant Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology, National Research N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Sychev I.V., Student, Medical Institute, National Research N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Goncharova L.N., PhD, MD (Medicine), Assistant Professor, Professor, Department of Faculty Therapy with a Course of Physiotherapy, National Research N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

Поступила 06.07.2017
Принята к печати 22.09.2017

Received 06.07.2017
Accepted 22.09.2017

АССОЦИАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА TLR2, TLR4, TLR9 С ТЕЧЕНИЕМ ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IN VIVO

Буданова Е.В.¹, Свитич О.А.^{1,2}, Шуленина Е.А.^{1,2}, Зверев В.В.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

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

Резюме. Целью данной работы являлось изучение особенности экспрессии генов TLR2, TLR4, TLR9 в течении острой респираторной инфекции в зависимости от времени, прошедшего с момента инфицирования, и дозы заражения. Результаты исследований острой респираторной инфекции, вызванной грамотрицательной бактерией *Klebsiella pneumoniae*, на модели *in vivo* показали, что при дозе заражения 10⁴ КОЕ/мл уровень экспрессии гена TLR4 в эпителии верхних дыхательных путей на 1-е, 3-и, 10-е сутки возрастал в 30 и более раз, при этом полная элиминация возбудителя наблюдалась уже на 3-и сутки. При дозе заражения 10⁷ КОЕ/мл отмечалась персистенция возбудителя в верхних дыхательных путях в течение нескольких суток, что сопровождалось достоверным повышением уровня экспрессии гена TLR9 в эпителии верхних дыхательных путей и уровня TLR4 в легких на 1-е сутки после заражения одновременно с элиминацией возбудителя из нижних дыхательных путей. Таким образом, характерные особенности экспрессии генов TLR4 и TLR9 в верхних дыхательных путях могут рассматриваться как потенциальные диагностические и прогностические факторы в оценке течения ОРИ, вызванной *Klebsiella pneumoniae*.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, TLR, пневмония, *Klebsiella pneumoniae*

ASSOCIATION OF TLR2, TLR4, TLR9 GENE EXPRESSION RELATED TO INNATE IMMUNITY WITH IN VIVO ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS CAUSED BY *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Budanova E.V.^a, Svitich O.A.^{a,b}, Shulenina E.A.^{a,b}, Zverev V.V.^{a,b}

^a Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)

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

Abstract. The aim of this work was to study features of gene expression TLR2, TLR4, and TLR9 in the course of acute respiratory infection, depending on the time elapsing since the contamination, and dose of

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Е.В. Буданова, О.А. Свитич, Е.А. Шуленина, В.В. Зверев
«Ассоциация экспрессии генов врожденного иммунитета TLR2, TLR4, TLR9 с течением острой респираторной инфекции, вызванной *Klebsiella pneumoniae* in vivo»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 425-430.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-425-430

© Буданова Е.В. и соавт., 2018

For citation:

E.V. Budanova, O.A. Svitich, E.A. Shulenina, V.V. Zverev
“Association of TLR2, TLR4, TLR9 gene expression related to innate immunity with in vivo acute respiratory infections caused by *Klebsiella pneumoniae*”, *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 425-430.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-425-430

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-425-430

infection. The studies of *in vivo* models of acute respiratory infections caused by Gram-negative *Klebsiella pneumoniae* showed that, at infection dose of 10^4 CFU/ml, the TLR4 gene expression levels in epithelium of upper respiratory tract at 1, 3, 10 days were increased 30 times and more, complete elimination of the pathogen was observed at 3 days. At the dose of infection of 10^7 CFU/ml, persistence of the pathogen in upper respiratory tract was observed within a few days, accompanied by a significant increase in the level of TLR9 expression in epithelium of upper respiratory tract, and TLR4 levels in the lungs 1 day after infection, in parallel to elimination of the pathogen from the lower respiratory tract. Thus, the characteristic features of TLR4 and TLR9 gene expression in the upper respiratory tract may be considered a potential diagnostic and prognostic factors in evaluation of the course of acute respiratory infections caused by *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: innate immunity, toll-like receptors (TLR), pneumonia, *Klebsiella pneumoniae*

Введение

В настоящее время острые респираторные инфекции (ОРИ) занимают одно из ведущих мест в структуре заболеваемости во всем мире. Основными трудностями для диагностики ОРИ на ранних стадиях являются наличие латентного периода в их развитии и неспецифические проявления этих заболеваний. Снизить частоту осложнений и повысить эффективность проводимой терапии может ранняя диагностика, основанная на выявлении характерных изменений в состоянии иммунной системы на молекулярном уровне, что позволит предпринять меры по профилактике и лечению респираторных инфекций еще до начала клинических проявлений [1].

Среди бактерий-возбудителей респираторных инфекций в условиях стационара *Klebsiella pneumoniae* является одной из наиболее распространенных. За последние десять лет в разных странах, в том числе в России, были установлены случаи массового заражения штаммами *K. pneumoniae*, обладающими множественной антибиотикорезистентностью [2, 7, 10].

Известно, что реснитчатый эпителий, выстилающий дыхательные пути, служит барьером на пути проникновения различных микроорганизмов, включая *K. pneumoniae*, в организм. Благодаря наличию большого числа рецепторов, способных узнавать патогенные микроорганизмы и запускать иммунные реакции, эпителиальные клетки выполняют функцию иммунной защиты. В частности, Toll-подобные рецепторы (TLRs), которые являются одним из ключевых факторов врожденного иммунитета, широко представлены на эпителиальных клетках верхних и нижних дыхательных путей. Их роль в защите организма от возбудителей респираторных инфекций уже неоднократно была продемонстрирована в работах отечественных и зарубежных авторов [4, 8].

Целью данной работы являлось определение динамики экспрессии генов TLR2, TLR4 и TLR9 в эпителиальных клетках слизистой оболочки верхних дыхательных путей и ткани легких при экспериментальной инфекции, вызванной

K. pneumoniae, при инфицировании средней и высокой дозами этих бактерий *in vivo*.

Материалы и методы

В экспериментах были использованы мыши двух линий: BALB/c и C57Bl/6 (питомник «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России, Москва); для работы с животными было получено разрешение этического комитета. Для заражения использовали штамм K-6 ATCC 700603 *K. pneumoniae* (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского).

Эксперимент *in vivo* проводили путем интраназального заражения животных суспензией бактерий *K. pneumoniae* в объеме 50 мкл. Первая группа лабораторных животных ($n = 12$) получала среднюю дозу *K. pneumoniae* (10^4 КОЕ/мл), вторая группа ($n = 30$) – высокую дозу заражения (10^7 КОЕ/мл). Контрольной группе 1 ($n = 15$) интраназально вводили стерильный физиологический раствор натрия хлорида. Контрольную группу 2 ($n = 16$) составили интактные мыши. На 1-е, 3-и, 7-е и 10-е сутки после заражения проводился сбор материала из верхних дыхательных путей (ВДП) и легких. Полученный материал исследовали бактериологическим методом с целью обнаружения в образцах тест-штаммов бактерий и оценки эффективности введенной дозы возбудителя. Для посева использовали дифференциально-диагностическую плотную питательную среду МакКонки (Pronadisa, Испания), обладающую также селективными свойствами: клебсиеллы образуют на этой среде темно-розовые крупные мукоидные колонии.

Кроме того, материал, полученный из ВДП и легких, был использован для детекции и количественного определения копий генов TLR2, TLR4 и TLR9. Для оценки экспрессии генов TLRs применялся метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Из ткани легких и соскобов верхних дыхательных путей выделяли общую РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля, используя набор для выделения РНК «АмплиПРАЙМРибосорб» (ИнтерЛабСервис, РФ) по инструкции

производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием «Набора для проведения реакции обратной транскрипции» (Синтол, Россия) для синтеза первой цепи ДНК на матрице РНК интересующего гена для последующего определения числа копий с помощью ПЦР-РВ [5, 6]. Реакцию проводили с применением «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBRGreenI» и праймеров, синтезированных на фирме «Синтол», Россия. Количество копий кДНК исследуемых генов рассчитывалось относительно актина. Реакцию проводили в амплификаторе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия). Подсчет копий кДНК исследуемого гена проводили относительно 1000 копий гена β -актина. Статистическая обработка проводилась с использованием программы Statsoft Statistica v. 6.0. Достоверность полученных результатов оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни [3].

Результаты

На первом этапе исследования проводили контрольные высевы образцов из ВДП и легких на 1-е, 3-и, 7-е и 10-е сутки после заражения для обнаружения *K. pneumoniae* и оценки динамики накопления или элиминации возбудителя в этих биотопах. По результатам бактериологического исследования было установлено, что у мышей из группы, зараженной 10^4 КОЕ/мл *K. pneumoniae*, тест-штамм не высевался из обоих образцов ни в один из контрольных дней. В группе с дозой заражения 10^7 КОЕ/мл в материале из ВДП возбудитель обнаруживался на 1-е и 3-и сутки у мышей линии BALB/c (25%), у мышей линии C57Bl/6 – на протяжении всего эксперимента (25%). В легких мышей линии BALB/c этой группы возбудитель обнаруживался только на 1-е сутки (25%) (рис. 1).

Далее проводилось определение динамики экспрессии генов TLR2, TLR4, TLR9 в материале ВДП и легких у мышей обеих линий. Показатели экспрессии гена TLR2 в эпителии ВДП у мышей, получивших как среднюю, так и высокую дозу заражения, статистически значимо не отличались от показателей контрольных групп (рис. 2А, Б).

Согласно результатам наших исследований, уровень экспрессии гена TLR4 в эпителии ВДП в группе мышей линии BALB/c с дозой заражения 10^4 КОЕ/мл был достоверно повышен (более чем в 30 раз) на 3-и и 10-е сутки после заражения относительно аналогичных показателей в контрольных группах. Уровень экспрессии гена TLR4 в легочной ткани у группы инфицированных мышей со средней дозой заражения и здоровых мышей не различался. Экспрессия гена TLR4 в материале ВДП у животных обеих линий

при введении большой дозы *K. pneumoniae* была увеличена в 3 раза на 3-10-е сутки, однако эти данные статистически недостоверны (рис. 2В, Г). Вместе с тем, у мышей линии BALB/c из той же группы в ткани легких отмечалось достоверное повышение уровня экспрессии гена TLR4 на 3-и сутки после инфицирования.

Уровень экспрессии гена TLR9 в эпителии ВДП у мышей линии BALB/c, получивших среднюю дозу заражения 10^4 КОЕ/мл, не отличался от показателей контрольных групп. Тогда, как у животных с высокой дозой заражения (10^7 КОЕ/мл) в материале из ВДП было выявлено достоверное повышение уровня экспрессии гена TLR9 на 3-и и 7-е сутки: в 1,8 и 3,3 раза для линий BALB/c и C57Bl/6 соответственно (рис. 2Д, Е).

Обсуждение

Toll-подобные рецепторы (TLRs) являются ключевыми факторами врожденного иммунитета в отношении вирусов и бактерий, что объясняет повышенный интерес к изучению их экспрессии на протяжении инфекционного процесса. Исследование динамики экспрессии генов TLRs в эпителии ВДП может служить инструментом для разработки диагностических критериев, отражающих эффективность местного мукозального иммунитета дыхательных путей против инфекции, вызванной *K. pneumoniae*.

В данном исследовании экспрессия генов TLRs изучалась на модели респираторной ин-

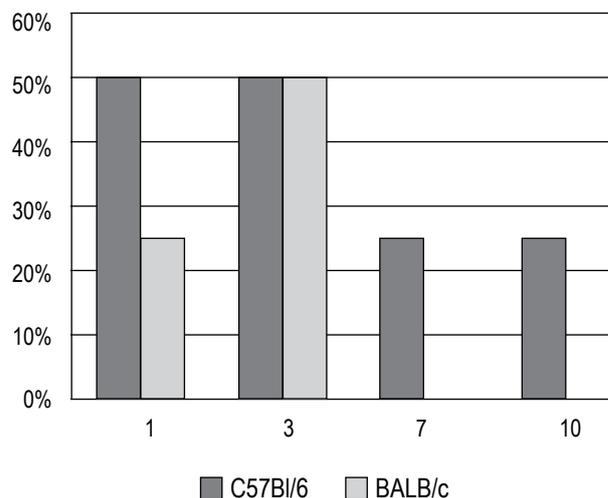


Рисунок 1 Динамика персистенции *K. pneumoniae* в верхних дыхательных путях инфицированных мышей линий BALB/c и C57Bl/6

Примечание. По оси абсцисс – время (сутки), по оси ординат – проценты.

Figure 1. Dynamics of *K. pneumoniae* persistence in the upper respiratory tract of infected BALB/c and C57Bl/6 mice

Note. The abscissa shows time (days), Y-axis shows the percentage.

