

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

Том 20, № 4. С. 455-606

2018

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



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
- Ежедневную культурную программу
- 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



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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

июль-август

2018, том 20

№ 4

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@spb-rai.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 23.05.2018 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 19. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 619

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

199178, Санкт-Петербург, 8-я линия В.О., д.83, корп. 1, Литер А

Тел.: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

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

Халдоянни 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**

July-August

2018, volume 20

No. 4

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 23.05.2018. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 19. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

199178, Russian Federation, St. Petersburg, 8 line of V.O., 83/1-A

Phone: (812) 950-10-99

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

Юбилей.....	461
Обзоры	
Головкин А.С., Асадуллина И.А., Кудрявцев И.В. ПУРИНЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОСНОВНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ.....	463
Учасова Е.Г., Груздева О.В., Дылева Ю.А., Каретникова В.Н. ИНТЕРЛЕЙКИН-33 И ФИБРОЗ: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ПАТОГЕНЕЗ.....	477
Керкешко Г.О., Корневский А.В., Соколов Д.И., Сельков С.А. РОЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ ТРОФОБЛАСТА С КЛЕТКАМИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ЭНДОТЕЛИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРЕЭКЛАМПСИИ.....	485
Киселевский М.В., Анисимова Н.Ю., Должикова Ю.И., Власенко Р.Я., Сенатов Ф.С., Караулов А.В. РОЛЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ КОСТНОЙ ТКАНИ.....	515
Оригинальные статьи	
Назарова Е.Л., Сухорукова Э.Е., Минаева Н.В., Шардаков В.И., Фокина Е.С. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ FCR У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ НА ОСНОВАНИИ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ.....	523
Талаев В.Ю., Талаева М.В., Воронина Е.В., Заиченко И.Е. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЦИТОКИНОВ ЧЕЛОВЕКА ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА (sci-store.ru) ПРИ ПОЛУЧЕНИИ МОНОЦИТАРНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК.....	535
Устинникова О.Б., Голощапова Е.О., Рунова О.Б., Коротков М.Г., Волкова Р.А. РАЗРАБОТКА ПОРЯДКА АТТЕСТАЦИИ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА МЕТИОНИОВОЙ ФОРМЫ ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2b ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ МЕТОДОМ ПЕПТИДНОГО КАРТИРОВАНИЯ.....	543
Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Кудрявцев И.В., Медведев А.Ю., Гвоздев И.И., Мошев А.В. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И СОСТОЯНИЕ ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ДЕСТРУКТИВНЫМ ПАНКРЕАТИТОМ.....	551
Козлова Я.И., Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.Е., Аак О.В., Соловьева Г.И., Клишко Н.Н. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО БРОНХОЛЕГОЧНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ.....	561
Юрчинский В.Я. ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИОРГАННОГО СОСУДИСТОГО РУСЛА ТИМУСА В СРАВНИТЕЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОМ РЯДУ ПОЗВОНОЧНЫХ (CHORDATA, VERTEBRATA).....	571
Останин А.А., Давыдова М.Н., Старостина Н.М., Сахно Л.В., Шевела Е.Я., Черных Е.Р. ИНТРАНАЗАЛЬНЫЕ ИНГАЛЯЦИИ БИОАКТИВНЫХ ФАКТОРОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ М2-МАКРОФАГАМИ, В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С ОРГАНИЧЕСКИМИ ПОРАЖЕНИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....	577
Телесманич Н.Р., Коновальчик М.А., Микашинович З.И., Криволапова Э.Г. РЕАГИН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ НА УРОВЕНЬ ИНСУЛИНА ПРИ НАРУШЕНИЯХ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ГРУПП КРОВИ (В СИСТЕМЕ АВ0).....	589
Краткие сообщения	
Бержец В.М., Хлгатын С.В., Петрова С.Ю., Хрулева В.А., Ефремов М.А., Васильева А.В., Петрова Н.С., Акутина В.А. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ВОДНО-СОЛЕВОГО МИКСТ-АЛЛЕРГЕНА ИЗ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ СУБЛИНГВАЛЬНОЙ ФОРМЫ.....	597
Некролог.....	601
Правила для авторов.....	603
Авторский указатель.....	606
Предметный указатель.....	606

CONTENTS

Anniversary	461
--------------------------	-----

Reviews

<i>Golovkin A.S., Asadullina I.A., Kudryavtsev I.V.</i> PURINERGIC REGULATION OF BASIC PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL PROCESSES	463
<i>Uchasova E.G., Gruzdeva O.V., Dileva Yu.A., Karetnikova V.N.</i> INTERLEUKIN 33 AND FIBROSIS: PATHOGENESIS UPDATED	477
<i>Kerkeshko G.O., Korenevsky A.V., Sokolov D.I., Selkov S.A.</i> THE ROLE OF INTERACTIONS BETWEEN TROPHOBLAST-DERIVED EXTRACELLULAR MICROVESICLES, IMMUNE CELLS AND ENDOTHELIUM IN PATHOGENESIS OF PRE-ECLAMPSIA	485
<i>Kiselevsky M.V., Anisimova N.Yu., Dolzhikova Yu.I., Vlasenko R.Ya., Senatov F.S., Karaulov A.V.</i> ROLE OF MESENCHYMAL MULTI-POTENT STROMAL CELLS IN REMODELING OF BONE DEFECTS	515

Original articles

<i>Nazarova E.L., Sukhorukova E.E., Minaeva N.V., Shardakov V.I., Fokina E.S.</i> EVALUATION OF FCR THERAPY EFFICACY IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA BASED ON IMMUNOGENETIC CRITERIA	523
<i>Talayev V.Yu., Talayeva M.V., Voronina E.V., Zaichenko I.E.</i> EFFICIENCY EVALUATION OF THE HOME-PRODUCED RECOMBINANT HUMAN CYTOKINES FROM <i>the sci-store.ru</i> FOR GENERATION OF MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS	535
<i>Ustinnikova O.B., Goloshchapova E.O., Runova O.B., Korotkov M.G., Volkova R.A.</i> DEVELOPMENT OF A QUALIFICATION PROCEDURE FOR METHIONINE FORM OF INTERFERON ALFA-2b STANDARD TO CONFIRM ITS AUTHENTICITY BY MEANS OF A PEPTIDE MAPPING METHOD	543
<i>Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetskiy D.E., Kudryavtsev I.V., Medvedev A.Yu., Gvozdev I.I., Moshev A.V.</i> FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND HEMOSTASIS PATTERN IN PATIENTS WITH ACUTE DESTRUCTIVE PANCREATITIS	551
<i>Kozlova Ya.I., Frolova E.V., Filippova L.V., Uchevatkina A.E., Aak O.V., Solovyeva G.I., Klimko N.N.</i> DIAGNOSTIC MARKERS OF ALLERGIC BRONCHOPULMONARY ASPERGILLOSIS IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA	561
<i>Yurchinskiy V.Ya.</i> AGE-RELATED CHANGES OF VASCULAR BED WITHIN THYMUS GLAND IN MORPHOLOGICAL COMPARATIVE RANGE OF VERTEBRATE ANIMALS (<i>CHORDATA, VERTEBRATA</i>)	571
<i>Ostanin A.A., Davydova M.N., Starostina N.M., Sakhno L.V., Shevela E.Ya., Chernykh E.R.</i> INTRANASAL INHALATIONS OF BIOACTIVE FACTORS PRODUCED BY M2 MACROPHAGES IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH ORGANIC BRAIN SYNDROME	577
<i>Telesmanich N.R., Konvalchik M.A., Mikashinovich Z.I., Krivolapova E.G.</i> REAGIN-SPECIFIC RESPONSE TO INSULIN LEVEL IN CARBOHYDRATE METABOLISM DISORDERS IS DEPENDENT ON THE BLOOD GROUP ABO ANTIGENIC DETERMINANTS	589

Short communications

<i>Berzhets V.M., Khlgatian S.V., Petrova S.Yu., Khruleva V.A., Efremov M.A., Vasilyeva A.V., Petrova N.S., Akutina V.A.</i> STUDY OF THE PROPERTIES OF THE MIXED WATER/SALT HOUSE DUST MITE ALLERGEN AIMING TO DESIGN ITS SUBLINGUAL FORM	597
--	-----

Obituary	601
-----------------------	-----

Instructions to Authors	603
--------------------------------------	-----

Author index	606
---------------------------	-----

Subject index	606
----------------------------	-----

К 65-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АЛЕКСАНДРА ВИКТОРОВИЧА КАРАУЛОВА



11 мая 2018 года исполнилось 65 лет со дня рождения академика РАН Караулова Александра Викторовича. Вся научная деятельность А.В. Караулова связана с иммунологией. Он получил классическое иммунологическое образование, работал в ведущих иммунологических центрах, принимал деятельное участие в организации иммунологического сообщества в нашей стране.

После окончания аспирантуры Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР в 1979 году работал младшим, старшим научным сотрудником, с 1983 года — заведующим лабораторией иммунологии и руководителем исследовательского управления в системе Минмедпрома СССР, а с 1986 года — заведующим отделением клинической иммунологии Института прикладной молекулярной биологии МЗ СССР. Одновременно с 1983 года — научный руководитель по иммунологии ЦКБ IV ГУ при МЗ РСФСР. С 1988 года являлся заместителем директора по научной работе Института иммунологии, в котором проводил исследования в области клинической и экологической иммунологии и иммунологии ВИЧ-инфекции. Одновременно руководил популяционными исследованиями в рамках Всесоюзного Научного центра молекулярной диагностики и лечения, являясь главным научным сотрудником, а позднее и директором одного из институтов. В 1990 году А.В. Караулов организовал и возглавил кафедру клинической иммунологии и аллергологии в Первом МГМУ им. И.М. Сеченова, которой заведует до настоящего времени, а в 2018 году дополнительно и лабораторию иммунопатологии в рамках Проекта по повышению конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров «5-100».

Уже первые научные исследования А.В. Караулова выявили биологические характеристики различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, что позволило создать и внедрить оригинальную методологию оценки состояния иммунной системы человека и животных. В дальнейшем им получены данные о регуляции иммунных реакций в норме и при патологии человека и установлены новые клеточные и молекулярные механизмы вторичных иммунодефицитов. Работы последнего десятилетия посвящены исследованию механизмов мукозального иммунитета респираторного и урогенитального тракта, изучению иммунорегуляторной роли растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы человека, иммуномониторингу при применении лекарственных препаратов и клеточной терапии, созданию инновационных технологий диагностики и лечения иммунозависимых и аллергических заболеваний.

А.В. Караулов активно участвовал в реализации научно-технического сотрудничества с ведущими биомедицинскими центрами, работал в Институте Пастера в Париже в рамках программы ЮНЕСКО «Человек против вируса», в Тропическом центре, учился и успешно закончил Гарвардские курсы по менеджменту биомедицинских исследований, курсы ВОЗ по клиническим исследованиям, являлся активным участником и приглашенным лектором на международных форумах, школах и семинарах по иммунологии, редактировал международные журналы «Медикал Маркет» и «Практикующий врач». В настоящее время является заместителем главного редактора «Российского биотерапевтического журнала», членом редколлегий «Российского иммунологического журнала», журналов «Иммунология», International Archives of Allergy and Immunology, Molecular Medicine Reports, Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, «Цитокины и воспаление», «Молекулярная медицина», ЖМЭИ и «Иммунопатология. Аллергология. Инфектология».