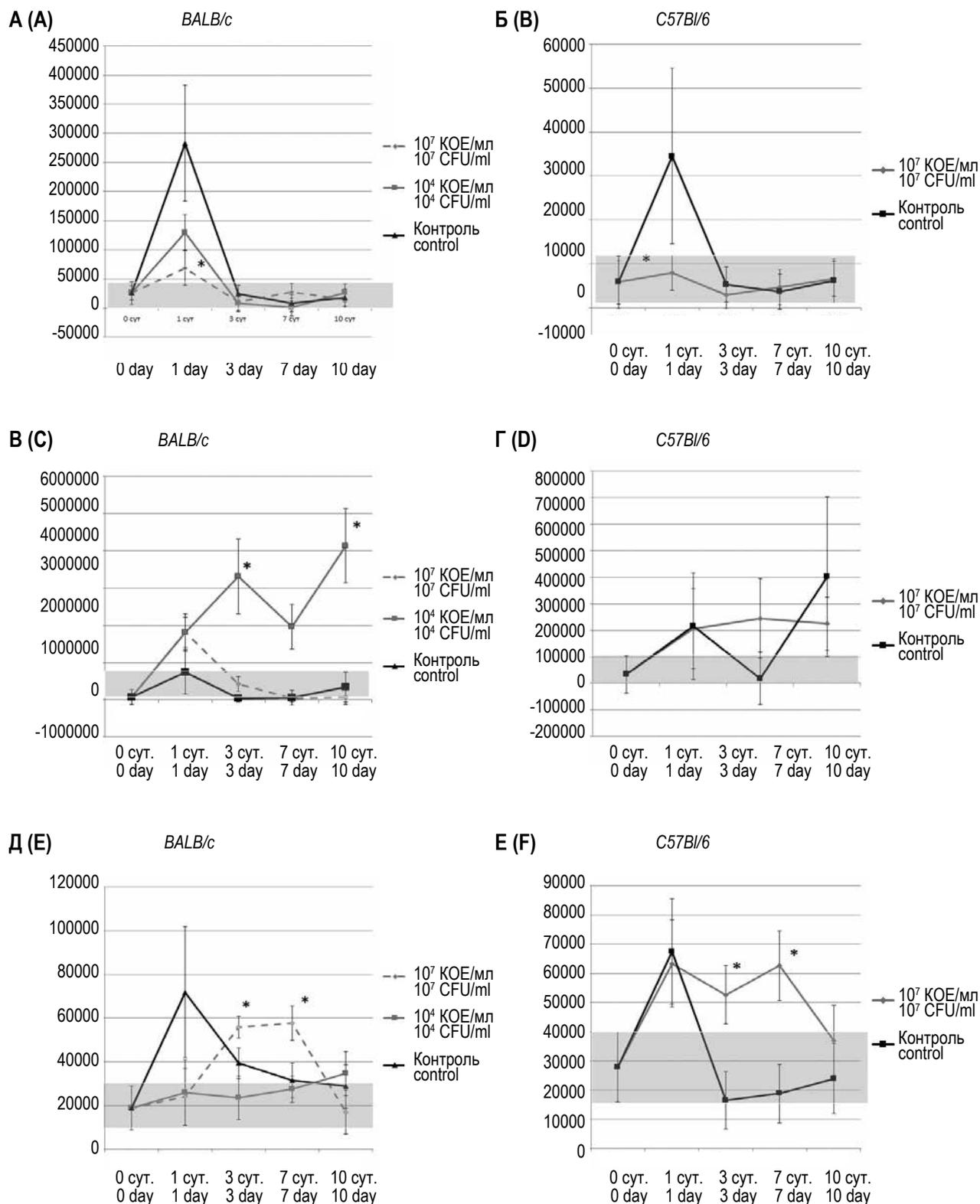


Рисунок 2. Динамика экспрессии генов TLR2 (А, Б), TLR4 (В, Г), TLR9 (Д, Е) эпителиальными клетками ВДП мышей линий BALB/c и C57Bl/6

Примечание. По оси абсцисс – время (сутки), по оси ординат – ОЕ (относительные единицы – число копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина).

Figure 2. Dynamics of TLR2 (A, B), TLR4 (C, D), TLR9 (E, F) gene expression in epithelial cells of the upper respiratory tract of BALB/c and C57Bl/6 mice

Note. X-axis, time post-infection (days), Y-axis, OE (relative units: number of copies of the analyzed gene relative to gene expression of actin).

фекции, вызванной грамотрицательными бактериями вида *K. pneumoniae*. Представленная работа, на наш взгляд, представляет большой интерес с научной и клинической точки зрения. Так, нами было установлено, что невысокая доза заражения, равная 10^4 КОЕ/мл, является недостаточной для персистенции возбудителя в ВДП и его распространения по респираторному тракту в легкие. Экспериментальная инфекция у мышей протекала субклинически, без признаков воспаления. Однако стоит отметить, что, несмотря на отсутствие внешних признаков заболевания, уровень экспрессии генов TLR4 повышался многократно уже на первые сутки после заражения, и эти высокие показатели сохранялись на протяжении всего периода проведения эксперимента. Это позволяет предположить, что мощная активация TLR4 в ранние сроки после заражения и сохраняющийся повышенный уровень в течение нескольких суток (до десяти) способствуют сдерживанию возбудителя во «входных воротах» инфекции и его эффективной элиминации в кратчайшие сроки.

Нами также было установлено, что инфекция, вызванная высокой дозой заражения (10^7 КОЕ/мл), приводила к кратковременной персистенции возбудителя в ВДП (до нескольких суток) и легких (одни сутки). Несмотря на то, что экспрессия генов TLR4 в ВДП в этой группе повышалась статистически недостоверно, у животных было отмечено достоверное увеличение уровня экспрессии генов TLR9, причем у мышей линии BALB/c оно по времени совпадало с полной элиминацией возбудителя из ВДП.

Стоит отметить, что, благодаря высокой чувствительности мышей линии BALB/c к *K. pneumoniae*, эту линию следует считать оптимальной моделью для экспериментальной ОРИ, индуцированной *K. pneumoniae*. Вместе с тем, неспособность *K. pneumoniae* проникать из ВДП в легкие мышей линии C57Bl/6 представляет большой интерес для дальнейших исследований ОРИ в опытах *in vivo*, поскольку этот феномен может свидетельствовать о полиморфизме генов рецепторов врожденного иммунитета.

Список литературы / References

1. Володин Н.Н. Неонатология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 749 с. [Volodin N.N. Neonatology. National manual]. Moscow: GEOTAR-Media. 2008. 749 p.
2. Воробьев А.А., Быков А.С., Буданова Е.В., Бойченко М.Н. Исследования по микроэкологии человека на кафедре микробиологии с вирусологией и иммунологией // Вестник РАМН, 2001. № 1. С. 27-31. [Vorobyev A.A., Bykov S.A., Budanova E.V., Boychenko M.N. Studies of human microecology in the Department of Microbiology with Virology and immunology. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2001, no. 1, pp. 27-31. (In Russ.)]
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с. [Glants S. Biomedical statistics. Transl. from English]. Moscow. Transl. from English: Practice, 1998. 459 s.
4. Ковальчук Л.В., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Мироншиченкова А.М., Ганковский В.А. Роль TOLL-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2012. № 2. С. 147-153. [Kovalchuk L.V., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Miroshnichenkova A.M., Gankovsky V.A. The role of TOLL-like receptors in the pathogenesis of human infectious diseases. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i ego zdorovye" = Kursk Scientific and Practical Bulletin "The Man and his Health"*, 2012, no. 2, pp. 147-153. (In Russ.)]
5. Лабжинов П.А., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Оценка экспрессии генов компонентов врожденного иммунитета в лейкоцитах мышей при действии синтетических лигандов *in vivo* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2013. № 6. С. 76-80. [Labzhinov P.A., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Zverev V.V. The assessment of gene expression of components of innate immunity in the white blood cells of mice under the action of synthetic ligands *in vivo*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 6, pp. 76-80. (In Russ.)]
6. Сомова О.Ю., Ганковская О.А., Лавров В.Ф., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Динамика экспрессии молекул TLR9-опосредованного сигнального пути эпителиальными клетками цервикального канала под действием вируса простого герпеса 2 типа *in vitro* // Российский иммунологический журнал, 2011. Т. 5, № 2 (14). С. 129-134. [Somova O.Yu., Gankovskaya O.A., Lavrov V.F., Gankovskaya L.V., Zverev V.V. The dynamics of expression of molecules TLR9-mediated signaling pathway by epithelial cells of cervical canal under the influence of herpes simplex virus type 2 *in vitro*. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2011, Vol. 5, no. 2 (14), pp. 129-134. (In Russ.)]
7. Шеина Н.И., Буданова Е.В. Значение оценки антибиотикорезистентных свойств бактериальных штаммов-продуцентов в системе гигиенического нормирования // Гигиена и санитария, 2010. № 5. С. 45-47.

[Sheina N.I., Budanova E.V. Value assessment of the properties of antibiotic-resistant bacterial strains-producers in the system of hygienic regulation. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2010, no. 5, pp. 45-47. (In Russ.)]

8. Baral P., Batra S., Zemans R.L., Downey G.P., Jeyaseelan S. Divergent functions of Toll-like receptors during bacterial lung infections. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2014, Vol. 190, no. 7, pp. 722-732.

9. 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.

10. Li B., Zhao Y., Liu C., Chen Z., Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.*, 2014, Vol. 9, no. 9, pp. 1071-1081.

Авторы:

Буданова Е.В. — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Шуленина Е.А. — студент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Зверев В.В. — д.б.н., профессор, академик РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Authors:

Budanova E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Shulenina E.A., Student, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Zverev V.V., PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Head, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 15.08.2017
Принята к печати 25.09.2017

Received 15.08.2017
Accepted 25.09.2017

ВЛИЯНИЕ ХЕЛПЕРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ В-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА

**Савченко А.А.^{1,2}, Дудина М.А.², Борисов А.Г.^{1,2}, Догадин С.А.²,
Кудрявцев И.В.^{3,4}, Мошев А.В.¹, Маньковский В.А.⁵**

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

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

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

⁴ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵ КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

Резюме. Целью исследования явилось сравнительное изучение влияния хелперных (Th-клетки) и регуляторных Т-клеток (Treg) на фенотипический состав В-лимфоцитов крови и ткани щитовидной железы при болезни Грейвса (БГ). Обследовано 43 женщины с болезнью Грейвса. Диагноз БГ основывался на клинико-лабораторных признаках заболевания: жалобах, клинической картине тиреотоксикоза при объективном осмотре, характерных сонографических изменениях ЩЖ, а также повышенном титре антител к рецептору тиреотропного гормона в сыворотке крови и соответствующих изменениях тиреоидного статуса. В качестве контроля обследовано 67 практически здоровых женщин. Исследование фенотипа Th-клеток, Treg и В-лимфоцитов крови и ткани щитовидной железы проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции, соответственно, цельной периферической крови и лимфоцитов, выделенных из ткани щитовидной железы. При исследовании влияния хелперных и регуляторных Т-клеток на фенотипический состав В-лимфоцитов обнаружено, что при БГ в крови снижено количество Treg. В ткани щитовидной железы относительное количество Treg у больных БГ соответствует их уровню в крови. Изменений содержания Т-хелперов в крови, экспрессирующих и не экспрессирующих CD25-рецептор, по сравнению с контрольными значениями не обнаружено. У больных БГ в периферической крови повышено содержание В1-клеток. В ткани щитовидной железы процентное количество данной субпопуляции В-лимфоцитов снижено относительно уровня, выявленного в крови, но при повышении содержания В-клеток памяти. Количество активированных В-лимфоцитов (по CD23-маркеру) в крови у больных БГ снижено относительно контрольных значений. В ткани щитовидной железы обнаружено еще более выраженное снижение относительного количества активированных В-клеток по сравнению с уровнем, выявленным у больных аутоиммунным заболеванием в крови. С помощью корреляционного анализа установлено, что если у лиц контрольной группы повышение содержания активиро-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.А. Савченко, М.А. Дудина, А.Г. Борисов, С.А. Догадин, И.В. Кудрявцев, А.В. Мошев, В.А. Маньковский «Влияние хелперных и регуляторных Т-клеток на фенотипический состав В-лимфоцитов крови и щитовидной железы при болезни Грейвса» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 431-438. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-431-438

© Савченко А.А. и соавт., 2018

For citation:

A.A. Savchenko, M.A. Dudina, A.G. Borisov, S.A. Dogadin, I.V. Kudryavtsev, A.V. Moshev, V.A. Mankovskiy "Effects of helper and regulatory cells upon phenotypic composition of blood B lymphocytes and thyroid gland in Graves' disease", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 431-438. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-431-438

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-431-438

ванных В-лимфоцитов в крови сопровождается сонаправленной реакцией со стороны Трег (обычный иммунорегуляторный процесс), то при БГ подобный механизм нарушается. В крови у обследованных больных количество Трег и активированных Т-хелперов положительно взаимосвязано с общими В-лимфоцитами, В2-клетками и наивными В-лимфоцитами, тогда как в ткани щитовидной железы Трег полностью исключены из системы взаимосвязей с активированными В-лимфоцитами. Предполагается, что у больных БГ наблюдается не только снижение содержания Трег в крови, но и нарушение их функциональной активности.

Ключевые слова: Т-регуляторные клетки, Т-хелперы, В-лимфоциты, субпопуляция, кровь, ткань щитовидной железы, болезнь Грейвса

EFFECTS OF HELPER AND REGULATORY CELLS UPON PHENOTYPIC COMPOSITION OF B LYMPHOCYTES AND THYROID GLAND IN GRAVES' DISEASE

Savchenko A.A.^{a,b}, Dudina M.A.^b, Borisov A.G.^{a,b}, Dogadin S.A.^b, Kudryavtsev I.V.^{c,d}, Moshev A.V.^a, Mankovskiy V.A.^e

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

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

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

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

^e Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The aim of this work was a comparative study of the helper- (Th cells) and regulatory T cells (Treg) effects upon the phenotypic composition of B lymphocytes in blood and thyroid tissue in Graves' disease (GD). 43 women with GD were examined. The diagnosis of GD was based on clinical and laboratory signs of the disease: complaints, clinical picture of the thyrotoxicosis with objective examination, characteristic sonographic changes in thyroid gland, as well as elevated titers of antibodies to thyroid-stimulating hormone receptor in blood serum, and corresponding changes in thyroid status. 67 practically healthy women were examined as a control. The studies of Th cells, Treg and B lymphocytes phenotypes in blood and thyroid tissue were carried out by flow cytometry using direct immunofluorescence, respectively, in whole peripheral blood and lymphocytes isolated from thyroid tissue. The relative amounts of Tregs in thyroid gland from the patients with GD corresponds to their level in the blood. We did not find any changes in the content of blood T helpers expressing vs. non-expressing CD25 receptors, as compared to the control values. In patients with GD, an increased B1 cells content was revealed in peripheral blood. The percentage of this B cell subpopulation in thyroid tissue is reduced when compared to the levels found in blood, but with increased memory B cells contents. The number of activated B lymphocytes (by CD23 marker) in blood of patients with GD is reduced when compared to control values. It was found that, in thyroid tissue, there is an even more pronounced decrease in the relative amount of activated B cells compared to the levels detected in blood from these patients. By means of correlation analysis, it was found that increase in activated B lymphocytes in blood from controls is accompanied by a co-directional reaction from Treg (the usual immunoregulatory process). In Graves' disease, such a relationship was not found. The amounts of Treg and activated T helper cells in blood of the patients did positively correlate with common B lymphocytes, B2 cells and naïve B lymphocytes. Meanwhile, Treg's in thyroid tissue, were completely excluded from the system of interactions with activated B lymphocytes. It is assumed that a decrease in Treg's content in peripheral blood, along with altered functional activity is observed in patients with GD.

Keywords: T regulatory cells, T helpers, B lymphocytes, subpopulation, blood, thyroid tissue, Graves' disease

Введение

Болезнь Грейвса (БГ) представляет собой органоспецифическое аутоиммунное заболевание щитовидной железы (ЩЖ), характеризующее-

ся развитием диффузного гиперпластического зоба и обусловленное стимуляцией рецепторов к тиреотропному гормону (ТТГ) тиреостимулирующими антителами [3, 13]. Иммунопатогенез БГ определяется выработкой В-лимфоцитами

тиреоидстимулирующих аутоантител, действующих подобно ТТГ и вызывающих гиперфункцию и пролиферацию тиреоцитов. Между тем, эффективность традиционной консервативной терапии БГ в настоящее время определяется восстановлением функции ЩЖ (за счет тиреостатической терапии), а не подавлением интенсивности аутоиммунного процесса. В то же время даже при успешном восстановлении концентрации тиреоидных гормонов в крови, у больных БГ нередко наблюдаются рецидивы заболевания, лечение которых осуществляется же хирургическими или радиотерапевтическими методами [1, 13]. Следовательно, для разработки специфической (таргетной) терапии, направленной на подавление аутоиммунного процесса при БГ, необходимо охарактеризовать внутрисистемные механизмы регуляции функции В-лимфоцитов.

Функциональная активность В-лимфоцитов в значительной степени регулируется Т-клетками. Классическим определением механизмов данной регуляции является участие Т-хелперов 2-го типа в активации В-лимфоцитов и стимуляции выработки ими иммуноглобулинов различных классов. Установлено, что при БГ наблюдается патогенетически значимый дисбаланс Th1-/Th2-лимфоцитов [5]. Доказано, что Th2-клетки, экспрессирующие и секретирующие интерлейкин-22, принимают участие в иммунопатогенезе различных аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, включая БГ [11, 14].

Одним из основных внутрисистемных механизмов предотвращения и ингибирования аутоиммунных процессов является супрессия функциональной активности эффекторных клеток и Т-хелперов. В связи с этим при исследовании иммунопатогенеза БГ активно обсуждается роль регуляторных Т-клеток (Treg). Обнаружено, что при БГ количество Treg в крови снижается [10, 15]. При проведении тиреостатической терапии и нормализации концентрации тиреоидных гормонов количество Treg в периферической крови больных повышается [6, 7]. Однако механизмы Т-хелперной и регуляторной регуляции функциональной активности В-лимфоцитов при БГ раскрыты до сих пор не полностью. В связи с тем что в основе БГ лежит органоспецифический аутоиммунный процесс, механизмы регуляции В-лимфоцитов должны быть охарактеризованы в сравнительном аспекте – в крови и ткани ЩЖ.

Таким образом, целью данного исследования явилось сравнительное изучение влияния хелперных и регуляторных Т-клеток на фенотипический состав В-лимфоцитов крови и ткани ЩЖ при БГ.

Материалы и методы

В исследование было включено 43 женщины с БГ в возрасте от 25 до 76 лет, средний воз-

раст $39,95 \pm 14,38$, из них 13 (30,23%) с впервые верифицированным диагнозом и 30 (69,76%) с рецидивом заболевания. Диагноз БГ основывался на клинико-лабораторных признаках заболевания: жалобах, клинической картине тиреотоксикоза при объективном осмотре, характерных сонографических изменениях ЩЖ, а также повышенном титре антител к рецептору тиреотропного гормона в сыворотке крови и соответствующих изменениях тиреоидного статуса. Определение гормонов в крови проводилось в гормональной лаборатории эндокринологического центра Красноярской краевой клинической больницы. После достижения медикаментозного эутиреоза всем больным проводилась эпифасциальная тиреоидэктомия. Часть удаленной ЩЖ погружалась в пластиковый контейнер с изотоническим раствором натрия хлорида для последующего выделения из ткани лимфоцитов. В качестве контроля обследовано 67 практически здоровых женщин аналогичного возраста, без отягощенного анамнеза по заболеваниям ЩЖ у себя и кровных родственников, а также отсутствием структурных изменений ЩЖ при УЗИ. Критериями исключения из контрольной группы являлись беременность и период лактации. В течение 2-х месяцев, предшествующих иммунологическому и гормональному анализу, обследованные женщины не болели острыми респираторно-вирусными инфекциями и не получали профилактических прививок.

Исследование фенотипа Th-клеток, Treg и В-лимфоцитов крови и ткани ЩЖ проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции, соответственно, цельной периферической крови и лимфоцитов, выделенных из ткани ЩЖ, с применением моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующих панелях: CD45-FITC/CD127-PE/CD3-ECD/CD25-PC5/CD4-PC7 и CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD/CD45-PC5/CD27-PC7. Лимфоциты из ткани ЩЖ получали центрифугированием в градиенте плотности Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, США) ($\rho = 1,077$) клеточной суспензии, полученной путем мягкого механического выдавливания клеток из фрагментированной ткани ЩЖ. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [2]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [9]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием

реагента VersLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 50 000 лимфоцитов.

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

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Достоверность различий в содержании лимфоцитов в крови и ткани ЩЖ у больных БГ определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

При исследовании содержания $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD4^+CD25^+$ клеток обнаружено, что их количество в периферической крови больных БГ соответствует контрольным значениям (табл. 1). Кроме того, подобное же процентное содержание данных фракций Т-лимфоцитов выявля-

ется при БГ и в ткани ЩЖ. В то же время уровень $CD3^+CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$ клеток в крови у больных БГ снижен по сравнению с контрольными значениями. Процентное количество лимфоцитов с данным фенотипом в ткани щитовидной железы при БГ соответствует их уровню в крови.

Исследование субпопуляционного состава В-лимфоцитов позволило установить, что у больных БГ в периферической крови по сравнению с контрольными значениями в 1,6 раза повышено относительное количество $CD19^+CD5^+$ клеток (табл. 2). В то же время в ткани ЩЖ при БГ количество данной субпопуляции В-клеток снижено в 2,3 раза по сравнению с выявленным у пациентов в периферической крови. Особенностью субпопуляционного состава В-лимфоцитов в ткани при БГ также является увеличение в 1,6 раза по сравнению с уровнем, выявленным в крови, количества $CD19^+CD27^+$ клеток.

У больных БГ в периферической крови более чем в 2 раза по сравнению с контрольными значениями понижено процентное содержание $CD19^+CD23^+$ клеток (табл. 3). В ткани ЩЖ количество клеток с данным фенотипом у больных БГ еще снижено практически в 2 раза по сравнению с уровнем, выявленным в периферической крови. Кроме того, у больных БГ в крови по сравнению с контролем понижено относительное содержание $CD19^+CD5^+CD23^+$, $CD19^+CD27^+CD23^+$ и $CD19^+CD27^+CD23^+$ лимфоцитов. В ткани ЩЖ относительно выявленного в периферической крови у пациентов с БГ снижены уровни $CD19^+CD5^+CD23^+$, $CD19^+CD27^+CD23^+$ и $CD19^+CD27^+CD23^+$ клеток.

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ Th- и T-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В КРОВИ И ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. CONTENT OF THE Th AND T REGULATORY CELLS IN THE BLOOD AND THYROID GLANDS IN PATIENTS WITH GRAVE'S DISEASE (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Контроль Control n = 67		Пациенты с болезнью Грейвса Patients with Grave's disease n = 43			
			В крови In blood		В ткани ЩЖ In thyroid glands	
	1		2		3	
	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$
$CD3^+CD4^+$, $10^9/L$	0,82	0,57-1,14	1,01	0,65-1,36		
$CD3^+CD4^+$, %	42,0	35,0-47,4	46,5	38,4-54,6	38,5	31,7-51,9
$CD3^+CD4^+CD25^+$, %	2,5	2,1-3,4	2,9	1,6-4,5	1,6	1,1-9,2
$CD3^+CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$, %	1,8	1,5-2,1	1,1	0,7-1,6	0,9	0,7-1,3
				$p_1 = 0,025$		

Примечание. p_1 – статистически значимые различия с контрольными показателями.

Note. p_1 , statistically significant differences against control parameters

С помощью корреляционного анализа исследованы взаимосвязи между содержанием различных фракций CD4⁺ клеток и фенотипическим составом В-лимфоцитов. Обнаруже-

но, что у лиц контрольной группы количество CD3⁺CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} клеток в крови положительно взаимосвязано с содержанием CD19⁺CD23⁺ (r=0,29, p=0,032), CD19⁺CD5⁺CD23⁺

ТАБЛИЦА 2. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ В-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. SUBPOPULATION COMPOSITION OF B CELLS IN THE BLOOD AND THYROID GLANDS IN PATIENTS WITH GRAVE'S DISEASE (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 67		Пациенты с болезнью Грейвса Patients with Grave's disease n = 43			
			В крови In blood		В ткани ЩЖ In thyroid glands	
	1		2		3	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,26	0,18-0,34	0,27	0,17-0,37		
CD19 ⁺ , %	12,9	9,2-16,0	12,9	9,6-17,6	15,1	13,4-26,0
CD19 ⁺ CD5 ⁻ , %	10,1	7,7-12,5	10,5	7,4-14,2	13,63	10,6-26,1
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	1,6	1,2-2,8	2,5	1,8-3,8	1,1	0,2-1,8
			p ₁ = 0,002		p ₂ = 0,023	
CD19 ⁺ CD27 ⁻ , %	9,4	7,5-12,0	9,9	7,0-15,0	9,7	5,7-14,1
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , %	2,4	1,8-3,2	2,3	1,3-3,5	3,7	2,5-6,2
					p ₂ = 0,028	

Примечание. p₁ – статистически значимые различия с контрольными показателями; p₂ – -//- между показателями пациентов с болезнью Грейвса в крови и ткани щитовидной железы.

Note. p₁ – the differences between blood samples from control group and patients with Graves' disease are significant; p₂ – the differences between blood samples and thyroid tissue infiltrated cells from patients with Graves' disease are significant.

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ В-ЛИМФОЦИТОВ (В %), ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ НИЗКОАФФИННЫЙ РЕЦЕПТОР ДЛЯ IgE, В КРОВИ И ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. CONTENT OF B LYMPHOCYTE (IN %) WITH EXPRESSION OF THE LOW AFFINITY RECEPTOR FOR IgE IN THE BLOOD AND THYROID GLANDS IN PATIENTS WITH GRAVE'S DISEASE (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 67		Пациенты с болезнью Грейвса Patients with Grave's disease n = 43			
			В крови In blood		В ткани ЩЖ In thyroid glands	
	1		2		3	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
CD19 ⁺ CD23 ⁺	10,5	6,9-12,9	5,1	2,5-7,7	2,6	1,3-5,3
			p ₁ < 0,001		p ₂ = 0,045	
CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD23 ⁺	8,6	5,3-11,5	3,7	1,8-5,3	2,3	1,0-3,7
			p ₁ < 0,001			
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺	1,4	0,8-2,5	1,3	0,5-2,6	0,31	0,18-1,11
					p ₂ = 0,040	
CD19 ⁺ CD27 ⁻ CD23 ⁺	8,1	5,4-11,0	2,0	1,1-4,3	0,93	0,01-1,09
			p ₁ < 0,001		p ₂ = 0,028	
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD23 ⁺	1,4	0,3-2,3	0,24	0,14-0,53	0,76	0,32-2,34
			p ₁ < 0,001		p ₂ = 0,038	

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

($r = 0,31$, $p = 0,014$), $CD19^+CD27^+CD23^+$ ($r = 0,35$, $p = 0,005$) и $CD19^+CD27^+CD23^+$ лимфоцитов ($r = 0,42$, $p < 0,001$).

У больных БГ относительное количество $CD19^+$ лимфоцитов в крови положительно коррелирует с процентными уровнями $CD3^+CD4^+CD25^+$ ($r = 0,43$, $p = 0,002$) и $CD3^+CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$ клеток ($r = 0,39$, $p = 0,009$). Взаимосвязи в крови также формируются корреляциями количества $CD19^+CD27^+$ и $CD19^+CD5$ лимфоцитов с уровнями $CD3^+CD4^+CD25^+$ ($r = 0,49$, $p < 0,001$ и $r = 0,42$, $p = 0,003$ соответственно) и $CD3^+CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$ клеток ($r = 0,49$, $p < 0,001$ и $r = 0,37$, $p = 0,012$ соответственно).

У больных БГ относительное количество $CD3^+CD4^+$ клеток в ткани ЩЖ коррелирует с уровнем $CD19^+CD5^+CD23^+$ лимфоцитов ($r = 0,79$, $p = 0,036$), тогда как количество $CD3^+CD4^+CD25^+$ клеток взаимосвязано с процентным содержанием в ткани ЩЖ $CD19^+CD23^+$ ($r = 0,85$, $p = 0,014$), $CD19^+CD5^+CD23^+$ ($r = 0,80$, $p = 0,034$), $CD19^+CD5^+CD23^+$ ($r = 0,93$, $p = 0,025$) и $CD19^+CD27^+CD23^+$ лимфоцитов ($r = 0,82$, $p = 0,023$).