А.В. Караулов проявил себя как активный ученый и педагог: он автор первых в России учебников, атласов и учебных пособий по клинической иммунологии, двадцати монографий, десяти патентов и двух открытий. Он опубликовал более 500 статей, включая 140 статей в журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus. Под его руководством защищено 17 докторских и 29 кандидатских диссертаций. Он является победителем открытого конкурса Совета ректоров медицинских вузов страны — «Лучший преподаватель медицинского вуза» в номинации «За подготовку научно-педагогических кадров». Является также членом Президиума общества иммунологов России, членом Европейской академии аллергологов и клинических иммунологов, отмечен золотой медалью Российского научного общества иммунологов «За выдающиеся достижения в области иммунологии» и ежегодной премией в сфере медицинского и фармацевтического образования в номинации «За лучшее учебное издание в 2015 году».

А.В. Караулов — заместитель председателя специализированного диссертационного совета, председатель Экспертного совета по медико-профилактическим наукам ВАК, руководитель научной школы по клинической иммунологии и онкоиммунологии, отмеченной Советом по грантам Президента РФ и грантами РФФИ. В 2016 году избран заместителем руководителя секции медико-биологических наук Медицинского отделения РАН, является экспертом РАН, РНФ, Минобрнауки, членом профильной комиссии по аллергологии и иммунологии Минздрава России, членом рабочей комиссии Минздрава России по подготовке научной платформы по иммунологии, членом секции по присуждению Премий Правительства в области науки и техники и главным внештатным консультантом по иммунологии ГМУ УД Президента РФ.

А.В. Караулов — председатель комиссии здравоохранения Российской ассоциации содействия ООН, в качестве советника и эксперта — член российских делегаций на Исполкомах, Генассамблеях, комитетах ВОЗ, активный участник международных форумов и съездов, являлся представителем стран Восточной Европы в комитете ВОЗ/ЮНФПА/ЮНИСЕФ. Является почетным профессором ряда университетов России, награжден медалью «За заслуги перед Первым МГМУ имени И.М. Сеченова».

Наиболее значимые результаты работы А.В. Караулова были отмечены на государственном уровне рядом правительственных наград, в числе которых звание «Заслуженный деятель науки РФ», медаль Ордена «За заслуги перед Отечеством 2 степени», орден Почета, а также медали и ведомственные награды. А.В. Караулов — лауреат премии Москвы в области медицины за 2009 год, премии Правительства Российской Федерации в области образования за 2012 год, премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники за 2017 год.

Редколлегия журнала «Медицинская иммунология» поздравляет Александра Викторовича с юбилеем и желает ему крепкого здоровья, счастья, долгих лет жизни, оптимизма, дальнейших творческих и трудовых успехов!

ПУРИНЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОСНОВНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Головкин А.С.¹, Асадуллина И.А.², Кудрявцев И.В.^{2,3}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В последние годы ведется активное изучение значимости пуринергического сигналинга в патогенезе широкого спектра заболеваний и патологических состояний, к числу которых относятся регуляция инфекционного и неинфекционного воспаления, опухолевого роста и метастазирования, реакций отторжения трансплантата, аутоиммунных заболеваний, кальцификации элементов сердечно-сосудистой системы и т.д. Было показано, что пуринергическая система осуществляет тонкую регуляцию функций клеток иммунной системы аналогично цитокиновой и хемокиновой секреции, удалению внутриклеточных патогенов и механизмов клеточной гибели. Основываясь на понимании механизмов развития этих состояний, в том числе и участия пуринергической системы в их регуляции, разрабатываются новые подходы к терапии и профилактике. Анализу достижений последнего времени в участии пуринергической регуляции в основных патологических состояниях и заболеваниях, а также трендам в разработке терапевтических подходов на основании полученных знаний посвящен данный обзор.

Ключевые слова: пуринергическая регуляция, CD39, CD73, АТФ, аденозин

PURINERGIC REGULATION OF BASIC PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL PROCESSES

Golovkin A.S.^a, Asadullina I.A.^b, Kudryavtsev I.V.^{b,c}

^a V.A. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Abstract. Purinergic signaling has been actively studied over recent years. It happens, due to its involvement in pathogenesis of various diseases and pathologies such as infectious and non-infectious inflammation, tumor growth, graft-versus-host disease, autoimmune disorders, cardiovascular calcification etc. It has been shown that the purinergic system mediates fine tuning of the immune cell populations, like as cytokine and chemokine secretion, elimination of intracellular pathogens and mechanisms of programmed cell death. Novel approaches to therapy and disease prevention are based on studies of appropriate developmental mechanisms, including role of purinergic system in their regulation. This review contains analysis of recent achievements elucidating the role of purinergic regulation in pathogenesis of basic pathological conditions and diseases, as well as trends in development of new therapeutic approaches based on present knowledge.

Keywords: purinergic regulation, CD39, CD73, ATP, adenosine

Адрес для переписки:

Головкин Алексей Сергеевич
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр имени В.А. Алмазова»
197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2.
Тел.: 8 (812) 702-37-77.
E-mail: golovkin_a@mail.ru

Address for correspondence:

Golovkin Alexey S.
V.A. Almazov National Medical Research Centre
197341, Russian Federation, St. Petersburg, Akkuratova str., 2.
Phone: 7 (812) 702-37-77.
E-mail: golovkin_a@mail.ru

Образец цитирования:

А.С. Головкин, И.А. Асадуллина, И.В. Кудрявцев
«Пуринергическая регуляция основных физиологических
и патологических процессов» // Медицинская иммунология,
2018, Т. 20, № 4, С. 463-476.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-463-476

© Головкин А.С. и соавт., 2018

For citation:

A.S. Golovkin, I.A. Asadullina, I.V. Kudryavtsev "Purinergic
regulation of basic physiological and pathological processes",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2018, Vol. 20, no. 4, pp. 463-476.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-463-476

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-463-476

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-60199).

Введение

В 1972 году в ходе исследований Джеффри Бернстока впервые был описан пуриnergический тип передачи сигнала — один из ключевых механизмов межклеточной сигнализации, опосредованный пуриновыми нуклеотидами и нуклеозидами [14]. Причем одной из ключевых молекул, участвующих в этих процессах, являлся внеклеточный аденозинтрифосфат (АТФ). В ходе дальнейших исследований были описаны основные семейства рецепторов к АТФ и его производным на поверхности различных клеток, ферменты для утилизации АТФ (эктонуклеотидазы) и другие участники пуриnergической регуляции. Немаловажное значение имеют работы по анализу экспрессии этих рецепторов и их роли в процессах регуляции функциональной активности клеток различных органов и тканей. В последние годы ведется активное изучение значимости пуриnergического сигналинга в патогенезе широкого спектра заболеваний и патологических состояний, к числу которых относятся регуляция инфекционного и неинфекционного воспаления, опухолевого роста и метастазирования, реакций отторжения трансплантата, аутоиммунных заболеваний, кальцификации элементов сердечно-сосудистой системы и т.д. Было показано, что пуриnergическая система осуществляет тонкую регуляцию функций клеток иммунной системы аналогично цитокиновой и хемокиновой секреции, удалению внутриклеточных патогенов и механизмов клеточной гибели. Основываясь на понимании механизмов развития этих состояний, в том числе и участии пуриnergической системы в их регуляции, разрабатываются новые подходы к терапии и профилактике. Данный обзор посвящен анализу современных представлений о роли пуриnergической регуляции в развитии основных патологических состояний, а также перспективам применения полученных знаний в разработке принципиально новых терапевтических подходов.

Внеклеточный АТФ и аденозин

АТФ высвобождается из активированных клеток во время воспаления, гипоксии или апоптоза, а также из некротических клеток при повреждении мембран [59]. Активный выход АТФ происходит в основном посредством двух механизмов: экзоцитоз внутриклеточных везикул либо транспорт через мембранные каналы или транспортеры, хотя эти два процесса могут идти одновременно в рамках одной и той же клетки.

АТФ обладает широким спектром провоспалительных эффектов на клетки и ткани, участвуя, таким образом, в тонкой настройке иммунного

ответа. Помимо этого, АТФ относится к DAMP (от англ. danger-associated-molecular-pattern) — эндогенным тканевым сигналам, которые, в кооперации с другими сигналами, запускают и регулируют иммунный ответ. В частности, АТФ вовлечен в хемотаксис, продукцию активных форм кислорода фагоцитами и синтез цитокинов воспалительными клетками [29].

Высвобождение АТФ из клетки тесно связано с работой двух типов каналов плазматической мембраны: Cl^- каналов и каналов, формирующих поры (коннексин, паннексин). Коннексины реагируют на деполяризацию мембраны или снижение концентрации внеклеточного Ca^{2+} . АТФ может высвобождаться через эти каналы в результате воздействия провоспалительных сигналов. Паннексисовые каналы обнаружены на многих типах клеток, в том числе и на различных иммунокомпетентных клетках. Активное высвобождение АТФ обычно наблюдается при гипоксии и апоптозе [29].

После выхода АТФ во внеклеточное пространство происходит дефосфорилирование данной молекулы различными ферментами. Основными нуклеотидазами, участвующими в этом процессе, являются CD39 (E-NTPDase1, от англ. ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1) и CD73 (Ecto5'NTase, от англ. ecto-5'-nucleotidase). Первая метаболизирует АТФ до АДФ, пирофосфата и АМФ. Последний, в свою очередь, расщепляется до аденозина и фосфата с помощью поверхностного рецептора CD73 [5]. Эти рецепторы высоко экспрессируются в клетках многих тканей и органов: сердца, плаценты, легких, печени, кишечника, мозга, почек и др. Более того, данные рецепторы широко представлены на клетках иммунной системы: моноцитах, нейтрофилах, дендритных клетках, В-лимфоцитах, некоторых субпопуляциях Т-лимфоцитов [25], а также мультипотентных мезенхимальных стволовых клетках [89]. Помимо CD39 и CD73, в дефосфорилировании АТФ до АДФ и АМФ может принимать участие щелочная фосфатаза [107]. Биологическая доступность внеклеточного аденозина регулируется посредством аденозиндеамины — фермента, расщепляющего аденозин до инозина, либо за счет транспорта внутрь клетки нуклеозидными транспортерами [9, 29] (рис. 1).

Рецепторы аденозина и АТФ

Во внеклеточном пространстве аденозин связывается с P1-рецепторами — представителями семейства рецепторов, ассоциированных с G-белками (от англ. G-protein-coupled receptors). Семейство состоит из 4 подтипов: A1, A2A, A2B и A3. При этом A1 и A2A являются высокоафинными, а A2B и A3 — низкоафинными рецепторами. Все они связаны с активностью аденилатциклазы и синтезом цАМФ. В частности, A2A и A2B стимулируют аденилатциклазу, а A1 и A3

ингибируют ее. Рецепторы широко представлены на многих клетках, в том числе на нейтрофилах, моноцитах, макрофагах, Т-клетках, эндотелиальных, гладкомышечных и т. д. [29].

Функциональная физиологическая роль P1-рецепторов изучалась на нокаутированных по гену этих рецепторов мышцах. В случае нокаута по A1, A2 и A3 все животные не демонстрировали значительных отклонений от нормы и были фертильны [24, 47, 86]. В то же время нокаутированные только по рецептору A1 мыши проявляли признаки ускоренного старения [29, 36].

Во внеклеточном пространстве АТФ связывается с P2-пуринергическими рецепторами (табл. 2), которые включают в себя 2 подкласса – P2X и P2Y [46]. P2X-рецепторы являются каналами в плазматической мембране, которые активируются исключительно под действием АТФ, что приводит к току различных катионов (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) в клетки и из них [29, 96].