Обсуждение

Т-регуляторные клетки ($CD3^+CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$) являются одним из основных механизмов контроля развития гипериммунных состояний, включая аутоиммунные заболевания. В связи с этим в ряде работ показано, что при БГ количество Трег в крови у больных снижается. Так, в исследованиях Pawlowska P. и соавт. (2017) установлено, что у больных БГ по сравнению с больными с узловым зобом в 4 раза снижено количество Трег в крови [10]. Стимуляция функциональной активности мононуклеарных клеток инсулинзависимым фактором роста-1 (IGF-1) приводило к повышению количества Трег в крови. Yuan Q. и соавт. (2017) отмечают, что патогенез БГ ассоциирован со сниженным количеством Трег [15]. В нашем исследовании мы также обнаружили, что количество Трег в крови у больных БГ снижено относительно контрольных значений. Уровень Трег в ткани щитовидной железы при данном аутоиммунном заболевании соответствует их содержанию в крови.

Ключевым в иммунопатогенезе БГ является появление на периферии «запрещенного» клона В-лимфоцитов, который способен синтезировать тиреоидстимулирующие антитела. В частности, в работе Kurozumi A. и соавт. (2015) показано, что выключение функционирования В-лимфоцитов приводит к резкому снижению уровня аутоантител и улучшению функции щитовидной железы [8].

При исследовании субпопуляционного состава В-лимфоцитов в крови обнаружено, что при БГ повышается количество В1-клеток. Однако в ткани щитовидной железы у больных БГ содержание В1-лимфоцитов снижено в 2,3 раза по сравнению с уровнем, выявленным в крови, но в 1,6 раза повышено содержание В-клеток памяти. В1-лимфоциты являются минорной фракцией В-клеток, локализуются преимущественно в брюшной и плевральной полостях, синтезируют IgM и IgA к бактериальным антигенам. Однако данная субпопуляция В-лимфоцитов также способна выполнять роль антигенпрезентирующих клеток. Повышение количества В-клеток памяти в ткани щитовидной железы при БГ ранее уже описывалось [12].

Экспрессия CD23-антигена была нами исследована в качестве функционального маркера В-лимфоцитов. Данная молекула представляет собой низкоаффинный рецептор к IgE [4]. Обнаружено, что в крови больных БГ значительно снижено содержание общих В-лимфоцитов, а также В2-клеток, наивных В-лимфоцитов и В-клеток памяти, экспрессирующих CD23. При этом в ткани щитовидной железы у больных данной категории также понижено количество общих В-лимфоцитов, В1-клеток, наивных В-лимфоцитов, В-клеток памяти, экспрессирующих CD23-рецептор, по сравнению с уровнями в крови.

С помощью корреляционного анализа мы оценили влияние Th-клеток и Трег на фенотип В-лимфоцитов. Обнаружено, что у лиц контрольной группы Трег положительно взаимосвязаны с количеством активированных В-лимфоцитов, включая В1-клетки, наивные и В-лимфоциты памяти. Данные взаимосвязи характеризуют обычный иммунорегуляторный процесс, который развивается при увеличении количества активированных В-лимфоцитов. У больных БГ в крови с уровнем В-лимфоцитов положительно взаимосвязаны как активированные Th-клетки, так и Трег. Причем корреляционная связь Т-лимфоцитов при аутоиммунной патологии реализуется только в отношении В-лимфоцитов (общие В-лимфоциты, В2-клетки и наивные В-лимфоциты), не экспрессирующих CD23-маркер. В то же время в ткани щитовидной железы в системе корреляционных связей участвуют только активированные В-лимфоциты (общие В-клетки, В1- и В2-лимфоциты, В-клетки памяти) с одной стороны и Т-хелперы, экспрессирующие и не экспрессирующие CD25-рецептор, с другой стороны. Следовательно, если у больных БГ в системе корреляционных связей в крови не принимают участие активированные В-лимфоциты, то в ткани щитовидной железы – Трег. Можно предположить, что при БГ изменя-

ется не только количество Трег в крови, но и нарушается их функция. Подобное предположение также выдвигается рядом исследователей [7, 15].

Заключение

Таким образом, при исследовании влияния хелперных и регуляторных Т-клеток на фенотипический состав В-лимфоцитов обнаружено, что при БГ в крови снижено количество Трег. В ткани щитовидной железы относительное количество Трег у больных БГ соответствует их уровню в крови. Изменений содержания Т-хелперов в крови, экспрессирующих и не экспрессирующих CD25-рецептор, по сравнению с контрольными значениями не обнаружено. У больных БГ в периферической крови повышено содержание В1-клеток, в ткани щитовидной железы процентное количество данной субпопуляции В-лимфоцитов снижено относительно уровня, выявленного в крови, но при повышении содержания В-клеток памяти. Количество активированных В-лимфоцитов (по CD23-маркеру) в крови у больных БГ сниже-

но относительно контрольных значений. В ткани щитовидной железы выявляется еще более выраженное снижение относительного количества активированных В-клеток по сравнению с уровнем, установленным у больных данным аутоиммунным заболеванием в крови. С помощью корреляционного анализа установлено, что если у лиц контрольной группы повышение содержания активированных В-лимфоцитов в крови сопровождается сонаправленной реакцией со стороны Трег (обычный иммунорегуляторный процесс), то при БГ подобный механизм нарушается. В крови у обследованных больных количество Трег и активированных Т-хелперов положительно взаимосвязано с общими В-лимфоцитами, В2-клетками и наивными В-лимфоцитами, тогда как в ткани щитовидной железы Трег полностью исключены из системы взаимосвязей с активированными В-лимфоцитами. Можно предположить, что у больных БГ наблюдается не только снижение содержания Трег в крови, но и нарушение их функциональной активности.

Список литературы / References

1. Ванушко В.Э., Фадеев В.В. Болезнь Грейвса (клиническая лекция) // Эндокринная хирургия, 2013. № 1. С. 23-33. [Vanushko V.E., Fadeev V.V. Graves' disease (clinical lecture). *Endokrinная khirurgiya = Endocrine Surgery*, 2013, no. 1, pp. 23-33. (In Russ.)]
2. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестичетного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
3. Савченко А.А., Догадин С.А., Дудина М.А., Мацынина В.П. Клинико-иммунологические показатели и их взаимосвязь с тиреоидным статусом у больных болезнью Грейвса в зависимости от уровня аутоантител к тиреопероксидазе // Проблемы эндокринологии, 2016. Т. 62, № 1. С. 4-9. [Savchenko A.A., Dogadin S.A., Dudina M.A., Matsynina V.P. The clinical and immunological indices and their interaction with thyroid status in patients with Graves' disease depending on thyrocytes peroxidase autoantibodies level. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2016, Vol. 62, no. 1, pp. 4-9. (In Russ.)] doi: 10.14341/probl20166214-9.
4. Dhaliwal B., Pang M.O., Keeble A.H., James L.K., Gould H.J., McDonnell J.M., Sutton B.J., Beavil A.J. IgE binds asymmetrically to its B cell receptor CD23. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, p. 45533.
5. Eshaghkhani Y., Sanati M.H., Nakhjavani M., Safari R., Khajavi A., Ataei M., Jadali Z. Disturbed Th1 and Th2 balance in patients with Graves' disease. *Minerva Endocrinol.*, 2016, Vol. 41, no. 1, pp. 28-36.
6. Hu Y., Tian W., Zhang L.L., Liu H., Yin G.P., He B.S., Mao X.M. Function of regulatory T-cells improved by dexamethasone in Graves' disease. *Eur. J. Endocrinol.*, 2012, 166, Vol. 4, pp. 641-646.
7. Klatka M., Grywalska E., Partyka M., Charytanowicz M., Kiszczak-Bochynska E., Rolinski J. Th17 and Treg cells in adolescents with Graves' disease. Impact of treatment with methimazole on these cell subsets. *Autoimmunity*, 2014, Vol. 47, no. 3, pp. 201-211.
8. Kurozumi A., Okada Y., Arai T., Narisawa M., Torimoto K., Yamamoto S., Tanaka Y. Induction of thyroid remission using rituximab in a patient with type 3 autoimmune polyglandular syndrome including Graves' disease and type 1 diabetes mellitus: a case report. *Endocr. J.*, 2015, Vol. 62, no. 1, pp. 69-75.
9. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.
10. Pawlowski P., Grubczak K., Kostecki J., Ilendo-Poskrobko E., Moniuszko M., Pawlowska M., Rejdak R., Reszec J., Mysliwiec J. Decreased frequencies of peripheral blood CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺ in patients with Graves' disease and Graves orbitopathy: Enhancing effect of insulin growth factor-1 on Treg cells. *Horm. Metab. Res.*, 2017, Vol. 49, no. 3, pp. 185-191.
11. Peng D., Xu B., Wang Y., Guo H., Jiang Y. A high frequency of circulating Th22 and Th17 cells in patients with new onset Graves' disease. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 7, e68446. doi: 10.1371/journal.pone.0068446.

12. Segundo C., Rodríguez C., García-Poley A., Aguilar M., Gavilán I., Bellas C., Brieva J.A. Thyroid-infiltrating B lymphocytes in Graves' disease are related to marginal zone and memory B cell compartments. *Thyroid*, 2001, Vol. 11, no. 6, pp. 525-530.
13. Smith T.J., Hegedüs L. Graves' disease. *N. Engl. J. Med.*, 2016, Vol. 375, no. 16, pp. 1552-1565.
14. Song R.H., Yu Z.Y., Qin Q., Wang X., Muhali F.S., Shi L.F., Jiang W.J., Xiao L., Li D.F., Zhang J.A. Different levels of circulating Th22 cell and its related molecules in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2014, Vol. 7, no. 7, pp. 4024-4031.
15. Yuan Q., Zhao Y., Zhu X., Liu X. Low regulatory T cell and high IL-17 mRNA expression in a mouse Graves' disease model. *J. Endocrinol. Invest.*, 2017, Vol. 40, no. 4, pp. 397-407.

Авторы:

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

Дудина М.А. — к.м.н., ассистент кафедры внутренних болезней № 2 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 «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

Догадин С.А. — д.м.н., профессор, профессор кафедры внутренних болезней № 2 ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

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

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

Маньковский В.А. — врач-хирург хирургического отделения № 2 КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, Россия

Authors:

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 Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Physiology Department, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasensky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Dudina M.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasensky Medical University, Krasnoyarsk, 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. Voyno-Yasensky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Dogadin S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Internal Medicine, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasensky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Moshev A.V., Junior 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, Krasnoyarsk, Russian Federation

Mankovskiy V.A., Clinical Surgeon, The Surgery Department No. 2, Regional Clinical Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 26.07.2017
Принята к печати 22.09.2017

Received 26.07.2017
Accepted 22.09.2017

ПРИМЕНЕНИЕ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ В ТЕРАПИИ ПАРОДОНТИТА

Мудров В.П.¹, Нелюбин В.Н.², Воробьева Е.С.³, Лысюк Е.Ю.⁴,
Мяндиев М.С.⁵, Фоменков И.С.⁵, Иванов С.Ю.⁵

¹ ФГБУ «9 Лечебно-диагностический центр» Министерства обороны РФ, Москва, Россия

² «Научно-исследовательский медико-стоматологический институт МГМСУ им. Евдокимова», Москва Россия

³ ООО «ДжиЭф Групп», Москва, Россия

⁴ ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

⁵ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Заболевания пародонта, в том числе заболевания десен, гингивит, периодонтит и пародонтит часто связаны с прогрессирующей потерей костной и мягкой ткани пародонта. Исследования последних лет говорят об эффективности тромбоцитарного фактора роста, фактора роста фибробластов и других ростовых факторов, стимулирующих регенерацию соединительной и костной ткани. Ряд цитокинов и факторов роста участвуют в регулировании ангиогенеза, но васкулярный эндотелиальный фактор роста (VEGF) является самым мощным агентом, действующим непосредственно на эндотелий сосудов. VEGF обнаруживается в слюне и эндотелиальных клетках пародонта. VEGF играет доминирующую роль в поддержании как здоровья пародонта, так и хронических воспалительных заболеваний пародонта.

Целью работы стала разработка применения эндотелиального фактора роста (VEGF) в пародонтологии и поиск лабораторных маркеров эффективности терапии пародонтита.

Обследовано 19 человек в возрасте 53–79 лет с пародонтитом I–II степени. В пародонтальной терапии пациентов применялся препарат «Ребон. Гель для десен» (ООО «ДжиЭф Групп», Россия). Препарат представляет собой набор биорезорбируемых карбогидратов на основе карбоксиметилцеллюлозы, формирующих клеточную основу, аналогичную экстраклеточному матриксу. Содержит соли натрия, калия, фосфора, хлора для обеспечения баланса рН тканей и комплекс рекомбинантных гликозилированных полипептидов, идентичных цитокинам и факторам роста человека. В пробе определяли иммуноферментным методом фактор роста эндотелия сосудов человека, изоформа А-165 (ООО «СайСторЛаб», Россия) и IFN γ (АО «Вектор-Бест», Россия).

Все наши пациенты отметили снижение болевого синдрома после применения препарата, а также значительное ускорение процессов заживления в мягких тканях. Наблюдение состояния полости рта показало хорошую динамику и ускорение регенерации костной ткани. После лечения уровень IFN γ возрос с 14,48 до 27,45 пг/мл. Хотя диапазон значений после лечения был существенным, различия в группе до и после лечения были значимыми, $p = 0,022$. VEGF в зубодесневой жидкости показал большой разброс значений от 26–279,3 пг/мл до лечения и 16–198,2 пг/мл после лечения, но в целом обнаружена тенденция к снижению уровня VEGF после терапии.

Для диагностики текущего состояния пародонта актуален анализ различных соединений жидкости десневой борозды, а разработанные диагностические подходы на основе измерения уровня IFN γ , VEGF в скрининге и мониторинге помогают эффективнее проводить лечение.

Введение в терапию препарата с комплексом ростовых факторов и пептидогликан-распознающим белком ускоряет процессы эпителизации и регенерации соединительной и костной ткани.

Ключевые слова: пародонтит, зубодесневая жидкость, цитокины, факторы роста, IFN γ , VEGF

Адрес для переписки:

Мудров Валерий Павлович
ФГБУ «9 Лечебно-диагностический центр»
Министерства обороны РФ
123298, Россия, Москва, ул. Левченко, 1/436.
Тел.: 8 (916) 174-44-77.
E-mail: vpmudrov@yandex.ru

Address for correspondence:

Mudrov Valeriy P.
9th Medical-Diagnostic Centre
123298, Russian Federation, Moscow, Levchenko str., 1,
apt 436.
Phone: 7 (916) 174-44-77.
E-mail: vpmudrov@yandex.ru

Образец цитирования:

В.П. Мудров, В.Н. Нелюбин, Е.С. Воробьева, Е.Ю. Лысюк, М.С. Мяндиев, И.С. Фоменков, С.Ю. Иванов «Применение ростовых факторов в терапии пародонтита» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 439-444. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-439-444

For citation:

V.P. Mudrov, V.N. Nelyubin, E.S. Vorobieva, E.Yu. Lysiuk, M.S. Miandiev, I.S. Fomenkov, S.Yu. Ivanov "The use of growth factors in periodontitis treatment", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 439-444. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-439-444

© Мудров В.П. и соавт., 2018

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-439-444

THE USE OF GROWTH FACTORS IN PERIODONTITIS TREATMENT

Mudrov V.P.^a, Nelyubin V.N.^b, Vorobieva E.S.^c, Lysiuk E.Yu.^d,
Miandiev M.S.^e, Fomenkov I.S.^e, Ivanov S.Yu.^e

^a 9th Medical-Diagnostic Centre, Moscow, Russian Federation

^b Moscow State A.I. Evdokimov Medico-Stomatological University, Moscow, Russian Federation

^c GF group LLC, Moscow, Russian Federation

^d Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Periodontal disease, including gum disease, gingivitis, periodontitis and periodontal disease is frequently associated with progressive loss of bone and soft periodontal tissues. Recent studies suggest effectiveness of platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor and other growth factors, which may stimulate regeneration of connective and bone tissue. A number of cytokines and growth factors participate in regulation of angiogenesis, but vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most powerful agent, acting directly on the vascular endothelium. VEGF detected in saliva and endothelial cells of periodontium. VEGF plays a dominant role both in periodontal health maintenance as well as in chronic inflammatory periodontal disease. The aim of this work was to develop implementation of VEGF in periodontology, and a search for laboratory markers of therapeutic efficiency in periodontitis.

We observed 19 patients aged 53–79 years with I-II grade periodontitis. In frames of periodontal therapy, the patients used a drug “Rebon. Gel for Gum” (“GF group”, Russia). The drug represents a composition of bioresorbable carbohydrates on the basis of carboxymethylcellulose, forming the cellular basis for similar extracellular matrix. It contains different sodium, potassium, phosphorus, chlorine salts in order to balance the tissue pH, and a complex of glycosylated recombinant polypeptides identical to cytokines and human growth factors. ELISA method was used in the biological samples for detection of VEGF, human isoform A-165 (“SCI store” Ltd., Russia), and IFN γ (JSC “Vector Best”, Russia).

All our patients noted a decrease in pain after the treatment, as well as a significant acceleration of healing processes in oral cavity. Observation of the oral cavity state showed good dynamics and acceleration of bone tissue regeneration. After the treatment course, the level of IFN γ increased from 14.48 to 27.45 pg/ml. The difference before and after treatment values was significant ($p = 0.022$), despite a sufficient range of measured values. VEGF in gingival fluid showed a large scatter of values, from 26 to 279 pg/ml before treatment, and 16 to 198 pg/ml after treatment. Generally, a tendency for VEGF decrease was observed after treatment.

To diagnose the current state of the periodontium, an importance of analyses of the gingival sulcus fluid is actual. The developed diagnostic approaches based on measuring the IFN γ , VEGF levels in screening and monitoring regimens help to provide a more effective treatment. Introduction of a complex preparation with growth factors and peptidoglycan-recognizing protein seems to accelerate epithelialization and regeneration of connective and bone tissue.

Keywords: periodontitis, dento-gingival fluid, cytokines, growth factors, IFN γ , VEGF

Введение

Заболевания пародонта, в том числе заболевания десен, гингивит, периодонтит и пародонтит, связаны с прогрессирующей потерей костной и мягкой ткани пародонта. Клиническим исходом в этих случаях становится потеря 1–3 и более зубов. При этом выраженная потеря костной ткани, связанная с низкой рецессией десны, не позволяет добиться регенерации пародонта.

Новые данные о взаимодействии иммунной системы и костной ткани показывают, что важную функцию в процессе потери костной массы играют Th1-лимфоциты, влияющие на пролиферацию, дифференцировку и апоптоз остеокла-

стов. Ключевая роль в воспалительно-индуцированной костной резорбции принадлежит IL-12, IFN γ , TNF α , IL-1. Активность остеокластов повышают Th17-лимфоциты под влиянием IFN γ и IL-17 [10].

Эти факты дают новые теоретические объяснения взаимосвязи метаболизма костной и иммунной системы, а также могут предложить новые перспективные решения профилактики и лечения патологической потери костной массы.

Для диагностики текущего состояния пародонта актуален анализ различных соединений жидкости десневой борозды. В их числе – цитокиновый профиль. Так, при пародонтите

в пародонте может быть обнаружено более 36 цитокинов: IL-8, IL-16, TGF- β 2, TNF β , интерферон-индуцируемый белок-10, ангиогенин, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), инсулиноподобный фактор роста, связывающий белок-3, остеопротегерин, эпидермальный фактор роста, глиальный нейротрофический фактор, онкостатин М, фактор роста фибробластов-4, плацентарный фактор роста и многие другие. Результаты показывают, что количественная оценка этих цитокинов в зубодесневой жидкости дает полезную информацию для диагностики состояния пародонта [8].

Существуют данные об использовании в стоматологии тромбоцитарного геля – продукта крови, предназначенного для переливания с лечебной целью и произведенного путем объединения тромбоконцентрата с криопреципитатом [3]. Тромбоцитарный гель стимулирует рост тканей, так как в α -гранулах тромбоцитов содержатся многочисленные факторы роста (PDGF, TGF- β , IGF-1, IGF-2, EGF, VEGF, FGF). Его применение в челюстно-лицевой хирургии является общепризнанным и хорошо описано в литературе последних лет. Используется этот биоматериал, в частности, для полостей с диаметром > 2 см, так как он обладает остеогенными, остеоиндуктивными, остеокондуктивными свойствами. Однако существуют ограничения на его использование, связанные как с донорскими, так и физико-химическими характеристиками, влияющими на восстановление костной ткани [1].

Другие исследования последних лет говорят об эффективности тромбоцитарного фактора роста (ТВР), фактора роста фибробластов и других ростовых факторов, стимулирующих регенерацию пародонта [2].

Несмотря на разрешение применения ТФР в стоматологии, рандомизированные исследования сообщают о противоречивых результатах. Тем не менее метаанализ известных данных показал, что тромбоцитарный фактор роста и фактор роста фибробластов могут использоваться в клинической практике пародонтологии [5].

Таким образом, можно говорить о пародонтите как хроническом воспалительном заболевании сосудистой ткани зубов, в котором ангиогенез является важным процессом патогенеза. Ангиогенез способствует развитию воспаления, и образование новых кровеносных сосудов увеличивает потенциал производства цитокинов, молекул адгезии и других факторов воспаления. Эту экспрессию VEGF могут индуцировать IL-1 β и TNF α . С другой стороны, VEGF, вероятно, сам является этиологическим фактором гингивита и прогрессирования пародонтита, инициируя расширение сосудистой сети на участках активного воспаления пародонта, что, в свою очередь,

может быть вызвано увеличением концентрации IL-1 β [4].

Итак, ряд цитокинов и факторов роста участвуют в регулировании ангиогенеза, но VEGF является самым мощным агентом, действующим непосредственно на эндотелий сосудов, индуцирующим проницаемость жидкости и белков в 50 000 раз больше, чем гистамин. При этом VEGF играет двоякую роль в поддержании как здоровья пародонта, так и хронических воспалительных заболеваний пародонта [7]. VEGF обнаруживается в слюне и эндотелиальных клетках пародонта, что позволяет использовать его как диагностический маркер воспаления.

Целью работы стала разработка применения фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в пародонтологии и поиск лабораторных маркеров эффективности терапии пародонтита.

Материалы и методы

Обследовано 19 человек в возрасте 53–79 лет с пародонтитом I степени (6 ч.) и II степени (13 ч.). В пародонтальной терапии пациентов применялся препарат «Ребон. Гель для десен» (ООО «ДжиЭф Групп», Россия). Препарат представляет собой комплекс биорезорбируемых углеводов на основе карбоксиметилцеллюлозы, формирующей клеточную основу, аналогичную экстраклеточному матриксу зубодесневого кармана. Содержит соли натрия, калия, фосфора, хлора для обеспечения баланса рН тканей и рекомбинантный гликозилированный полипептид, идентичный фактору роста эндотелия сосудов человека.

Критериями исключения из группы, получающей этот препарат, стали курение, алкоголизм, ревматоидный артрит, онкологические заболевания, острый генерализованный пародонтит, длительное применение противовоспалительных и антибиотических медикаментов. От пациентов получено письменное информированное согласие.

Оценка состояния пародонта проводилась по стандартным клиническим критериям, включавшим в себя подвижность зубов, размер зубодесневого кармана. Плотность костной ткани оценивалась по данным периапикальной рентгенограммы.

После проведения осмотра и оценки состояния пародонта бралась проба зубодесневой жидкости бумажным пародонтальным штифтом. Время экспозиции штифта в пародонтальном кармане составляло 5 минут. После чего штифт помещался в 1 мл 0,9% изотонического раствора NaCl. Проба замораживалась при -70 °С.

После взятия пробы *ex tempore* готовился препарат «Ребон. Гель для десен». 1 мл геля при по-

мощи 2 мл шприца с обрезанным кончиком иглы переносили в лиофилизат. После растворения препарат с помощью этого же шприца вводили в пародонтальный карман на 3/4 глубины. Далее пациенты приходили на контрольный осмотр спустя 1, 2, 7 суток. Через 14 дней из пародонтального кармана бралась контрольная проба

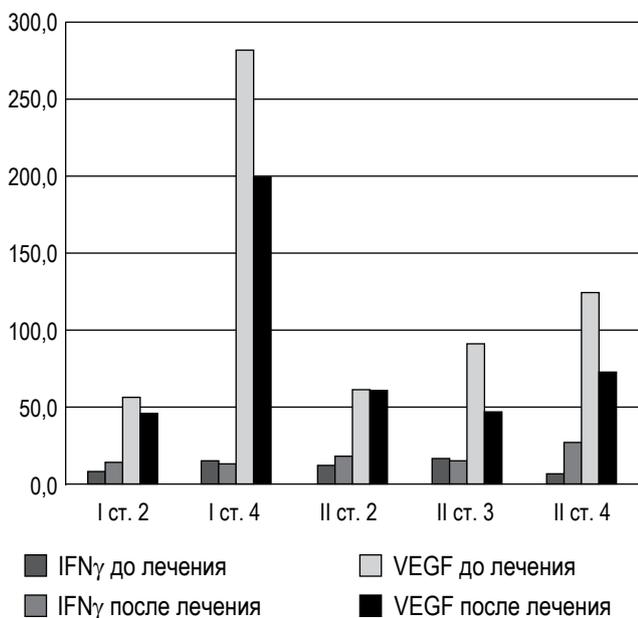


Рисунок 2. Динамика IFN γ и VEGF в зависимости от степени пародонтита и количества удаленных по показаниям зубов

Figure 2. The dynamics of IFN γ and VEGF, depending on the degree of periodontitis and the number of remote according to the testimony of the teeth

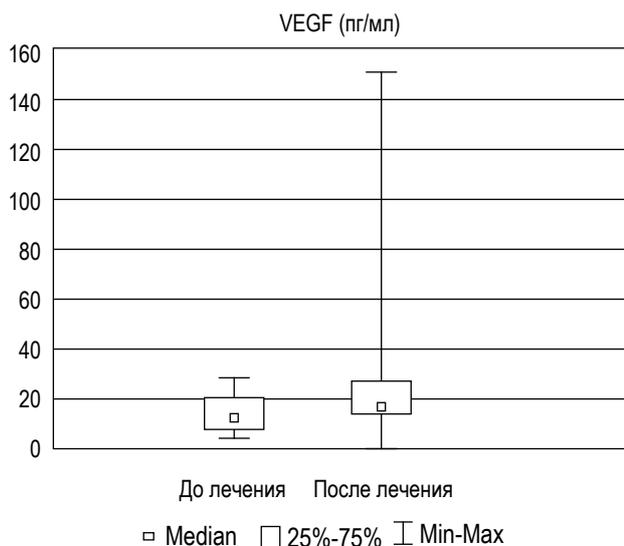


Рисунок 3. Динамика IFN γ до и после терапии VEGF при пародонтите

Figure 3. IFN γ dynamics before and after VEGF therapy in parodontitis

зубодесневой жидкости по вышеописанной методике.

В пробе зубодесневой жидкости определяли фактор роста эндотелия сосудов человека, изоформа А-165 (ООО «СайСторЛаб», Россия) и IFN γ (АО «Вектор-Бест», Россия) иммуноферментным методом.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft, США). В качестве критерия достоверности использовали статистический параметр Манна–Уитни, а также Краскела–Уоллиса. Достоверными принимались значения при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

После применения препарата было отмечено снижение болевого синдрома всеми нашими пациентами. Наблюдение состояния полости рта показало хорошую динамику эпителизации, значительное ускорение процессов заживления в мягких тканях и ускорение регенерации костной ткани (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки).

В зависимости от степени пародонтита и количества удаленных по показаниям зубов была получена следующая картина динамики IFN γ и VEGF (рис. 2).