P2Y-рецепторы относятся к рецепторам, сопряженным с G-белками, и модулируют такие процессы, как активность аденилатциклазы, фосфолипазы C и активность ионных каналов. Преимущественно P2Y-рецепторы активируются АТФ и АДФ, однако некоторые могут быть активированы и другими нуклеотидами, например уридинтрифосфатом [4]. Так же как и P1-рецепторы, P2X и P2Y представлены на многих

иммунокомпетентных клетках, в том числе и на эндотелиальных [29]. Физиологическую роль рецепторов *in vivo* также тестировали на нокаутированных мышцах. Все животные с выключенными P2X- и P2Y-рецепторами доживали до взрослого возраста [76]. Мыши без P2X2- и P2X3-рецепторов имели повышенное количество иммунных клеток и увеличенную селезенку [20].

Эффекты АТФ и аденозина

Считается, что P1-рецепторы обладают противовоспалительными свойствами, тогда как P2 участвуют в запуске воспалительных процессов [29]. В этой системе CD39 является ключевой молекулой, запускающей пуринергическую систему, конвертируя провоспалительные АТФ/АДФ в неактивный АМФ. Последний расщепляется с помощью CD73 до аденозина, обладающего выраженными противовоспалительными свойствами [18]. CD39 может подавлять воспалительную реакцию за счет локального снижения уровня АТФ/АДФ и повышения уровня аденозина. В дополнение к гемопоэтическим иммунным клеткам, таким как макрофаги и регуляторные Т-клетки, аналогичный механизм регуляции воспаления через CD39 имеет место в метаболизме эндотелиальных и эпителиальных клеток.

P2X7-рецептор экспрессируется преимущественно на иммунокомпетентных клетках, что указывает на его значимую роль в АТФ-

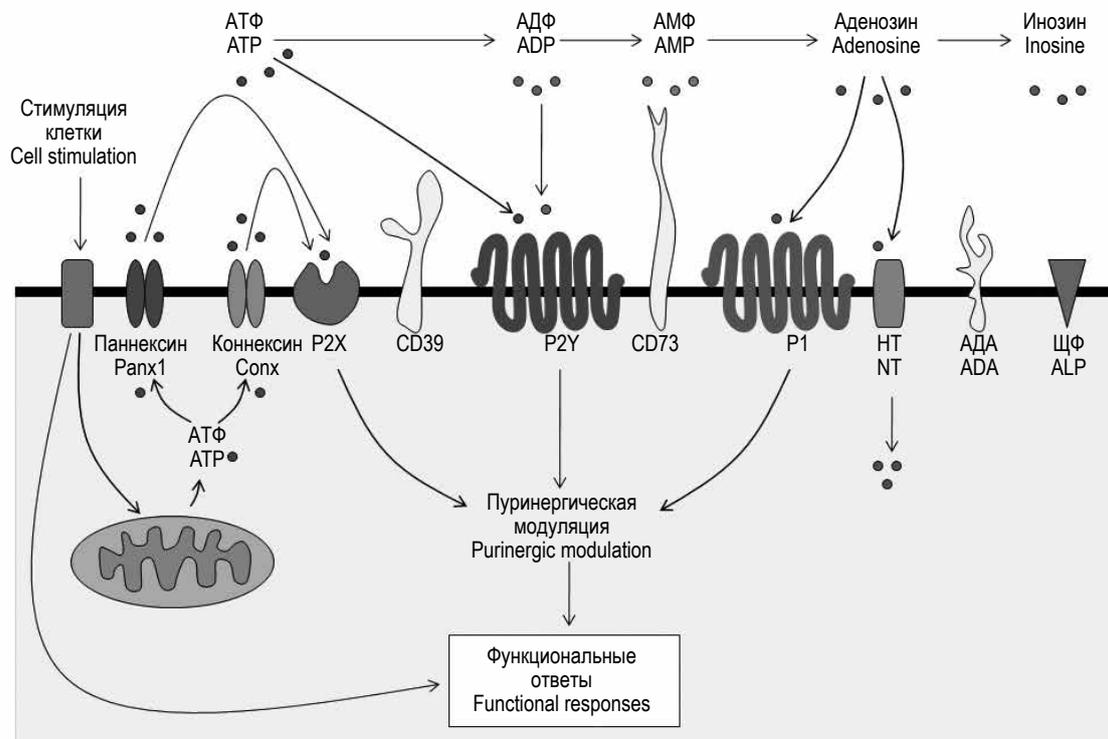


Рисунок 1. Элементы аутокринного пуринергического сигналинга (модифицировано из [60])

Примечание. Panx1 – паннексин 1, Conx – коннексин, NT – нуклеозидный транспортер, ADA – аденозин деаминаза, ALP – щелочная фосфатаза.

Figure 1. Autocrine purinergic signaling elements (modified from [60])

Note. Panx1, pannexin 1; Conx, connexin; NT, nucleoside transporter; ADA, adenosine deaminase; ALP, alkaline phosphatase.

индуцированном воспалении. Этот рецептор имеет относительно низкое сродство к АТФ. В то время как большинство P2-рецепторов отвечают на АТФ в концентрации 10^{-6} - 10^{-5} М, для P2X7 требуется 10^{-4} - 10^{-3} М [105]. Стимуляция P2X7-рецептора АТФ приводит к притоку ионов натрия и кальция внутрь клетки и выходу из нее калия, что, в свою очередь, может инициировать клеточную активацию и пролиферацию. Более того, отток K^+ особенно важен для Ca^{2+} -опосредованной активации инфламмасом [106]. Вместе с тем P2X7-рецепторы также могут вызывать лизис и апоптоз Т-клеток [63]. Противоположные эффекты АТФ могут зависеть от его внеклеточной концентрации.

Одним из наиболее важных клеточных ответов на активацию P2X7 лигандами является сборка NLRP3 (от англ. nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3) инфламماسом [33]. NLRP3 инфламماسома является сложным белковым комплексом, запускающим активацию каспазы-1, инициирующую секрецию IL-1 и IL-18. Данные инфламماسомы относятся к семейству внутриклеточных NOD-подобных рецепторов и активируются многими DAMP и PAMP (от англ. pathogen associated molecular patterns), в том числе АТФ, повышенным уровнем цитозольной ДНК и высоким внеклеточным уровнем глюкозы. АТФ может опосредованно активировать инфламماسомы, связываясь с P2X7-рецепторами, что приводит к слиянию мембранных пор паннексина-1, которые позволяют агонистам NLRP3 проникать внутрь клетки и активировать инфламмасому [50]. Другой предполагаемый механизм этого процесса заключается в том, что PAMP и DAMP, включая АТФ, индуцируют образование активных форм кислорода, вызывая образование комплекса NLRP3 инфламماسомы [22, 99]. Другим важнейшим механизмом, за счет которого АТФ может участвовать в воспалении, является усиление ангиогенеза и заживление ран посредством активации синтеза и секреции VEGF (от англ. vascular endothelial growth factor) моноцитами [42].

Аденозин обладает противоположными эффектами и играет ведущую роль в ограничении иммунного ответа. Так, это вещество подавляет адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам микроциркуляторного русла, снижает продукцию активных форм кислорода нейтрофилами и угнетает синтез и секрецию провоспалительных цитокинов клетками различного происхождения [8, 54]. С другой стороны, аденозин способствует выходу противовоспалительного IL-10 из моноцитов [54], а также запускает продукцию VEGF – мощного индуктора ангиогенеза и сосудистой проницаемости. Большинство из этих эффектов реализуются через A2-рецепторы.

Регуляция функциональной активности клеток приобретенного иммунитета

В настоящее время показано, что пуринергическая регуляция контролирует активность

Т-клеток. Предполагается, что пуриновые нуклеотиды и нуклеозиды участвуют в проведении сигнала, необходимого для распознавания антигена Т-клетками при формировании иммунологического синапса [48]. В частности, P2X4- и P2X7-рецепторы вовлечены в активацию $\gamma\delta$ Т-клеток [68]. Несколько компонентов, принимающих участие в пуринергических сигнальных путях – P2X1 каналы, рецепторы P2X1 и P2X4 – входят в состав иммунного синапса, формируя мощный сигнальный комплекс [104]. Важно отметить, что частью этого комплекса являются митохондрии клеток. Они перемещаются в иммунные синапсы, где высвобождают АТФ, который при помощи P2X1- и P2X4-рецепторов активирует аутокринные пуринергические сигнальные механизмы в синаптической щели [61]. Более того, именно эти рецепторы регулируют приток ионов кальция, так как способны функционировать в качестве кальциевых каналов [60, 108]. Также было показано, что АТФ ускоряет активацию Т-клеток путем усиления TCR-опосредованной (от англ. T-cell receptor) активации и повышения продукции IL-2 [90].

Другим механизмом участия АТФ в реакциях специфического иммунного ответа является регуляция дифференцировки и функциональной активности регуляторных Т-клеток. Так же как и в случае локального воспалительного ответа, эффект АТФ на иммунные клетки является дозозависимым: низкий уровень АТФ активирует Т-клетки, а высокие концентрации и продолжительная активация P2X7-рецепторов стимулируют образование пор и апоптоз Т-клеток [98].

Аналогично местным воспалительным реакциям, аденозин является антагонистом АТФ в отношении Т-клеток. Он подавляет активность некоторых популяций Т-клеток (например, проявление цитолитических свойств или синтез цитокинов), в частности Th17 [29], и активирует Т-регуляторные клетки. Кроме того, аденозин подавляет дифференцировку Th1 и Th2 за счет снижения уровня пролиферативной активности и продукции IL-2 [23]. Аденозин может проявлять свои эффекты, блокируя передачу сигналов с TCR после увеличения концентрации цАМФ, связанной со стимуляцией A2A-рецептора [93].

Рецепторы аденозина экспрессируются в различных клетках иммунной системы, включая лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, гранулоциты. Таким образом, аденозин, продуцируемый регуляторными Т-клетками, оказывает воздействие на различных участников иммунного ответа [75], а аденозин-опосредованная супрессия эффекторных клеток играет центральную роль в ингибирующем действии регуляторных Т-клеток [5, 25]. В этом отношении супрессивный эффект аденозина в значительной степени опосредован через A2AAR и A2BAR сигналинг в иммунных клетках с последующей

сенсбилизацией рецепторов посредством связывания цАМФ. Действительно, Т-клетки высоко экспрессируют A2AAR, а использование антагониста этого рецептора блокирует иммуносупрессию, опосредованную регуляторными Т-клетками [57, 66]. Важно отметить, что накопление цАМФ в клетках-мишенях также может быть следствием продукции простагландина E2 регуляторными Т-клетками [67].

При связывании рецептора A2AAR с аденозином снижается цитотоксическая активность НК-клетки [45]. Так же под регуляторным влиянием находятся и дендритные клетки, которые рекрутируются на ранних фазах иммунного ответа, но в конечном итоге имеют низкий уровень экспрессии костимуляторных молекул из-за сигналинга, опосредованного аденозином [26]. Также было показано воздействие продуцируемого регуляторными Т-клетками аденозина на дендритные клетки, усиливающего их миграционную активность, что способствует привлечению данных клеток к месту воспаления и реализации ими соответствующих функций [84].