Полученные данные показали общую закономерность в росте уровня IFN γ и снижения уровня VEGF в зубодесневом кармане после проведенного лечения. Другой выявленной тенденцией стал рост концентрации VEGF в зависимости от тяжести течения заболевания и неблагоприятный прогноз сохранения зубов.

В силу малого объема полученных данных достоверно значимых различий при таком делении на группы выявлено не было, потому все полученные данные были объединены и сравнены до и после лечения.

После лечения уровень IFN γ возрос с 14,48 до 27,45 пг/мл. Хотя диапазон значений после лечения был существенным, различия в группе до и после лечения были значимыми, $p = 0,022$ (рис. 3).

Также полученные данные были рассмотрены с возрастной точки зрения на пациентов. Для этого пациенты были разбиты на три возрастные группы: 40-е (7 чел.), 50-е (9 чел.), 60-е годы (3 чел.) рождения. Хотя статистически достоверных различий по IFN γ между этими группами пациентов выявлено не было по причине малого объема выборки, на себя обратил внимание следующий факт. До лечения в группах 60- и 70-летних пациентов средние значения IFN γ колебались в диапазоне 5-20 пг/мл, что сопоставимо с диапазоном 0-14 пг/мл в периферической крови у пациентов

без патологии. После лечения разброс значений в этих группах стал выше, при этом уровень средних значений также вырос и составил для 70-летних – 14,4 пг/мл, для 60-летних – 24,3 пг/мл. У 50-летних пациентов уровень $IFN\gamma$ до лечения составил 27,3 пг/мл, а после лечения – 26,3 пг/мл. Хотя нужно отметить, что в целом основной диапазон значений не превышал 30 пг/мл. Можно предположить, что для пациентов старше 60 лет терапевтическое воздействие VEGF будет выше. Полагаем, связано это с тем, что такой концентрации $IFN\gamma$ как фактора воспаления достаточно для существенной элиминации патогенной микрофлоры. С другой стороны, такой уровень провоспалительных факторов не будет стимулировать резорбцию костной ткани.

Полагаем также, что положительная динамика $IFN\gamma$ в терапии связана со следующими фактами. Современная интерферонотерапия сосредоточена на применении $IFN\ \alpha/\beta$ при вирусных инфекциях: гриппа, герпеса, ВИЧ, гепатитов. А накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что отдельные подтипы интерферонов обладают дифференциальной эффективностью в активации противовирусных механизмов [8]. И хотя исследования последних лет говорят об участии в развитии пародонтита вирусного компонента, в частности вируса Эпштейна–Барр, превалирующее значение в этой патологии имеет бактериальная пародонтогенная анаэробная микрофлора [9].

Подавляющее большинство современных публикаций говорит об исследовании уровня $IFN\gamma$ в периферической крови [10]. Но тогда этот показатель следует оценивать как системный. В нашем исследовании мы предлагаем использовать $IFN\gamma$ как показатель местного иммунного ответа. Таким образом, существует возможность использования уровня $IFN\gamma$ в пародонтальном экссудате как дополнительного лабораторного показателя местного воспаления, как прогностического маркера заболевания и контрольного показателя терапии фактором роста эндотелия.

Исследование уровня VEGF до и после терапии комплексом стволовых факторов также показали большой разброс от 26-279,3 пг/мл до лечения и 16-198,2 пг/мл после лечения (рис. 4).

Исследования различных авторов связи экспрессии VEGF и васкуляризации с учетом количества и диаметра кровеносных сосудов говорят, что рост VEGF может быть в большей степени отнесен к процессу исцеления пародонтоза, чем разрушения костной ткани [4, 7]. Эти исследования показали, что средний уровень VEGF увеличивается после лечения и снижается через 3 мес. Однако при сравнении изменений средних

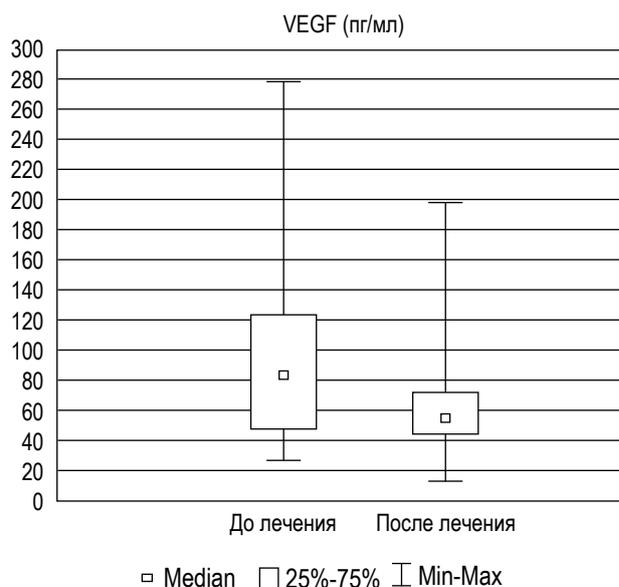


Рисунок 4. Динамика VEGF до и после терапии VEGF при пародонтите

Figure 3. VEGF dynamics before and after VEGF therapy in parodontitis

уровней VEGF от исходного уровня статистически значимых изменений в этих наблюдениях не было. Это может свидетельствовать о длительной продукции провоспалительных цитокинов после хирургического вмешательства. Что, в свою очередь, оказывает влияние на длительное заживление раны после хирургического вмешательства. Некоторые исследователи связывают это только с хирургическим или нехирургическим способом лечения пародонтита, что может быть связано с множеством факторов: активностью воспаления, величиной рецессии десны, кровоточивостью десны, глубиной зондирования десны (4-6 мм или ≥ 7 мм) [6].

Исследования других зарубежных авторов показывают, что средняя концентрация VEGF в зубодесневой жидкости при хроническом периодонтите наоборот снижается после лечения и составляет до лечения $99,375 \pm 37,979$ пг/мл, а в группе со здоровым состоянием пародонта и отсутствием клинических проявлений заболеваний – $42,025 \pm 4,669$ пг/мл. И в этих же исследованиях средняя концентрация VEGF в группе пролеченных с пародонтитом ($54,6 \pm 10,085$ пг/мл) была промежуточной между здоровым пародонтом и пародонтитом [7]. Таким образом, наши данные о VEGF в зубодесневой жидкости согласуются с данными авторов, показавшими снижение концентрации эндотелиального фактора роста.

Выводы

Для диагностики текущего состояния пародонта актуален анализ различных соединений жидкости десневой борозды, а разработанный диагностический подход на основе скрининга и мониторинга уровня $IFN\gamma$ и VEGF помогает эффективнее проводить лечение.

Введение в терапию комплекса карбоксиметилцеллюлозы с фактором роста эндотелия сосу-

дов ускоряет процессы эпителизации и регенерации соединительной и костной ткани.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность руководителю НИМСИ Цареву В.Н. и сотрудникам молекулярно-биологической лаборатории отдела фундаментальных исследований за оказание научно-практической помощи в проведении исследований.

Список литературы / References

1. Aljateeli M., Koticha T., Bashutski J., Sugai J.V., Braun T.M., Giannobile W.V., Hom-Lay W. Surgical periodontal therapy with and without initial scaling and root planning in the management of chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *J. Clin. Periodontol.*, 2014, Vol. 41, no. 7, pp. 693-700
2. Cooke J.W., Sarment D.P., Whitesman L.A., Miller S.E., Jin Q., Lynch S.E., Giannobile W.V. Effect of rhPDGF-BB delivery on mediators of periodontal wound repair. *Tissue Engineering*, 2006, no. 12, pp. 1441-1450.
3. Dominijanni A., Cristofaro M.G., Brescia A., Giudice M. Platelet gel in oral and maxillofacial surgery: a single-centre experience. *Blood Transfus.*, 2012, Vol. 10, no. 2, pp. 200-204.
4. Johnson R.B., Serio F.G., Dai X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal diseases. *J. periodontol.*, 1999, Vol. 70, no. 8, pp. 848-852.
5. Li F., Yu F., Xu X., Li C., Huang D., Zhou X., Ye L., Zheng L. Evaluation of recombinant human FGF-2 and PDGF-BB in periodontal regeneration: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.*, 2017, no. 7, p. 65.
6. Liu H., Luo T., Tan J., Li M., Guo J. Osteoimmunology offers new perspectives for the treatment of pathological bone loss. *Curr. Pharm. Des.*, 2017, Vol. 23, no. 41, pp. 6272-6278.
7. Prapulla D.V., Sujatha P.B., Pradeep A.R. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. *J. Periodontol.*, 2007, Vol. 78, no. 9, pp. 1783-1787.
8. Sakai A., Ohshima M., Sugano N., Otsuka K., Ito K. Profiling the cytokines in gingival crevicular fluid using a cytokine antibody array. *J. Periodontol.*, 2006, Vol. 77, no. 5, pp. 856-864.
9. Teles R., Sakellari D., Teles F., Konstantinidis A., Kent R., Socransky S., Haffajee A. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease and the subgingival microbiota. *J. Periodontol.*, 2010, no. 81, pp. 89-98.
10. Zein Elabdeen H.R., Mustafa M., Ali R., Bolstad A.I. Cytokine profile in gingival crevicular fluid and plasma of patients with aggressive periodontitis. *Acta Odontol. Scand.*, 2017, Vol. 75, no. 8, pp. 616-622.

Авторы:

Мудров В.П. — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «9 Лечебно-диагностический центр» Министерства обороны РФ, Москва, Россия

Нелюбин В.Н. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, «Научно-исследовательский медикостоматологический институт МГМСУ им. Евдокимова», Москва, Россия

Воробьева Е.С. — к.м.н., младший научный сотрудник, ООО «ДжиЭф Групп», Москва, Россия

Лысюк Е.Ю. — к.м.н., старший научный сотрудник, ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

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

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

Иванов С.Ю. — д.м.н., член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой челюстно-лицевой хирургии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Mudrov V.P., PhD (Medicine), Doctor (Clinical Laboratory Diagnostics), 9th Medical-Diagnostic Centre, Moscow, Russian Federation

Nelyubin V.N., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Moscow State A.I. Evdokimov Medico-Stomatological University, Moscow, Russian Federation

Vorobieva E.S., PhD (Medicine), Junior Research Associate, GF group LLC, Moscow, Russian Federation

Lysiuk E. Yu., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Miandiev M.S., Research Fellow, First Moscow State I.M. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

Fomenkov I.S., Research Fellow, First Moscow State I.M. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

Ivanov S. Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Faciomaxilar Surgery, First Moscow State I.M. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 05.08.2017

Отправлена на доработку 25.09.2017

Принята к печати 13.10.2017

Received 05.08.2017

Revision received 25.09.2017

Accepted 13.10.2017

IX ВСЕРОССИЙСКАЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ» 28 ЯНВАРЯ – 3 ФЕВРАЛЯ 2018 г.



IX Всероссийская с международным участием школа-конференция по клинической иммунологии «Иммунология для врачей» прошла 28 января – 3 февраля 2018 года в заповеднике «Пушкинские Горы» Псковской области и была посвящена проблемам иммунопрофилактики и иммунотерапии.

Школа проходила под эгидой Российской академии наук, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Министерства здравоохранения Российской Федерации и Правительства Санкт-Петербурга в лице Комитета по здравоохранению и Комитета по науке и высшей школе при поддержке Администрации Псковской области. Основными организаторами Школы выступили: Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Российское научное общество иммунологов, Российская Ассоциация Аллергологов и Клинических Иммунологов, Российское цитокиновое общество, Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины», Санкт-Петербургское региональное отделение Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов. Председатели оргкомитета: академики РАН Черешнев Валерий Александрович (Екатеринбург) и Тотолян Арег Артемович (директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург); заместители председателей: академик РАН Хаитов Рахим Мусаевич (Москва) и академик РАН Козлов Владимир Александрович (Новосибирск); координаторы научной программы: член-корреспондент РАН Фрейдлин Ирина Соломоновна (Санкт-Петербург) и профессор Козлов Иван Генрихович (Москва).

На церемонии торжественного открытия было отмечено, что Школа традиционно проводится под эгидой Российской академии наук, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Министерства здравоохранения РФ при поддержке профессиональных

организаций: Российского научного общества иммунологов и Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов. После приветствий первого заместителя губернатора Псковской области Емельяновой Веры Васильевны, председателя Комитета по здравоохранению администрации Псковской области Потапов Игоря Ивановича и администрации Пушкиногорского района, академик РАН Черешнев Валерий Александрович (Екатеринбург) выступил с лекцией «Пауль Эрлих и Илья Мечников: к 110-летию присуждения Нобелевской премии».

В рамках первого дня после торжественного открытия прозвучали доклады академика РАН Козлова Владимира Александровича (Новосибирск) «Иммунная парадигма основных заболеваний современного человека»; профессора Козлова Ивана Генриховича (Москва) «Теоретическая основа иммуномодуляции: переключатели иммунных ответов»; член-корреспондента РАН Симбирцева Андрея Семеновича (Санкт-Петербург) «Цитокиновая и антицитокиновая терапия»; академика РАН Тотояна Арега Артемовича (Санкт-Петербург) «Хемокиновая и антихемокиновая терапия»; академика РАН Черешнева Валерия Александровича, профессора Черешневой М.В., член-корреспондента РАН Юшкова Б.Г., профессора Гавриловой Т.В. (Екатеринбург) «Система иммунитета с точки зрения функциональной физиологии П.К. Анохина»; профессора Гариба Фируза Юсуфовича, д.б.н. Ризопулу Анны Панаётисовны (Москва) «Формирование иммунной памяти – основа вакцинации»; член-корреспондента РАН Суворова Александра Николаевича (Санкт-Петербург) «Новые подходы к конструированию вакцин против бактериальных и вирусных инфекций»; к.м.н. Васильева Юрия Михайловича (Санкт-Петербург) «Иммунопрофилактика гриппа: когда появится следующее поколение вакцин?»; профессора Пинегина Бориса Владимировича, Пашенкова М.В. (Москва) «Механизм действия и клиническое применение мурамилпептидов»; академика РАН Караулова Александра Викторовича (Москва) «Клинические рекомендации по иммуномодулирующей терапии инфекционных заболеваний».

В последующие дни на Школе обсуждались клеточные технологии (академик РАН Козлов В.А.); микробные технологии (член-корреспондент РАН Суворов А.Н.); патомеханизмы аллергии и молекулярная аллергия (к.м.н. Рудольф Валента, Вена, Австрия); практическая аллергия и новые направления АСИТ (к.м.н. Раффаэла Кампана, Вена, Австрия).

Сложная и многогранная проблема иммунотерапии при иммунодефицитных состояниях была детально обсуждена в лекциях профессора Козлова Ивана Генриховича (Москва); к.м.н. Фоминой Дарьи Сергеевны (Москва); к.ф.н. Серпик Вячеслава Геннадьевича (Москва); к.м.н. Кузнецовой Раисы Николаевны (Санкт-Петербург); к.м.н. Корсунского Ильи Анатольевича (Москва); профессора Латышевой Татьяны Васильевны (Москва); профессора Продеуса Андрея Петровича (Москва); профессора Кондратенко Ирины Вадимовны (Москва); Гусевой Марины Николаевны (Санкт-Петербург).

Иммунопатогенез, диагностика и терапия первичных иммунодефицитов обсуждались на симпозиумах компаний «SHIRE» и «CSL BEHRING».

Лабораторным технологиям, которые применяются в том числе для мониторинга и оценки течения инфекционных процессов, были посвящены симпозиум и мастер-классы компании «Бекман Культер».

Необходимо отметить, что все лекции сопровождалась очень активными дискуссиями. Эти дискуссии не обошлись без острых столкновений мнений участников.

Школа вполне оправдала название Всероссийской с международным участием, т. к. в ее работе приняли участие 136 представителей из Австрии (Вена), Казахстана (Астана), Грузии (Тбилиси), Беларуси (Могилев), Израиля (Тель-Авив), Узбекистана (Ташкент), а также из 22 региона Российской Федерации: Абакана, Архангельска, Великого Новгорода, Екатеринбурга, Калининграда, Красноярска, Москвы, Набережных Челны, Нижневартовска, Новосибирска, Перми, Санкт-Петербурга, Саратова, Сочи, Ставрополя, Сыктывкара, Уфы, Хабаровска, Челябинска, Читы.

Многие участники отмечали теплую, дружескую атмосферу Школы, на которой интересная лекционная программа сочеталась с не менее полезной культурной программой, включавшей экскурсию в Михайловское, Тригорское, Петровское, Дом Сергея Довлатова в Березино, Святогорский монастырь. О доброжелательной и неформальной обстановке, царившей на Школе, может свидетельствовать и та добрая ирония, которая звучит в публикуемом нами восьмом томе «Конспектов лекций», составленном лекторами Школы: профессором Семикиной Еленой Леонидовной и д.м.н. Топтыгиной Анной Павловной. На церемонии закрытия Школы прозвучало много слов благодарности, а также и обоснованные пожелания в адрес Оргкомитета, которые будут учтены при подготовке очередной Школы.

Оргкомитет считает своим приятным долгом от имени всех участников Школы выразить особую благодарность Администрации Псковской области и Пушкиногорского района, стратегическому партнеру – компании «ПетроваксФарм», Генеральным спонсорам – компаниям «КЕДРИОН БиоФарма», «Бекман Культер, а также всем официальным спонсорам, финансовая поддержка которых сделала возможной организацию и проведение Школы.

Конспекты лекций, составленные слушателями
IX Всероссийской школы по клинической иммунологии
«Иммунология для врачей»
28 января – 3 февраля 2018 г.
Семикиной Е.Л. и Топтыгиной А.П.

Дела давно минувших дней,
Преданья старины наивной:
Вот земский доктор – друг людей –
Прием ведет консультативный.

Заходит дева в кабинет,
Слеза туманит взор прекрасный.
– Ах, доктор, мне спасенья нет,
Всю жизнь лечилась я напрасно,

*Артрит, колит и гайморит –
Такая страшная картина!
А вдруг иммунодефицит?
Я знаю – мне нужна вакцина!*

Врач предложил АКДС,
От гриппа новую вакцину,
Биотехнологический прогресс
Улучшил сильно медицину!

Но дева головой качала,
Подходы прежние браня,
И равнодушно отвечала:
– Сие старьё не для меня!

*Найди хотя бы препарат
Новейший генно-инженерный,
Чтобы лечил он все подряд,
Вот это будет способ верный!*

Тут доктор тихо загрустил,
Услышав девы злой укоры,

Но руки он не опустил,
На школу двинулся в Пушгоры!

Там изучал патогенез,
Проточники и цитокины,
Иммунных клеток темный лес
И современные вакцины.

Узнал он, что всего сильней
От гриппа, коклюша и СПИДа,
От аллергии, от соплей,
От вшей, поноса и СХУИДа.

Вернулся – дева тут как тут:
– Ах, доктор, я изнемогаю.
Таблеток съела целый пуд,
И ничего не помогает!

*Ах, доктор, дайте мне вакцину
От ЧБД и от глистов,
Хочу иммуноглобулину
От вирусов и дураков.*

Тут начал доктор бормотать:
Интерфероны или МАБы?
Должно же что-то помогать
От этой сумасшедшей бабы?

Пускай наука нас рассудит,
Но наш вердикт, увы, таков:
Что самым популярным будет
Блокатор выноса мозгов!

Параграф первый КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Владимир Александрович Козлов постулирует:
«Врач должен знать все, что знает больной, и должен уметь поставить диагноз клетке».

Иван Генрихович Козлов сомневается: «Эти люди занимались иммунотерапией, ничего не зная про иммунитет».

Александр Викторович Караулов возражает:
«Это не так, как некоторые выписывают незнамо чего и не знают, зачем они это делают».

Валерий Александрович Черешнев помнит,
как «хотели малярию лечить метиленовой синькой».

Иван Генрихович Козлов призывает: «От экзотики пойдем к тому, с чем стандартный доктор встречается в своем кабинете».

Фируз Юсуфович Гариб замечает, что «утром чихают на нас, вечером мы чихаем на окружающих...»

Илья Анатольевич Корсунский сомневается:
«Если мы очень быстро поставим диагноз и очень быстро начнем правильное лечение, что мало вероятно...»

Иван Генрихович Козлов призывает: «Назначение любого препарата мы должны взвесить головой».

Ирина Александровна Тузанкина уверена: «Хочешь – не хочешь, а думать придется...».

Иван Генрихович Козлов замечает: «Некоторые препараты имеют свойство мигрировать и линять из одной группы в другую».

Александр Викторович Караулов знает: «В каждой из этих подгрупп есть реально действующие препараты».

Иван Генрихович Козлов уверен: «Мы сделали препарат, который обязательно всем поможет».

Елена Леонидовна Семикина сокрушается:
«Очень долго называть его правильное торжественное название».

Валерий Александрович Черешнев предостерегает: «Доза холерика — для меланхолика паралич».

Иван Генрихович Козлов напоминает: «Препарат без побочных эффектов вызывает массу вопросов».

Александр Викторович Караулов радуется: «Общеизвестно, что они расширяют, усиливают и дают потенциал».

Ирина Александровна Тузанкина осторожничают: «Говоря про индукторы — было бы что индуцировать...»

Татьяна Германовна Федоскова согласна: «Может, и не знаем, но лечим, и главное — есть эффект».

Иван Генрихович Козлов постулирует: «Мы — страна псевдоженериков».

Анна Павловна Топтыгина наблюдает: «И вот эта козявочка — этот аспирин и есть».

Андрей Петрович Продеус пропагандирует: «Наша таблетка самая розовая и самая круглая».

Иван Генрихович Козлов уверен: «Подъязычный путь введения — классный для всего, кроме высокомолекулярщины».

Александр Николаевич Суворов соглашается: «Фекальная трансплантация сейчас на пике».

Иван Генрихович Козлов делится опытом: «Я никогда не работаю без дегустации...»

Татьяна Германовна Федоскова рекомендует: «Надо посмотреть кровь и мочу хотя бы на расстоянии».

Илья Анатольевич Корсунский гарантирует: «Я прям вот что хотите — зуб даю, что они были здоровы... на момент анализа».

Александр Викторович Караулов подводит итог: «Если ты здоров — можно принимать иммуномодулятор, если болен — нужно подумать».

Параграф второй МЕТОДОЛОГИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Валерий Александрович Черешнев начинает с истории: «Никто не знал, сколько языков они знают. Плюс древнегреческий и древне-древнегреческий».

Борис Владимирович Пинегин ставит перед фактом: «Я буду говорить по-русски».

Иван Генрихович Козлов формулирует: «Мы не можем поставить задачу, но ее в принципе нельзя поставить».

Валерий Александрович Черешнев не согласен: «Главная задача — раздражать цитокиновые гены».

Иван Генрихович Козлов не уступает: «Я начну все немного запутывать, потому что это моя задача».

Александр Викторович Караулов сообщает: «Помимо чужих мыслей иногда приходят и свои, редко, но бывает».

Иван Генрихович Козлов радуется: «Я это в двух словах украду у него, потому что я первый».

Валерий Александрович Черешнев наблюдает: «Ниоткуда не черпал идеи — все из книг и журналов».

Александр Перельман считает: «Сто лет назад этим занимался Лысенко, а сейчас мы к этому возвращаемся, и называется это эпигенетика...»

Валерий Александрович Черешнев предлагает: «Прочистить, обновить, запустить — и все опять пошло».

Валерий Павлович Савицкий сомневается: «Беда или сущность простого подхода в том, что его недостаточно».

Александр Перельман не сомневается: «Простые вещи — те, которым невозможно дать определение».

Валерий Александрович Черешнев уверен: «Беспорядок — это самый порядок».

Александр Перельман замечает: «То, что эти два признака некорректны, мало кого волнует».

Иван Генрихович Козлов обобщает: «Никто не знал, что произойдет неприятность, но она всегда происходит».

Илья Анатольевич Корсунский радуется: «Но у нас нет, а точнее, есть правильная методика...»

Иван Генрихович Козлов поясняет: «Мы его ежеквартально заражаем этими штуками, а потом радуемся: что это с ним такое происходит».

Андрей Семенович Симбирцев предостерегает: «Это пилотное исследование, никого не призываю это делать!»

Владимир Александрович Козлов задает вопрос Гарибу: «Что на чего как влияет — первичный на вторичный или вторичный на первичный?»

Фируз Юсуфович Гариб отвечает: «Это классическая иммунология (нас этому учат), но есть еще фактическая иммунология».

Борис Владимирович Пинегин признается: «Я не буду это подробно рассказывать, потому что сам не до конца понимаю».

Елена Леонидовна Семикина предлагает: «Вот на этом месте нужно сделать глубокий вздох, потому что работа идет, но...»

Валерий Александрович Черешнев вспоминает: «Он читал лекции. Не потому, что был профессором, — ему это нравилось».

Юрий Владимирович Никитин формулирует: «Как нельзя лучшим, а точнее, идеальным способом является проточная цитометрия».

Илья Анатольевич Корсунский рассуждает: «Я не говорю плохо про проточную цитометрию, я говорю не очень хорошо про ту первичную панель, которую мы обычно используем».

Игорь Владимирович Кудрявцев призывает: «Никогда не забывайте тратить время на позитивные контроли».

Борис Владимирович Пинегин опасается: «Эта работа из Индии, но все-таки можно верить, я думаю...»

Елена Леонидовна Семикина наблюдает: «Посмотрев на эту хорошо изученную область, ход мыслей оказался не слишком радостным».

Андрей Петрович Продеус делает вывод: «Хреново сделанный дизайн — получишь хреновые доказательства».

Ирина Александровна Тузанкина поддерживает: «А потом надо уже включать голову...»

Александр Перельман подводит итог: «Отсутствие процесса — один продукт, присутствие процесса — другой продукт...»

Параграф третий ОРГЗДРАВ

Илья Анатольевич Корсунский призывает: «Если немножко отвлечься от медицины и поговорить про организацию здравоохранения...»

Андрей Петрович Продеус точно знает: «Сидят там особенные психи, которым совсем делать нечего».

Илья Анатольевич Корсунский надеется: «Большинство терапевтов и педиатров все-таки грамотные...»

Ирина Вадимовна Нестерова сокрушается: «Маленький наш пациент не может редко болеть...»

Иван Генрихович Козлов наблюдает: «ЧБДЭшники есть и у нас и у них...»

Андрей Петрович Продеус размышляет: «Когда мы говорим ОРЗ, мы не знаем, чем они заболеют».

Татьяна Германовна Федоскова сообщает: «Никто не запрещает нашим пациентам болеть ОРЗ, и они это с удовольствием делают».

Юрий Владимирович Никитин огорчается: «У нас, к сожалению, процветает некоторая гемопатия».

Владимир Александрович Козлов призывает: «Изменить отношение врачей и теоретиков к этой медицине».

Иван Генрихович Козлов знает причину: «Потому что ему надо кормить население этими лекарствами за счет этого самого населения».

Фируз Юсуфович Гариб радуется: «Человечество воспряло духом, и показалось на время, что мы можем всё».

Илья Анатольевич Корсунский предлагает «делать десять заболеваний по закону и еще несколько по собственной инициативе...»

Сусанна Михайловна Харит поддерживает: «Десять инъекций можно сделать сразу, если выдержит сердце матери».

Арег Артемович Тотолян замечает: «Есть у нас один товарищ, который всех иммунологов делит на профессиональных и непрофессиональных».

Илья Анатольевич Корсунский наблюдает: «Это разделы, которые дублируют друг друга, но не дублируют друг друга...»

Арег Артемович Тотолян призывает: «Я прошу не уходить, а то не будете знать, как жить дальше».