Экспрессия CD39 и CD73 была показана как на человеческих, так и на мышинных регуляторных Т-клетках [25]. Эти клетки экспрессируют функционально активные ферменты, которые приводят к продукции аденозина [65], угнетению синтеза цитокинов и пролиферации Т-клеток. Было показано, что на регуляторных Т-клетках человека уровень экспрессии CD39 пропорционален уровню FoxP3 [11, 25]. В дальнейшем CD39 исследовался как маркер регуляторных Т-клеток, в результате чего было выявлено значительное перекрытие уровня экспрессии этого белка и FoxP3 [11, 27]. Изучение экспрессии этого рецептора позволяет выделить Т-клетки с высоким супрессивным профилем, а также позволяет эффективно отличать супрессивные Т-клетки от Т-клеток с Th17-фенотипом [27, 65].

Регуляция функциональной активности клеток врожденного иммунитета

Нейтрофилы играют ключевую роль в защите от внеклеточных инфекционных агентов различного происхождения. Известно, что АТФ и аденозин регулируют такие функции нейтрофилов, как продукция активных форм кислорода, фагоцитоз, адгезия и хемотаксис. Высвободившийся АТФ и аутокринная активация пуринергических рецепторов необходимы для распознавания градиента хематтрактантов, поляризации клеток и их направленной миграции в очаг воспаления. Вместе с тем повышенный уровень АТФ в плазме пациентов с сепсисом препятствует регуляции функций нейтрофилов посредством блокады каскада реакций пуринергической передачи сигнала. В результате клетки чрезмерно активируются, атакуют ткани организма и не могут обеспечить иммунный ответ для защиты организма хозяина [95].

Пуринергический сигналинг также регулирует хемотаксис макрофагов и дендритных клеток. В макрофагах данный ответ связан с P2Y2, P2Y12, а также A2A, A2B и A3 аденозиновыми рецепторами [56]. P2Y2 регулирует хемотаксис незрелых дендритных клеток. Так, высокие дозы АТФ выделяются из апоптотических клеток и играют роль привлекающего сигнала для макрофагов и инициирования процесса элиминации умирающих и мертвых клеток. Кроме того, ЛПС (липополисахарид) запускает высвобождение IL-1 β моноцитами, макрофагами и дендритными клетками на фоне связывания P2X7-рецепторов со своим лигандом. Эти наблюдения подтверждают, что P2X7-рецепторы играют значительную роль в антибактериальном ответе макрофагов [46].

Альтернативный путь пуринергической регуляции

Помимо комплекса CD39/CD73, способного генерировать аденозин, можно рассмотреть другую группу рецепторов, обладающих способностью образовывать аденозин из НАД⁺. В этот «кластер» входят метаболизирующий нуклеотиды эктоэнзим CD38, эктонуклеотид пирофосфатаза/фосфодиэстераза 1 (NPP1, CD203a) и CD73 [43]. Данные эктоферменты могут функционировать в зависимости от их пространственного расположения как часть непрерывного (молекулы расположены на одной и той же клетке) или прерывающегося (молекулы расположены на разных клетках) пути. Особенностью комплекса CD38/CD203a/CD73 является то, что он может демонстрировать двойную активность.

Первым участником каскада реакций в данном комплексе является CD38, регулирующий уровень внеклеточного НАД⁺. Субстратами для второго участника – CD203a – являются НАД⁺, аденозиндифосфат рибоза (продукт активности CD38) и АТФ. Продуктами реакции оказываются АМФ, никотинамид мононуклеотид и пирофосфат (PPi) [43], образующиеся преимущественно внутри клеток.

Пуринергическая регуляция при системном воспалении

Системный воспалительный ответ является частым атрибутом критических состояний как инфекционного, так и неинфекционного генеза. Системное воспаление инициируется PAMP (активируются эндотоксином) и DAMP (активируются аларминами, выделяемыми из поврежденных клеток – мочевая кислота, хромосомная ДНК, HMGB1 и т.д.). Связывание рецепторов с их лигандами приводит к рекрутированию и активации фагоцитов (нейтрофилов и макрофагов) с последующей элиминацией инфекционного агента и репарацией тканей. При сепсисе чрезмерная активация этих путей приводит к массивному выходу провоспалительных цитокинов, запуску каскада свертывания крови, эндотелиальной дисфункции, гемодинамиче-

ским нарушениям и в конечном итоге к полиорганной дисфункции и смерти.

Как уже отмечалось выше, воспаление регулируется внеклеточным АТФ и аденозином. В начальной стадии воспаления из поврежденных и активированных клеток высвобождается большое количество АТФ, что приводит к запуску провоспалительных реакций, особенно со стороны врожденной иммунной системы, тем самым способствуя трансформации в системное воспаление и вторичному повреждению органов. В дальнейшем высокий уровень АТФ продолжает усиливать воспалительный ответ при помощи описанных выше механизмов [2, 3]. Для поддержания необходимого для элиминации патогена уровня воспалительной реакции процесс распада АТФ может быть задержан за счет подавления активности CD39 и CD73. На финальных стадиях воспаления отмечается повышение количества аденозина, образовавшегося за счет расщепления АТФ дефосфорилирующими ферментами CD39 и CD73, при этом уровень самого АТФ снижается, что подтверждает данные о противовоспалительной активности аденозина. Процесс разрешения воспаления может быть ускорен за счет тканевой гипоксии, вызванной воспалительным процессом [58, 60].

Как и АТФ, концентрация внеклеточного аденозина быстро повышается в ответ на системное воспаление и повреждение тканей [2, 81]. Так, было показано десятикратное увеличение уровня аденозина в плазме крови у пациентов с септическим шоком [69]. Считается, что этот процесс может быть связан со снижением активности аденозиндеаминазы и аденозинкиназы, а также повышением активности аденозинпродуцирующего CD73 в условиях гипоксии [52]. Аналогичные результаты были получены в условиях экспериментальной эндотоксемии у человека путем внутривенной инфузии 2 нг/кг ЛПС [82]. Иммуносупрессивное действие аденозина связано с активностью А2-рецепторов иммунных клеток. Медиаторы воспаления и эндотоксин быстро повышают уровень экспрессии А2А- и А2В-рецепторов [13]. В экспериментах на мышах, нокаутированных по А2А, было показано, что этот рецептор обеспечивает уменьшение повреждения тканей при системном воспалении [74]. С другой стороны, наряду с уменьшением чрезмерной активации иммунных клеток через А2А- или А2В-рецепторы, которая может оказаться значимой в начальной гипердинамической фазе сепсиса и эндотоксемии, те же рецепторы могут индуцировать иммуносупрессию [91, 94]. Подтверждением этого являются результаты исследования, в котором было показано, что ингибирование А2А-рецепторов повышает выживаемость в модельном эксперименте бактериального сепсиса за счет снижения продукции IL-10 и сохранения функции лимфоцитов [73]. Однако в дру-

гом исследовании было высказано мнение, что А1- и А2-рецепторы аденозина могут оказывать благотворное влияние при сепсисе [34, 62].

В ряде исследований было показано, что CD39 может защищать органы и ткани от неинфекционного воспаления, гипоксического и ишемического повреждения [28, 37, 39, 53], а также состояний, которые могут быть связаны с инфекционным агентом. Например, усиление ЛПС-индуцированного накопления нейтрофилов в легких в случае генетического дефекта или фармакологического ингибирования CD39 и снижение инфильтрации после назначения растворимого CD39 [83].

В противовес защитным функциям при неинфекционных повреждениях роль CD39 при инфекциях оказывается более комплексной. Действительно, многие патогены могут использовать CD39 для создания среды, богатой аденозином, что позволяет им избежать иммунного надзора и способствует их вторжению и распространению по организму хозяина [87, 88].

Опухолевый рост и метастазирование

Пуриnergическая система является одной из основных систем, оказывающих ингибирующее действие на уровне микроокружения опухоли. За ингибирующий эффект аденозина в данном случае отвечают 3 фактора: накопление экзогенного АТФ во внеклеточном пространстве; миграция в область микроокружения опухоли иммунных клеток создает условия, близкие к местному воспалению, что увеличивает экспрессию ферментов, дефосфорилирующих АТФ; и, наконец, гипоксия — основной фактор, индуцирующий продукцию аденозина в опухолевом микроокружении.

По мере увеличения количества аденозина в области опухоли последний начинает действовать как противовоспалительный медиатор, подавляющий функцию проникновения иммунных клеток, тем самым предотвращая разрушение тканей. Этот процесс является нормальным для здорового организма, однако в случае наличия опухоли он превращается в хроническое подавление противоопухолевых иммунных реакций, в конечном счете способствуя росту злокачественного новообразования. Опухоль перепрограммирует микроокружение так, что клетки воспаления приобретают возможности для создания нового цитокинового профиля, способствующего неоплазии и ингибированию противоопухолевой активности вновь поступающих клеток. Так как опухоль является богатым источником АТФ и аденозина, перепрограммирование опухолевого микроокружения в значительной степени обусловлено активностью именно клеток опухоли [102]. Большое количество аденозина ингибирует или поляризует функции эффекторных клеток иммунной системы, ответственных за противоопухолевую защиту (В-клетки, НК-клетки, эф-

факторные популяции Т-лимфоцитов, дендритные клетки, моноциты). Кроме того, аденозин усиливает пролиферацию и супрессорные функции регуляторных Т-клеток, которые ответственны за подавление противоопухолевых функций клеток-эффекторов [71]. В долгосрочной перспективе данные процессы приводят к усилению роста опухоли и ингибированию локального иммунного ответа. При этом эктонуклеотидазы CD39 и CD73 являются ключевыми ферментами, регулируемыми баланс АТФ/аденозин в опухолевом микроокружении [102].

Аденозин также может регулировать активность стромальных клеток, выполняющих каркасную функцию для опухолевых и иммунных клеток. Было показано, что стромальные клетки большинства солидных опухолей человека экспрессируют CD39 и CD73, таким образом, предположительно могут продуцировать аденозин [71].

Клетки непосредственно самих опухолей могут коэкспрессировать CD39 и CD73 и выступать в качестве мощного продуцента аденозина, что, помимо прочего, играет роль в ангиогенезе. Вместе с тем непосредственный эффект аденозина на опухолевые клетки еще недостаточно изучен. При различных типах опухолей имеются противоречивые результаты о про- и противоопухолевой активности аденозиновых рецепторов на поверхности опухолевых клеток [71].

Трансплантация

При трансплантации тканей и органов, а также при имплантации инородных материалов (протезов, графтов и т.д.) активно задействован Т-клеточный иммунитет [7]. При этом эффективность проводимых процедур, развитие реакций отторжения и т.д. в значительной степени зависят от активности пуринергической системы регуляции.

Было показано, что генерируемый CD73 аденозин — это фактор, с помощью которого можно влиять на тяжесть РТПХ и РТПО (реакция «трансплантат против опухоли») [78, 97]. РТПХ усиливается за счет АТФ, который выделяется из погибших клеток и является провоспалительным фактором, участвующим в активации антигенпрезентирующих клеток хозяина посредством P2X7-рецептора. Было показано, что генерируемый CD73, расположенным, в частности, на негемопозитических клетках, аденозин ограничивает тяжесть РТПХ. Внеклеточный аденозин связывается с аденозиновым A2A-рецептором донорских аллореактивных Т-клеток и ингибирует их активацию антигенпрезентирующими клетками хозяина. Ограничение аллореактивной активации Т-клеток предотвращает развитие РТПХ, но ограничивает эффект РТПО [78, 97].

Предполагается, что продуцированный CD73 аденозин может ингибировать функцию противоопухолевых Т-клеток, что приводит к увели-

чению роста опухоли и быстрой смерти. Таким образом, исходя из имеющихся данных, представляются возможными разные стратегии терапии: использование агониста аденозиновых рецепторов, рекомбинантного CD73 или назначение препарата, являющегося субстратом для CD73 и который может конвертироваться в агонист аденозинового рецептора. С другой стороны, ингибирование CD73 имеет потенциал для усиления реакции «трансплантат против опухоли» у пациентов со злокачественными новообразованиями, которые получали терапию аллогенными стволовыми клетками [100, 101]. При отсутствии CD73 и аденозина аллореактивные Т-клетки демонстрируют более высокую пролиферацию с активной секрецией провоспалительных цитокинов и повышенную миграционную способность [97].

Кальцификация элементов сердечно-сосудистой системы

В последнее время накапливается все большее количество экспериментальных наблюдений, указывающих на роль поверхностных клеточных рецепторов для АТФ и его метаболитов [1], а также ферментов, регулирующих метаболизм АТФ, в процессах кальцификации элементов сердечно-сосудистой системы.

Так, на гладкомышечных клетках — основных участниках процесса образования кальциевых депозитов в стенках сосудов — в большом количестве присутствуют аденозиновые P1-рецепторы (A1, A2A, A2B, A3) и рецепторы, сопряженные с G-белком, а также рецепторы, связанные с АТФ (P2X1, P2X4, P2X7, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y12) [30].

Доступность внеклеточных нуклеотидов для активации пуринергических рецепторов P1 и P2 регулируется рядом ферментов, которые метаболизируют АТФ и родственные ему молекулы. CD39 расщепляют АТФ до 2 молекул АМФ и 2 фосфатов, которые, в свою очередь, являются промоторами отложения гидроксипапатита. Эктонуклеотид пиррофосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPPs) генерируют АМФ и неорганический пиррофосфат (PPi). При этом PPi является потенциальным ингибитором образования гидроксипапатита, а значит, и кальцификации тканей. Однако пиррофосфат может быть конвертирован до фосфата за счет активности тканевой щелочной фосфатазы, которая, таким образом, является инициатором кальцификации. Внутриклеточный пиррофосфат также может секретироваться во внеклеточное пространство. Кроме того, за счет активности CD73 АМФ конвертируется до аденозина и одной молекулы фосфата [30].

Способность пиррофосфата ингибировать эктопическую кальцификацию была продемонстрирована более полувека назад в эксперименте с подкожной инъекцией крысам, подвергшимся воздействию высоких доз витамина D [32]. Ме-

ханизм, благодаря которому достигается этот эффект, представляет собой хемосорбцию PPI на поверхности гидроксиапатита.

В клинических наблюдениях было отмечено, что у людей с хроническими заболеваниями почек уровень PPI обратно коррелирует со степенью кальциноза артерий [72], а пониженный уровень наблюдается у пациентов, находящихся на диализе, вне зависимости от используемого режима лечения, выраженности воспаления, режима питания [64].

В настоящее время считается, что CD39 напрямую не связан с кальцификацией элементов сердечно-сосудистой системы, несмотря на его высокую экспрессию на гладкомышечных клетках сосудов [85]. Вместе с тем, благодаря тому, что данный фермент обладает высокой гидролазной активностью в отношении нуклеотидов, он связан с другими важными функциями сосудистой сети, такими как модуляция тромбоза и воспаления, регуляция сосудистого тонуса [51]. Кроме того, из всех нуклеотидаз CD39 имеет наибольшее количество доказательств его связи с регуляцией передачи сигналов через пуриновые рецепторы. Потенциально CD39 может лимитировать доступность АТФ для конверсии в пирофосфат посредством ENPP1 [30].

Косвенным подтверждением участия пуринергической сигнальной системы в активности клеток аортального клапана и процессах его кальцификации можно считать экспериментальные данные, полученные при морфологическом и биохимическом исследовании аортальных клапанов свиней. Было показано, что CD39 и CD73 значительно экспрессированы в клетках клапана двух основных типов – эндотелиальных и интерстициальных. При этом культивирование клеточных линий с добавлением внеклеточных нуклеотидов показало более быстрое образование продуктов активности CD73 на интерстициальных клетках, чем на эндотелиальных клетках, в то время как в отношении активности CD39 была обнаружена обратная закономерность [49].

В экспериментах *in vitro* с крысиными гладкомышечными клетками сосудов и клетками медиального слоя аорты грызунов при культивировании в среде, дополненной 10 мМ β-глицерофосфатом и уридин-аденозинтетрафосфатом (Ur4A), была продемонстрирована усиленная кальцификация. Известно, что Ur4A выделяется из эндотелиальных клеток в условиях гипоксии или механического воздействия и может активировать P2X- и P2Y-рецепторы. Таким образом, P2Y2- и P2Y6-рецепторы трактуются как потенциальные участники кальциноза сосудов [92].

Участие пуринергической регуляции в кальцификации сосудов также было показано в экспериментах с культивированием интерстициальных клеток аорты с добавлением 2-5 мМ фосфата

и антагониста пуринергических рецепторов сурамина, isoPPADS (антагониста P2X-рецептора) или CGS15943 (антагониста аденозиновых рецепторов). Показано, что только сурамин повышает минерализацию клеток сосудов. Предполагается, что этот эффект связан с ингибирующим действием P2Y-рецепторов на кальцификацию клапанов [19].

Поскольку в патогенезе кальцификации сосудов и образовании костей присутствует множество общих механизмов (например, апрегуляция таких транскрипционных факторов, как Runx2 и т.д.), закономерно провести параллели между пуринергической регуляцией этих процессов. В частности, так же как и в отношении сосудистой кальцификации, было показано ингибирующее влияние P2Y2-рецепторов на формирование костной ткани [77], а рецептор P2X7 может усиливать остеогенез [38].

Вместе с тем возможен и иной путь участия аденозиновой регуляции в патогенезе кальцификации магистральных сосудов. Речь идет о воспалении, в котором принимают участие клетки иммунной системы (лимфоциты, моноциты, макрофаги и т.д.). В последние годы появились данные, указывающие на значение уровня экспрессии CD39 и CD73 на субпопуляциях циркулирующих Т-лимфоцитов при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. В частности, было показано, что циркулирующие активированные Т-клетки эффекторной памяти ассоциированы с кальцификацией аортального клапана [103]. Однако участие Т-клеточного звена иммунитета, и в частности циркулирующих клеток, в патогенезе кальцификации элементов сердечно-сосудистой системы нуждается в дальнейшем изучении.

Аутоиммунные заболевания

Продукция аденозина из АМФ посредством CD73 и CD39 известна как противовоспалительная реакция, которая ингибирует провоспалительные каскады, следующие за накоплением АТФ. Таким образом, пуринергическая система, являясь элементом регуляции воспалительного процесса, может участвовать в развитии аутоиммунных заболеваний.

При ревматоидном артрите отсутствие CD73 провоцирует прогрессирование заболевания, в том числе дифференцировку Th1, продукцию цитокинов и повреждение суставов. При этом все эти эффекты имеют обратное развитие в случае назначения селективных агонистов A2A-аденозиновых рецепторов [17]. Иммуносупрессивная роль CD73 также подтверждается тем, что мыши, не имеющие этого рецептора, более восприимчивы к развитию аутоиммунного гломерулонефрита [10] и неспецифического язвенного колита [15]. Вместе с тем низкий уровень поверхностной экспрессии CD73 был выявлен на мононуклеарных клетках синовиальной жид-

кости у детей с ювенильным идиопатическим артритом [12].

Высокий уровень экспрессии CD39 был выявлен на регуляторных Т-клетках у пациентов с неспецифическим язвенным колитом в стадии клинической ремиссии [35].

В крови пациентов с рассеянным склерозом (РС) выявляется значительное снижение CD39⁺ регуляторных Т-клеток, что может оказаться диагностически и прогностически значимым для данного заболевания [11]. РС является опосредованным Т-клетками аутоиммунным заболеванием; у пациентов с рецидивирующей формой отмечается повторяющаяся активация Т-клеток. У здоровых доноров CD39⁺ регуляторные Т-клетки присутствуют в достаточных количествах, поэтому при возникновении инфекции или незначительном повреждении тканей избыточный внеклеточный АТФ легко гидролизует, что предотвращает созревание дендритных клеток и пролиферацию аутореактивных Т-клеток и предупреждает нежелательный иммунный ответ. Существует предположение, что распространение CD39⁺ регуляторных Т-клеток в тканях является генетически детерминированным, чем и объясняется снижение количества этих клеток у пациентов с РС [11].

Перспективы применения в терапии

Известно, что вовлечение аденозина в сигнальные пути является важным механизмом действия целого ряда лекарственных препаратов, обладающих важными эффектами, в том числе в отношении иммунной системы. К таким препаратам можно отнести метотрексат, ингибитор фосфодиэстеразы пентоксифиллин [55], сульфасалазин [21], кофеин [44].

Несмотря на явное свидетельство того, что рецепторы аденозина являются потенциально пригодными для модулирования их функции фармацевтическими препаратами, предстоит преодолеть важные препятствия, прежде чем новые лекарства, действующие через рецепторы аденозина, будут внедрены в клиническую практику. Например, серьезным препятствием к применению препарата ролофилин (антагонист А1AR) при лечении острой сердечной недостаточности оказалось отсутствие необходимой результативности и наличие тяжелых побочных эффектов, таких как судороги и инсульт [70]. Данный пример хорошо иллюстрирует одну из самых больших проблем в использовании пуринергического сигналинга как потенциальной терапевтической мишени — широкая распространенность этого пути в тканях и необходимость разработки агонистов рецепторов аденозина с высокой тканевой специфичностью [9, 75].

Chen J.F. и соавт. [16] указывали на два клинических исследования, в которых тестировались препараты при иммуноопосредованных заболеваниях (псориаз и ревматоидный артрит). В обо-

их исследованиях тестировали CF101 — агонист А3AR. Благодаря тому, что А3AR-рецептор высоко экспрессируется преимущественно в воспалительных клетках, он представляет собой перспективную терапевтическую мишень. Подтверждением этого являются обнадеживающие результаты многоцентрового исследования фазы II, направленного на лечение ревматоидного артрита [31]. Кроме того, CF101 способствовал прогрессивному стабильному улучшению состояния пациентов с псориазом [31]. Важно отметить, что специфичность препарата в отношении А2AR, не вызывающая связывания с другими аденозиновыми рецепторами, способствует снижению нежелательных побочных эффектов.

Многие препараты, в частности пентостатин, этанерцепт, микофенолат мофетил, денилейкин дифтитокс, метотрексат, CF101, алемтузумаб, сиролимус, циклофосфамид, такролимус, пентоксифиллин, денозин, метилпреднизолон, дипиридамол, в данный момент находятся на разных этапах исследований. Последние в большинстве своем оценивают эффективность препаратов при лечении и предупреждении РТПХ, а также эндотоксемии, псориаза, остеоартроза, воспаления, острого панкреатита, рака почки, серповидноклеточной анемии, В-талассемии, ревматоидного артрита [75].

Доступные стратегии терапии злокачественных новообразований через блокирование аденозиновых путей регуляции можно разделить на три категории: 1) блокада синтеза аденозина опухолью, тканями, иммунными клетками; 2) блокирование или предупреждение аденозинового сигналинга через аденозиновые рецепторы на поверхности клеток; 3) ингибирование эффектов аденозина внутри клеток-мишеней [6, 102].