Владимир Александрович Козлов предлагает: «Я бы в Думе это большими буквами по всем кабинетам раз-это-самое...»

Иван Генрихович Козлов комментирует: «Иногда я молчу, но молчу очень выразительно...»

Илья Анатольевич Корсунский радуется: «О чем говорят эти данные? О том, что мы молодцы...»

Владимир Александрович Козлов резюмирует: «Это будет одно из будущих, которое будет дальше».

Параграф четвертый ЗООСАД

Арег Артемович Тотолян уверен: «Бактерии — наши друзья, с которыми мы идем рука об руку».

Валерий Александрович Черешнев наблюдает: «Пока мы лечим бактерии — вирусы процветают».

Юрий Михайлович Васильев добавляет: «У человека, у свиней и у животных».

Татьяна Германовна Федоскова обнаруживает «молекулы говядины, крольчатины и крокодилятины».

Фируз Юсуфович Гариб наблюдает: «Бруцелла и легионелла — две подружки — позволили быть съеденными макрофагами».

Валерий Александрович Черешнев поясняет: «Это брат и сестра — трипаносома и спирохета».

Фируз Юсуфович Гариб заключает: «Макрофаги стали троянским конем, в котором выживают микобактерии туберкулеза».

Валерий Александрович Черешнев уточняет: «Трипаносома — клетка с хвостиком».

Ирина Вадимовна Кондратенко интересуется: «Что же делает иммуноглобулин за счет своего хвостика?»

Юрий Михайлович Васильев наблюдает «... группы животных — свиней и свиного происхождения».

Анна Павловна Топтыгина знает: «Вот это тот самый зверь — мышь».

Игорь Владимирович Кудрявцев волнуется: «Люди — не мыши!»

Анна Павловна Топтыгина предлагает: «И если немного по-генно-инженерить с этой мышью...»

Валерий Александрович Черешнев знает: «Как организм мобилизуется и что из этого получается? Три кита».

Оксана Анатольевна Свитич подводит итог: «Сейчас это, возможно, модно и даже, наверное, правильно».

Параграф пятый УЖАСЫ НАШЕГО ГОРОДКА

Иван Генрихович Козлов рассуждает: «В любой истории есть сказка и есть миф».

Валерий Александрович Черешнев пугает: «Маленького своего племянника затаскивал в лабораторию».

Александр Николаевич Суворов согласен: «Дети являются самой удобной мишенью».

Илья Анатольевич Корсунский наблюдает: «А вот те самые 57 % детей, которые — непонятно что...»

Иван Генрихович Козлов цитирует пациента: «Доктор, у меня что-то лимфоциты болят».

Татьяна Германовна Федоскова предполагает: «Это ребенковский анализ».

Александр Николаевич Суворов сокрушается: «Все сложнее тестировать донора... Его же в колумбарий не посадишь. Нужно, чтоб он водки не пил, кефир ему нельзя».

Владимир Александрович Козлов наблюдает: «Взросла цитотоксичность больного».

Фируз Юсуфович Гариб знает: «Некоторые микробы после того, как были съедены, захотели демократии».

Андрей Петрович Продеус объясняет: «Это не тогда, когда патоген пришел, это когда он разгулялся и нагулялся».

Ирина Александровна Пашнина видит: «Сепсис — это такой локомотив, который несется на всех парах...»

Игорь Владимирович Кудрявцев утешает: «Есть ранний апоптоз, есть поздний апоптоз, то есть все хорошо».

Иван Генрихович Козлов радуется: «Мы можем опсонизировать! Мы можем залепить бактерии глаза, уши, нос, и она просто задохнется».

Фируз Юсуфович Гариб одобряет: «Очень гуманно все происходит: ее сначала убивают, а потом разрушают».

Игорь Владимирович Кудрявцев подчеркивает: «Разные клетки погибают немножко по-разному».

Фируз Юсуфович Гариб заключает: «Здесь выбора нет — нужны киллеры».

Параграф шестой ИММУНОЛОГИЯ ЛИЧНОЙ ЖИЗНИ

Валерий Александрович Черешнев рассказывает: «Личная жизнь показывает ему, что комплементарность очень важна».

Иван Генрихович Козлов наблюдает: «Грам-плюс, которые доставляют массу удовольствия, и Грам-минус, которые доставляют массу удовольствия в кавычках».

Татьяна Германовна Федоскова призывает: «И надо продолжать их как-то иметь».

Александр Викторович Караулов советует: «Применять ректально, а можно и вагинально, это еще лучше».

Наталья Михайловна Калинина делится впечатлениями: «Женщины есть совершенно продвинутые в этом направлении...»

Иван Генрихович Козлов постулирует: «Иммунная система — шестой орган чувств».

Фируз Юсуфович Гариб уверен: «Если бы сказали „иммунитет женский“, солиднее бы звучало».

Законспектировали:

Семикина Елена Леонидовна: Москва, ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава РФ, заведующая ЦКДЛ; РНИМУ им. Н.И. Пирогова, профессор кафедры факультетской педиатрии, д.м.н.

Топтыгина Анна Павловна: Москва, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, лаборатория цитокинов, ведущий научный сотрудник, профессор кафедры иммунологии биологического факультета МГУ, д.м.н.

28 января — 03 февраля 2018 г., Псковская область, Пушкинские горы

Иван Генрихович Козлов наблюдает: «Урогенитальный тракт напрямую связан с глазом...»

Александр Викторович Караулов замечает: «Иногда, когда мы свечи вставляем в ненужное место, мы видим этот эффект».

Наталья Михайловна Калинина подводит итог: «В 34 % наступила беременность. Я не хочу сказать, что все это только полиоксидоний».

Параграф седьмой ИММУНОПСИХОЛОГИЯ

Иван Генрихович Козлов предупреждает: «Сейчас мы находимся в одном шаге от нового сумасшедшего дома».

Наталья Михайловна Калинина согласна: «И исходя все же из этого бреда...»

Владимир Александрович Козлов пугает: «Мы его не видим. Мы его не знаем. Мы его не можем оценить, есть только возможные намеки».

Оксана Анатольевна Свитич успокаивает: «У меня не столь жуткие варианты — психику я стараюсь сохранять».

Анна Павловна Топтыгина не успокаивается: «Я хочу немножко маслица в огонь подлить...»

Валерий Александрович Черешнев представляет себе: «Синее с красным — вдруг зеленое получается».

Оксана Анатольевна Свитич сомневается: «Такой спектр, что он немножко противоречит сам себе».

Анна Павловна Топтыгина медитирует: «В розовом цвете — это то, что хорошо из моих мыслей».

Татьяна Германовна Федоскова предостерегает: «Не надо трогать мое видение».

Валерий Александрович Черешнев определяет: «Мечты есть что-то вроде флюоресценции мозга».

Иван Генрихович Козлов наблюдает: «Мы с вами покрываемся замечательной светящейся аурой, которая защищает от всего».

Анна Павловна Топтыгина продолжает: «А вот эти облака — это мои сомнения на эту тему».

Иван Генрихович Козлов радуется: «Это здорово, это красиво, это скоро к нам придет и запутает нас совсем».

Андрей Петрович Продеус соглашается: «Мне, в общем, приходят разные такие штуки».

Татьяна Германовна Федоскова наблюдает: «Аллергологи — единственные люди, у которых весна начинается осенью, а осень — весной».

Иван Генрихович Козлов утешает: «После этого наступит сумасшедший дом и все успокоятся».

Как сказал Илья Анатольевич Корсунский: «Большое спасибо за то, что вы все это выслушали...»

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С апреля 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, №1. С. 64-69.

Varjushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbircev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69.

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с.

Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота – 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца – 82 мм, для 2 столбцов – 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т.е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
 - Телефон, факс с указанием кода страны и города), e-mail.
 - Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
 - Полное название статьи, направляемой в редакцию.
 - Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
 - Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
 - Дата отправления работы.
- 2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)
- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем – не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представится 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

Альшевская А.А.	353	Конопля А.И.	401	Останин А.А.	353
Апратин С.А.	341	Костоломова Е.Г.	373	Паульс В.Ю. I	373
Борисов А.Г.	431	Кравченко Ю.Е.	313	Пушкарев Б.С.	411
Буданова Е.В.	425	Крынский С.А.	303	Ратникова Н.М.	313
Быстрова Н.А.	401	Кудрявцев И.В.	431	Ригер Н.А.	341
Витковский Ю.А.	411	Курочкина Ю.Д.	353	Савченко А.А.	391, 431
Водолажский Д.И.	383	Куртасова Л.М.	391	Свитич О.А.	425
Воробьева Е.С.	439	Кутилин Д.С.	383	Сенников С.В.	353
Гаврилюк В.П.	401	Лапштаева А.В.	417	Ступак В.В.	353
Гмошинский И.В.	341	Лежнин Ю.Н.	313	Суховой Ю.Г.	373
Гольцова Е.Н.	373	Леплина О.Ю.	353	Сычев И.В.	417
Гольцов С.В.	373	Лопатникова Ю.А.	353	Толмачева Т.В.	391
Гончарова Л.Н.	417	Лысюк Е.Ю.	439	Тыринова Т.В.	353
Дидковский Н.А.	303	Малашенкова И.К.	303	Фоменков И.С.	439
Догалин С.А.	431	Мамошина М.В.	303	Фрейдлин И.С.	295
Дроздова Е.А.	365	Маньковский В.А.	431	Ханферьян Р.А.	341
Дудина М.А.	431	Мезенцева Е.А.	365	Хохлова Д.Ю.	365
Евстратова В.С.	341	Мишинов С.В.	353	Христинченко А.Ю.	313
Емельянов А.С.	411	Могушкова Х.А.	383	Чернов С.В.	353
Емельянова А.Н.	411	Мошев А.В.	431	Черных Е.Р.	353
Зверев В.В.	425	Мудров В.П.	439	Чумаков С.П.	313
Зуков Р.А.	391	Мяндиев М.С.	439	Шуленина Е.А.	425
Иванов С.Ю.	439	Назаров П.Г.	295	Шульгинова А.А.	401
Калиновский А.В.	353	Нелюбин В.Н.	439		
Караулов А.В.	401	Никушкина К.В.	365		
Кит О.И.	383	Олейник Е.А.	353		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адоптивная иммунотерапия.....	313	клиническая иммунология	295	трубно-перитонеальное	
активность ферментов	392	кожа	374	бесплодие.....	417
амилоид-бета	303	компоненты комплемента	401	фактор некроза	
биомаркеры	342	корреляция	342	опухоли альфа	354, 365, 411
болезнь Альцгеймера	303	криоконсервация	374	фактор роста эндотелия сосудов...	365
болезнь Грейвса	432	кровь	432	факторы роста	439
В-лимфоциты	432	лептин	342	фенотип	374
воспаление.....	303, 411	лечение	392	фундаментальная иммунология....	295
врожденный иммунитет.....	425	лимфоциты	392	химерные рецепторы.....	313
генетический полиморфизм ..	411, 417	метаболизм	392	хроническая ишемия мозга.....	401
гиперлипидемия.....	342	нейродегенерация	303	цитоиммунограмма	374
глиобластома	354	окклюзия вен сетчатки.....	365	цитокины.....	342, 401, 411, 439
глутоксим.....	401	пародонтит	439	экспрессия генов.....	383
грелин	342	пластический обмен.....	392	экстракорпоральное	
дендритные клетки.....	354	пневмония	425	оплодотворение.....	417
дендритноклеточные вакцины ..	313	почечно-клеточный рак.....	392	эндотелин-1	365
зубодесневая жидкость	439	проточная цитометрия.....	374	энергетические процессы	392
иммунные нарушения.....	401	рак молочной железы.....	383	АроЕ.....	303
иммунный ответ	303	раково-тестикулярные		IFN γ	439
иммунологическая диагностика ..	295	антигены	383	IL-1 α	417
иммунопатология.....	295	ранибизумаб	365	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	425
иммунотерапия	383	рожа	411	Real-Time qPCR.....	383
интерлейкин-6.....	365	субпопуляция	432	rs1800629	411
интерлейкин	365	Т-регуляторные клетки	432	TLR	425
интерферон-альфа	354	Т-хелперы	432	TNF-R1	354
клетки	374	терапевтические антитела.....	313	VEGF	439
клеточная иммунотерапия.....	313	ткань щитовидной железы.....	432		



Х Всероссийская школа по клинической иммунологии

«ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

Тематика «Инфекционная Иммунология»

3 – 9 февраля 2019 года

Пушкинские Горы, Псковская область

Организаторы:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Российская Академия Наук

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга
Администрация Псковской области

ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России
Институт экспериментальной медицины

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора
Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им.акад. И.П. Павлова

Российское научное общество иммунологов

Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов

Российское цитокиновое общество

Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»

Санкт-Петербургское региональное отделение Российской Ассоциации
Аллергологов и Клинических Иммунологов

В программе школы:

- Лекции ведущих российских иммунологов
- Лекции зарубежных специалистов
- Семинары по практическим вопросам иммунологии

Пакет слушателя включает:

- Посещение лекций и семинаров
- Проживание
- 3-разовое питание
- Ежедневная культурная программа
- Трансфер Псков – Пушкинские Горы и обратно

Всем слушателям будут выданы удостоверения о тематическом усовершенствовании установленного образца и зарегистрированные на сайте НМО www.sovetnmo.ru получают 12 зачетных единиц (кредитов) по специальности: «аллергология и иммунология» или «клиническая лабораторная диагностика»

Координатор проекта:

Председатель Правления СПб РО РААКИ, академик РАН, Тололян Арег Артемович

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

тел./факс: (812) 232-00-66

e-mail: totolian@spbraaci.ru

Заявки подавать до 1 декабря 2018 года.

Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна

Тел./факс: (812) 233-08-58

e-mail: shkola@spbraaci.ru

Адрес для корреспонденции: 197136, Санкт-Петербург, а/я 58, СПб РО РААКИ

www.spbraaci.ru

www.allergologi-immunologi.ru



ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