Понимание глубоких механизмов влияния пуринергического сигналинга на функции иммунных клеток дает многообещающие возможности терапии сепсиса и системного воспаления. Стратегия фармакологической терапии, повышающей тканезащитные функции аденозина, может включать в себя препараты, повышающие ферментативное расщепление АТФ, либо ингибирующие ферментативную деградацию или поглощение аденозина. В настоящее время доступен целый ряд подтипов агонистов и антагонистов аденозиновых рецепторов [40]. Два клинических исследования IIa фазы продемонстрировали, что функция почек у пациентов с сепсис-ассоциированной острой почечной недостаточностью улучшалась в случае применения щелочной фосфатазы [41, 80]. Благоприятные эффекты были связаны с дефосфорилированием ЛПС и АТФ, выделяемым тканями при воспалении и гипоксии [79]. Эти результаты демонстрируют перспективный потенциал использования АТФ в качестве терапевтической мишени [60].

Однако, по причине высокого распространения и неселективности экспрессии пуринергических рецепторов, возможно появление нежелательных побочных эффектов. Как правило, это супрессивные эффекты в отношении сердечно-сосудистой системы, в частности связанные с вовлечением А1- и А3-агонистов [94].

Заключение

В настоящее время установлено, что многие физиологические и патологические процессы, такие, как воспаление, опухолевый рост, кальцификация, развитие реакций отторжения трансплантата, регулируются через пуринергическую

систему. Последняя представляет собой систему взаимодействия АТФ и его метаболитов с соответствующими рецепторами — поверхностные рецепторные молекулы, участвующие в регулировании уровня внеклеточного АТФ. При этом пуринергическая регуляция может оказаться перспективным объектом для фармакотерапии многих заболеваний человека. Однако, в связи с широким распространением данной системы регуляции в тканях и органах, высока вероятность развития осложнений применения таких терапевтических подходов, так как отсутствие избирательности действия может снижать их эффективность.

Список литературы / References

1. Головкин А.С., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Малашичева А.Б., Шишкова А.А., Жидулева Е.В., Иртюга О.Б., Моисеева О.М. Кальциноз аортального клапана: субпопуляционный состав циркулирующих Т-клеток и пуринергическая регуляция // Российский иммунологический журнал, 2016, Т. 10 (19), № 2 (1). С. 189-191. [Golovkin A.S., Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K., Malashicheva A.B., Shishkova A.A., Zhiduleva E.V., Irtuga O.B., Moiseeva O.B. Calcified aortic stenosis: peripheral T-cells subpopulations and purinergic regulation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2016, Vol. 10 (19), no. 2 (1), pp. 189-191. (In Russ.)]
2. Матвеева В.Г., Головкин А.С., Чернова М.Н., Кудрявцев И.В., Иванов С.В., Григорьев Е.В. Влияние цитозольной фракции кардиомиоцитов и липополисахарида на функцию моноцитов // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 5. С. 439-448. [Matveeva V.G., Golovkin A.S., Chernova M.N., Kudryavtsev I.V., Ivanov S.V., Grigoriev E.V. Effects of myocardial cytosolic fraction and lipopolysaccharide upon monocytic functions. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 5, pp. 439-448. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-5-439-448.
3. Матвеева В.Г., Головкин А.С., Антонова Л.В., Кудрявцев И.В., Иванов С.В., Григорьев Е.В., Артымук Н.В., Тришкин А.Г. Влияние продуктов механического повреждения миокарда, Lps и их сочетания на эндотелиальные клетки из пупочной вены человека // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 4. С. 361-366. [Matveeva V.G., Golovkin A.S., Antonova L.V., Kudryavtsev I.V., Ivanov S.V., Grigoriev E.V., Artymuk N.V., Trishkin A.G., Bikmetova E.S. Impact of mechanical myocardial injury products, Lps and their combination on human umbilical vein endothelial cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 4, pp. 361-366. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-4-361-366.
4. Abbracchio M.P., Burnstock G., Boeynaems J.M., Barnard E.A., Boyer J.L., Kennedy C., Knight G.E., Fumagalli M., Gachet C., Jacobson K.A., Weisman G.A. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.*, 2006, Vol. 58, no. 3, pp. 281-341.
5. Antonioli L., Pacher P., Vizi E.S., Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.*, 2013, Vol. 19, no. 6, pp. 355-367.
6. Antonioli L., Yegutkin G.G., Pacher P., Blandizzi C., Haskó G. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: Awakening new opportunities. *Trends in Cancer*, 2016, Vol. 2, no. 2, pp. 95-109.
7. Barbarash L., Kudryavtsev I., Rutkovskaya N., Golovkin A. T cell response in patients with implanted biological and mechanical prosthetic heart valves. *Mediat. Inflammation*, 2016, Vol. 2016, Article ID 1937564, 12 p. doi: 10.1155/2016/1937564.
8. Barletta K.E., Ley K., Mehrad B. Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2012, Vol. 32, no. 4, pp. 856-864.
9. Bhattarai S., Freundlieb M., Pippel J., Meyer A., Abdelrahman A., Lee S., Zimmermann H., Yegutkin G.G., Sträter N., El-Tayeb A., Müller C.E. Supporting Information α , β -Methylene-ADP (AOPCP) derivatives and analogs: development of potent and selective ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibitors. *J. Med. Chem.*, 2015, Vol. 58, no. 15, pp. 1-25.
10. Blume C., Felix A., Shushakova N., Gueler F., Falk C.S., Haller H., Schrader J. Autoimmunity in CD73/Ecto-5'-nucleotidase deficient mice induces renal injury. *Cámara NOS, ed. PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 5, e37100. doi:10.1371/journal.pone.0037100.
11. Borsellino G., Kleinewietfeld M., di Mitri D., Sternjak A., Diamantini A., Giometto R., Höpner S., Centonze D., Bernardi G., Dell'Acqua M.L., Rossini P.M., Battistini L., Röttschke O., Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 4, pp. 1225-1232.
12. Botta Gordon-Smith S., Ursu S., Eaton S., Moncrieffe H., Wedderburn L.R. Correlation of low CD73 expression on synovial lymphocytes with reduced adenosine generation and higher disease severity in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, 2015, Vol. 67, no. 2, pp. 545-554.

13. Bours M.J.L., Swennen E.L.R., di Virgilio F., Cronstein B.N., Dagnelie P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.*, 2006, Vol. 112, no. 2, pp. 358-404.
14. Burnstock G. Purinerbic nerves. *Pharmacol. Rev.*, 1972, Vol. 24, no. 3, pp. 509-581.
15. Bynoe M.S., Waickman A.T., Mahamed D.A., Mueller C., Mills J.H., Czopik A. CD73 is critical for the resolution of murine colonic inflammation. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012, Vol. 2012, pp. 1-13.
16. Chen J.F., Eltzschig H.K., Fredholm B.B. Adenosine receptors as drug targets – what are the challenges? *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2013, Vol. 12, no. 4, pp. 265-286.
17. Chrobak P., Charlebois R., Rejtar P., El Bikai R., Allard B., Stagg J. CD73 plays a protective role in collagen-induced arthritis. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 6, pp. 2487-2492.
18. Colgan S.P., Colgan S.P., Eltzschig H.K., Eckle T., Thompson L.F. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinerbic Signalling*, 2006, no. 2 (2), pp. 351-360.
19. Cote N., Husseini D.E., Pepin A., Guauque-Olarte S., Ducharme V., Bouchard-Cannon P., Audet A., Fournier D., Gaudreault N., Derbali H., McKee M.D., Simard C., Després J.P., Pibarot P., Bossé Y., Mathieu P. ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2012, Vol. 52, no. 5, pp. 1191-1202.
20. Coutinho-Silv R., Knight G.E., Burnstock G. Impairment of the splenic immune system in P2X(2)/P2X(3) knockout mice. *Immunobiology*, 2005, Vol. 209, no. 9, pp. 661-668.
21. Cronstein B.N., Montesinos M.C., Weissmann G. Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NFκB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, Vol. 96, no. 11, pp. 6377-6381.
22. Cruz C.M., Rinna A., Forman H.J., Ventura A.L., Persechini P.M., Ojcius D.M. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.*, 2007, Vol. 282, no. 5, pp. 2871-2879.
23. Csóka B., Himer L., Selmeczy Z., Vizi E.S., Pacher P., Ledent C., Deitch E.A., Spolarics Z., Németh Z.H., Haskó G. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J.*, 2008, Vol. 22, no. 10, pp. 3491-3499.
24. Day Y.-J., Huang L., McDuffie M.J., Rosin D.L., Ye H., Chen J.-F., Schwarzschild M.A., Fink J.S., Linden J., Okusa M.D. Renal protection from ischemia mediated by A2A adenosine receptors on bone marrow-derived cells. *J. Clin. Invest.*, 2003, Vol. 112, no. 6, pp. 883-891.
25. Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen J.-F., Enjyoji K., Linden J., Oukka M., Kuchroo V.K., Strom T.B., Robson S.C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 6, pp. 1257-1265.
26. Dwyer K.M., Deaglio S., Gao W., Friedman D., Strom T.B., Robson S.C. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinerbic Signal*, 2007, Vol. 3, no. 1-2, pp. 171-180.
27. Dwyer K.M., Hanidziar D., Putheti P., Hill P.A., Pommey S., McRae J.L., Winterhalter A., Doherty G., Deaglio S., Koulmanda M., Gao W., Robson S.C., Strom T.B. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4⁺CD25⁺ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am. J. Transplant.*, 2010, Vol. 10, no. 11, pp. 2410-2420.
28. Eltzschig H.K., Thompson L.F., Karhausen J., Cotta R.J., Ibla J.C., Robson S.C., Colgan S.P. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood*, 2004, Vol. 104, no. 13, pp. 3986-3992.
29. Faas M.M., Sáez T., de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: the Yin and Yang in immune responses? *Mol. Aspects Med.*, 2017, Vol. 55, pp. 9-19.
30. Fish R.S., Klootwijk E., Tam F.W.K., Kleta R., Wheeler D.C., Unwin R.J., Norman J. ATP and arterial calcification. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 43, pp. 405-412.
31. Fishman P., Bar-Yehuda S., Liang B.T., Jacobson K. Pharmacological and therapeutic effects of A3 adenosine receptor agonists. *Drug. Discov. Today*, 2012, Vol. 17, no. 7-8, pp. 359-366.
32. Fleisch H., Schibler D., Maerki J. E.I. Inhibition of aortic calcification by means of pyrophosphate and polyphosphates. *Nature*, 1965, Vol. 207, pp. 1300-1301.
33. Franceschini A., Capece M., Chiozzi P., Falzoni S., Sanz J.M., Sarti A.C., Bonora M., Pinton P., Di Virgilio F. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB J.*, 2015, Vol. 29, no. 6, pp. 2450-2461.
34. Gallos G. A1 adenosine receptor knockout mice exhibit increased mortality, renal dysfunction, and hepatic injury in murine septic peritonitis. *AJP Ren. Physiol.*, 2005, Vol. 289, no. 2, pp. F369-F376.
35. Gibson D.J., Elliott L., McDermott E., Tosetto M., Keegan D., Byrne K., Martin S.T., Rispens T., Cullen G., Mulcahy H.E., Cheifetz A.S., Moss A.C., Robson S.C., Doherty G.A., Ryan E.J. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2015, Vol. 21, no. 12, pp. 2806-2814.
36. Giménez-Llort L., Fernández-Teruel A., Escorihuela R.M., Fredholm B.B., Tobeña A., Pekny M., Johansson B. Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur. J. Neurosci.*, 2002, Vol. 16, no. 3, pp. 547-550.
37. Grenz A., Zhang H., Hermes M., Eckle T., Klingel K., Huang D.Y., Muller C.E., Robson S.C., Osswald H., Eltzschig H.K. Contribution of E-NTPDase1 (CD39) to renal protection from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.*, 2007, Vol. 21, pp. 2863-2873.
38. Grol M.W., Panupinthu N., Korcok J., Sims S.M. Expression, signalling, and function of P2X7 receptors in bone. *Purinerbic Signal*, 2009, Vol. 5, pp. 205-221.
39. Hart M.L., Gorzolla I.C., Schittenhelm J., Robson S.C., Eltzschig H.K. SP1-dependent induction of CD39 facilitates hepatic ischemic preconditioning. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, pp. 4017-4024.

40. Haskó G., Linden J., Cronstein B., Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2008, Vol. 7, no. 9, pp. 759-770.
41. Heemskerck S., Masereeuw R., Moesker O., Bouw M.P.W.J.M., van der Hoeven J.G., Peters W.H.M., Russel F.G.M., Pickkers P. Alkaline phosphatase treatment improves renal function in severe sepsis or septic shock patients. *Crit. Care Med.*, 2009, Vol. 37, no. 2, pp. 417-423.
42. Hill L.M., Gavala M.L., Lenertz L.Y., Bertics P.J. Extracellular ATP may contribute to tissue repair by rapidly stimulating purinergic receptor X7-dependent vascular endothelial growth factor release from primary human monocytes. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 5, pp. 3028-3034.
43. Horenstein A.L., Chillemi A., Zaccarello G., Bruzzone S., Quarona V., Zito A., Serra S., Malavasi F. CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncotarget*, 2013, Vol. 2, no. 9, e26246. doi:10.4161/onci.26246.
44. Horrigan L.A., Kelly J.P., Connor T.J. Immunomodulatory effects of caffeine: Friend or foe? *Pharmacol. Ther.*, 2006, Vol. 111, no. 3, pp. 877-892.
45. Hoskin D.W., Mader J.S., Furlong S.J., Conrad D.M., Blay J. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (review). *Int. J. Oncol.*, 2008, Vol. 32, pp. 527-535.
46. Idzko M., Ferrari D., Eltzschig H.K. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, 2014, Vol. 509, no. 7500, pp. 310-317.
47. Johansson B., Halldner L., Dunwiddie T.V., Masino S.A., Poelchen W., Giménez-Llort L., Escorihuela R.M., Fernández-Teruel A., Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X.J., Hårdemark A., Betsholtz C., Herlenius E., Fredholm B.B. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, Vol. 98, no. 16, pp. 9407-9412.
48. Junger W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 3, pp. 201-212.
49. Kaniewska E., Sielicka A., Sarathchandra P., Pelikant-Matecka I., Olkowicz M., Słomińska E.M., Chester A.H., Yacoub M.H., Smoleński R.T. Immunohistochemical and functional analysis of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) in pig aortic valves. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2014, Vol. 33, no. 4-6, pp. 305-312.
50. Kanneganti T.D., Lamkanfi M., Nunez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, 2007, Vol. 27, no. 4, pp. 549-559.
51. Kauffenstein G., Fürstenau C.R., D'Orleans-Juste P., Sevigny J. The ecto-nucleotidase NTPDase1 differentially regulates P2Y1 and P2Y2 receptor-dependent vasorelaxation. *Br. J. Pharmacol.*, 2010, Vol. 159, pp. 576-585.
52. Kobayashi S., Zimmermann H., Millhorn D.E. Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport. *J. Neurochem.*, 2001, Vol. 74, no. 2, pp. 621-632.
53. Kohler D., Eckle T., Faigle M., Grenz A., Mittelbronn M., Laucher S., Hart M.L., Robson S.C., Müller C.E., Eltzschig H.K. CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 2007, Vol. 116, no. 19, pp. 1784-1794.
54. Koscsó B., Csóka B., Selmeczy Z., Himer L., Pacher P., Virág L., Haskó G. Adenosine augments IL-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 1, pp. 445-453.
55. Kreth S., Ledderose C., Luchting B., Weis F., Thiel M. Immunomodulatory properties of pentoxifylline are mediated via adenosine-dependent pathways. *Shock*, 2010, Vol. 34, no. 1, pp. 10-16.
56. Kronlage M., Song J., Sorokin L., Isfort K., Schwerdtle T., Leipziger J., Robaye B., Conley P.B., Kim H.-C., Sargin S., Schon P., Schwab A., Hanley P.J. Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal*, 2010, Vol. 3, no. 132, ra55. doi: 10.1126/scisignal.2000588.
57. Whiteside T.L., Mandapathil M., Schuler P. The role of the adenosinergic pathway in immunosuppression mediated by human regulatory T cells (Treg). *Curr. Med. Chem.*, 2011, Vol. 18, no. 34, pp. 5217-5223.
58. Lazar Z., Mullner N., Lucattelli M., Ayata C., Korcan Cicko S., Yegutkin G.G., Cunto G.D., Muller T., Meyer A., Hossfeld M., Sorichter S., Horvath I., Virchow C.J., Robson S.C., Lungarella G., Idzko M. NTPDase1/CD39 and aberrant purinergic signalling in the pathogenesis of COPD. *Eur. Respir. J.*, 2016, Vol. 47, no. 1, pp. 254-263.
59. Lazarowski E.R. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal*, 2012, Vol. 8, no. 3, pp. 359-373.
60. Ledderose C., Bao Y., Kondo Y., Fakhari M., Slubowski C., Zhang J., Junger W.G. Purinergic signaling and the immune response in sepsis: a review. *Clin. Ther.*, 2016, Vol. 38, no. 5, pp. 1054-1065.
61. Ledderose C., Bao Y., Ledderose S., Woehrle T., Heinisch M., Yip L., Zhang J., Robson S.C., Shapiro N.I. Mitochondrial dysfunction, depleted purinergic signaling, and defective T cell vigilance and immune defense. *J. Infect. Dis.*, 2016, Vol. 213, no. 3, pp. 456-464.
62. Lee H.T., Kim M., Joo J.D., Gallos G., Chen J.-F., Emala C.W. A3 adenosine receptor activation decreases mortality and renal and hepatic injury in murine septic peritonitis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2006, Vol. 291, no. 4, pp. R959-R969.
63. Lépine S., Le Stunff H., Lakatos B., Sulpice J.C., Giraud F. ATP-induced apoptosis of thymocytes is mediated by activation of P2X7 receptor and involves de novo ceramide synthesis and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell. Biol. Lipids*, 2006, Vol. 1761, no. 1, pp. 73-82.
64. Lomashvili K.A. Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005, Vol. 16, pp. 2495-2500.
65. Mandapathil M., Lang S., Gorelik E., Whiteside T.L. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J. Immunol. Methods*, 2009, Vol. 346, pp. 55-63.

66. Mandapathil M., Hilldorfer B., Szczepanski M.J., Czystowska M., Szajnik M., Ren J., Lang S., Jackson E.K., Gorelik E., Whiteside T.L. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *J. Biol. Chem.*, 2010, Vol. 285, no. 10, pp. 7176-7186.
67. Mandapathil M., Szczepanski M.J., Szajnik M., Ren J., Jackson E.K., Johnson J.T., Gorelik E., Lang S., Whiteside T.L. Adenosine and prostaglandin E2 cooperate in the suppression of immune responses mediated by adaptive regulatory T cells. *J. Biol. Chem.*, 2010, Vol. 285, no. 36, pp. 27571-27580.
68. Manohar M., Hirsh M.I., Chen Y., Woehrle T., Karande A.A., Junger W.G. ATP release and autocrine signaling through P2X4 receptors regulate $\gamma\delta$ T cell activation. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, Vol. 92, no. 4, pp. 787-794.
69. Martin C., Leone M., Viviani X., Ayem M.-L., Guieu R. High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit. Care Med.*, 2000, Vol. 28, no. 9, pp. 3198-3202.
70. Massie B.M., O'Connor C.M., Metra M., Ponikowski P., Teerlink J.R., Cotter G., Weatherley B.D., Cleland J.G.F., Givertz M.M., Voors A., DeLuca P., Mansoor G.A., Salerno C.M., Bloomfield D.M., Dittrich H.C. Rolofylline, an adenosine A1-receptor antagonist, in acute heart failure. *N. Engl. J. Med.*, 2010, Vol. 363, no. 15, pp. 1419-1428.
71. Muller-Haegle S., Muller L., Whiteside T.L. Immunoregulatory activity of adenosine and its role in human cancer progression. *Expert. Rev. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 10, no. 7, pp. 897-914.
72. O'Neill W.C., Sigris M.K., McIntyre C.W. Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transpl.*, 2010, Vol. 25, pp. 187-191.
73. Németh Z.H., Csóka B., Wilmanski J., Xu D.Z., Lu Q., Ledent C., Deitch E.A. Adenosine A2A receptor inactivation increases survival in polymicrobial sepsis. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 9, pp. 5616-5626.
74. Ohta A., Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, 2001, Vol. 414, no. 6866, pp. 916-920.
75. de Oliveira B.M., Carvalho J.L., Saldanha-Araujo F. Adenosine production: a common path for mesenchymal stem-cell and regulatory T-cell-mediated immunosuppression. *Purinergic Signal*, 2016, Vol. 12, no. 4, pp. 595-609.
76. Orriss I., Syberg S., Wang N., Robaye B., Gartland A., Jorgensen N., Arnett T., Boeynaems J.M. Bone phenotypes of P2 receptor knockout mice. *Front. Biosci. Sch.*, 2011, Vol. 3, pp. 1038-1046.
77. Orriss I.R., Burnstock G., Arnett T.R. Purinergic signalling and bone remodelling. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2010, Vol. 3, pp. 322-330.
78. del Papa B., Pierini A., Sportoletti P., Baldoni S., Cecchini D., Rosati E., Dorillo E., Aureli P., Zei T., Iacucci Ostini R., Ruggeri L., Carotti A., Velardi A., Negrin R., Martelli M.F., Falzetti F., di Ianni M. The NOTCH1/CD39 axis: a Treg trip-switch for GvHD. *Leukemia*, 2016, Vol. 30, no. 9, pp. 1931-1934.
79. Peters E., Heemskerk S., Masereeuw R., Pickkers P. Alkaline phosphatase: a possible treatment for sepsis-associated acute kidney injury in critically ill patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 2014, Vol. 63, no. 6, pp. 1038-1048.
80. Pickkers P., Heemskerk S., Schouten J., Laterre P.-F., Vincent J.-L., Beishuizen A., Jorens P.G., Spapen H., Bulitta M., Peters W.H.M., van der Hoeven J.G., Derzko A., Romaschin A. Alkaline phosphatase for treatment of sepsis-induced acute kidney injury: a prospective randomized double-blind placebo-controlled trial. *Crit. Care*, 2012, Vol. 41, Suppl. 7, pp. 849-855.
81. Ramakers B.P., Riksen N.P., van den Broek P., Franke B., Peters W.H.M., van der Hoeven J.G., Smits P., Pickkers P. Circulating adenosine increases during human experimental endotoxemia but blockade of its receptor does not influence the immune response and subsequent organ injury. *Crit. Care*, 2011, Vol. 15, no. 1, R3. doi: 10.1186/cc9400.
82. Ramakers B.P., Wever K.E., Kox M., van den Broek P.H., Mbuyi F., Rongen G., Masereeuw R., van der Hoeven J.G., Smits P., Riksen N.P., Pickkers P. How systemic inflammation modulates adenosine metabolism and adenosine receptor expression in humans *in vivo*. *Crit. Care Med.*, 2012, Vol. 40, no. 9, pp. 2609-2616.
83. Reutershan J., Vollmer I., Stark S., Wagner R., Ngamsri K.C., Eltzschig H.K. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *FASEB J.*, 2009, Vol. 23, pp. 473-482.
84. Ring S., Pushkarevskaya A., Schild H., Probst H.C., Jendrossek V., Wirsdörfer F., Ledent C., Robson S.C., Enk A.H., Mahnke K. Regulatory T cell-derived adenosine induces dendritic cell migration through the Epac-Rap1 pathway. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 8, pp. 3735-3744.
85. Robson S.C., Sevigny J., Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*, 2006, Vol. 2, pp. 409-430.
86. Salvatore C.A., Tilley S.L., Latour A.M., Fletcher D.S., Koller B.H., Jacobson M.A. Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J. Biol. Chem.*, 2000, Vol. 275, no. 6, pp. 4429-4434.
87. Sansom F.M., Newton H.J., Crikis S., Cianciotto N.P., Cowan P.J., d'Apice A.J., Hartland E.L. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.*, 2007, Vol. 9, pp. 1922-1935.
88. Santos R.F., Possa M.A., Bastos M.S., Guedes P.M., Almeida M.R., M.R., Demarco R., Verjovski-Almeida S., Bahia M.T., Fietto J.L. Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2009, Vol. 3, e387. doi: 10.1371/journal.pntd.0000387.
89. Sattler C., Steinsdoerfer M., Offers M., Fischer E., Schierl R., Heseler K., Däubener W., Seissler J. Inhibition of T-cell proliferation by murine multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by CD39 expression and adenosine generation. *Cell Transplant.*, 2011, Vol. 20, no. 8, pp. 1221-1230.
90. Schenk U., Frascoli M., Proietti M., Geffers R., Traggiai E., Buer J., Ricordi C., Westendorf A.M., Grassi F. ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci Signal*, 2011, Vol. 4, no. 162, ra12. doi: 10.1126/scisignal.2001270.

91. Schingnitz U, Hartmann K, Macmanus C.F, Eckle T, Zug S, Colgan S.P, Eltzschig H.K. Signaling through the A2B Adenosine receptor dampens endotoxin-induced acute lung injury. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 9, pp. 5271-5279.
92. Schuchardt M, Tolle M, Prufer J, Prufer N, Huang T, Jankowski V, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M. Uridine adenosine tetraphosphate activation of the purinergic receptor P2Y enhances *in vitro* vascular calcification. *Kidney Int.*, 2012, Vol. 81, pp. 256-265.
93. Stagg J, Smyth M.J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, 2010, Vol. 29, no. 39, pp. 5346-5358.
94. Sullivan G.W, Fang G, Linden J, Scheld W.M. A2A adenosine receptor activation improves survival in mouse models of endotoxemia and sepsis. *J. Infect. Dis.*, 2004, Vol. 189, no. 10, pp. 1897-1904.
95. Sumi Y, Woehrle T, Chen Y, Bao Y, Li X, Yao Y, Inoue Y, Tanaka H, Junger W.G. Plasma ATP is required for neutrophil activation in a mouse sepsis model. *Shock*, 2014, Vol. 42, no. 2, pp. 142-147.
96. Surprenant A, North R.A. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev. Physiol.*, 2009, Vol. 71, no. 1, pp. 333-359.
97. Thompson L.F, Tsukamoto H, Chernogorova P, Zeiser R. A delicate balance: CD73-generated adenosine limits the severity of graft vs. host disease but also constrains the allogeneic graft vs tumor. *Oncoimmunology*, 2013, Vol. 2, no. 1, e22107. doi:10.4161/onci.22107.
98. Trabanelli S, Očadlíková D, Gulinelli S, Curti A, Salvestrini V, de Paula Vieira R, Idzko M, Di Virgilio F, Ferrari D, Lemoli R.M. Extracellular ATP exerts opposite effects on activated and regulatory CD4⁺ T cells via purinergic P2 receptor activation. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 3, pp. 1303-1310.
99. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 3, pp. 210-215.
100. Tsukamoto H, Chernogorova P, Ayata K, Gerlach U.V, Rughani A, Ritchey J.W, Ganesan J, Follo M, Zeiser R, Thompson L.F, Idzko M. Deficiency of CD73/ecto-5'-nucleotidase in mice enhances acute graft-versus-host disease. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 19, pp. 4554-4564.
101. Wang L, Fan J, Chen S, Zhang Y, Curiel T.J, Zhang B. Graft-versus-host disease is enhanced by selective CD73 blockade in mice. Eckle T, ed. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 3, e58397. doi:10.1371/journal.pone.0058397.
102. Whiteside T.L. Targeting adenosine in cancer immunotherapy: a review of recent progress. *Expert. Rev. Anticancer. Ther.*, 2017, Vol. 17, no. 6, pp. 527-535.
103. Winchester R, Wiesendanger M, O'Brien W, Zhang H.-Z, Maurer M.S, Gillam L.D, Schwartz A, Marboe C, Stewart A.S. Circulating Activated and effector memory T cells are associated with calcification and clonal expansions in bicuspid and tricuspid valves of calcific aortic stenosis. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 2, pp. 1006-1014.
104. Woehrle T, Yip L, Elkhali A, Sumi Y, Chen Y, Yao Y, Insel P.A, Junger W.G. Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood*, 2010, Vol. 116, pp. 3475-3484.
105. Xing S, Grol M.W, Grutter P.H, Dixon S.J, Komarova S.V. Modeling interactions among individual P2 receptors to explain complex response patterns over a wide range of ATP concentrations. *Front. Physiol.*, 2016, Vol. 7, 294. doi: 10.3389/fphys.2016.00294.
106. Yaron J.R, Gangaraju S, Rao M.Y, Kong X, Zhang L, Su F, Tian Y, Glenn H.L, Meldrum D.R. K⁺ regulates Ca²⁺ to drive inflammasome signaling: dynamic visualization of ion flux in live cells. *Cell Death Dis.*, 2015, Vol. 6, e1954. doi: 10.1038/cddis.2015.277.
107. Yegutkin G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, Vol. 1783, no. 5, pp. 673-694.
108. Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel P.A, Junger W.G. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J.*, 2009, Vol. 23, no. 6, pp. 1685-1693.

Авторы:

Головкин А.С. — д.м.н., руководитель группы, Институт молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

Асадуллина И.А. — младший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, 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 академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Golovkin A.S., PhD, MD (Medicine), Head of a Research Group, Institute of Molecular Biology and Genetics, V.A. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Asadullina I.A., Junior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Поступила 01.10.2017

Отправлена на доработку 10.10.2017

Принята к печати 16.10.2017

Received 01.10.2017

Revision received 10.10.2017

Accepted 16.10.2017

ИНТЕРЛЕЙКИН-33 И ФИБРОЗ: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ПАТОГЕНЕЗ

Учасова Е.Г.¹, Груздева О.В.^{1,2}, Дылева Ю.А.¹, Каретникова В.Н.^{1,2}

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

² ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Резюме. Интерлейкин-33 (IL-33) член семейства IL-1, который широко экспрессируется во всех типах клеток. IL-33 был идентифицирован как функциональный лиганд для рецепторного комплекса плазматической мембраны, который представляет собой гетеродимер, состоящий из связанного с мембраной рецептора ST2 (стимулирующий фактор роста). IL-33 участвует в развитии иммунного ответа с преимущественным высвобождением провоспалительных цитокинов Т-хелперов 2 типа. IL-33 широко экспрессируется в различных структурных клетках, таких как эпителиальные, эндотелиальные и клетки гладкой мускулатуры. Во время некроза из этих клеток (после повреждения ткани или повреждения клеток) экспрессия IL-33 увеличивается, и он высвобождается во внеклеточное пространство и действует как сигнал эндогенной опасности, отправляя предупреждающие сигналы на соседние клетки и ткани. В последнее время появилось много исследований, в которых показано, что IL-33 может участвовать в механизме развития и прогрессирования фиброза различных органов, но при этом оказывает противовоспалительное действие на механизмы развития других заболеваний. В данном обзоре будут обсуждаться биологические характеристики IL-33 и роль сигнального пути IL-33/ST2 в развитии фиброза.

Ключевые слова: интерлейкин-33, фиброз, стимулирующий фактор роста

INTERLEUKIN 33 AND FIBROSIS: PATHOGENESIS UPDATED

Uchasova E.G.^a, Gruzdeva O.V.^{a,b}, Dileva Yu.A.^a, Karetnikova V.N.^{a,b}

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

^b Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Interleukin 33 (IL-33) is a member of the IL-1 family, which is widely expressed on all types of cells. IL-33 was identified as a functional ligand for the plasma membrane receptor complex, which is a heterodimer consisting of a membrane bound ST2 receptor (growth stimulating factor). IL-33 is involved in the development of immune response with predominant release of pro-inflammatory T helper type 2 cytokines. IL-33 is widely expressed on various structure-forming cells, such as epithelial, endothelial and smooth muscle cells. Increased expression of IL-33 is observed during necrosis of these cells (after tissue or cell damage), and it is released into extracellular space, and acts as an endogenous danger signal, sending a sort of warnings to neighboring cells and tissues. Recently, many studies have shown that IL-33 can participate in development and progression of fibrosis in various organs. However, it exerts anti-inflammatory effects upon development of other diseases. This review will discuss biological characteristics of IL-33 and a role of the IL-33/ST2 signaling pathway in the development of fibrosis.

Keywords: interleukin 33, fibrosis, growth-stimulating factor

Адрес для переписки:

Учасова Евгения Геннадьевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.
Тел.: 8 (3842) 64-05-53.
E-mail: evg.uchasova@yandex.ru

Address for correspondence:

Uchasova Evgenya G.
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy bulvd, 6.
Phone: 7 (3842) 64-05-53.
E-mail: evg.uchasova@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Учасова, О.В. Груздева, Ю.А. Дылева, В.Н. Каретникова «Интерлейкин-33 и фиброз: современный взгляд на патогенез» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 477-484.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-477-484

© Учасова Е.Г. и соавт., 2018

For citation:

E.G. Uchasova, O.V. Gruzdeva, Yu.A. Dileva, V.N. Karetnikova "Interleukin 33 and fibrosis: pathogenesis updated", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 477-484.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-477-484

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-477-484

Введение

IL-33 является членом семейства IL-1 (IL-F11) и обладает двойной функцией, действуя как традиционный внеклеточный цитокин, а также как внутриклеточный ядерный фактор, регулирующий транскрипцию гена [6, 17]. IL-33 проявляет свои биологические эффекты при связывании со своим рецептором ST2 (стимулирующий фактор роста 2, также называемый ST2L, член семейства IL-1R и IL-1RAcP) на плазматической мембране клеток [7, 34]. Связывание IL-33 с ST2L активирует сигнальные пути MyD88 и NF-κB [34]. IL-33 можно классифицировать как “alarmin” (тревожный сигнал), так как он высвобождается во внеклеточное пространство во время повреждения клеток или тканей и действует как сигнал эндогенной опасности, отправляя предупреждающие сигналы на соседние клетки и ткани [23]. Во многих работах было показано, что IL-33 тесно связан с развитием заболеваний сердечно-сосудистой системы, дыхательных путей, аллергией, ревматоидным артритом и диабетом [31, 35, 50]. Повторные повреждения клеток, хроническое воспаление могут вызвать чрезмерное накопление внеклеточных матричных компонентов, что, в свою очередь, способствует образованию фиброзного рубца [48]. Кроме того, исследования показали, что экспрессия IL-33 и ST2 изменяется при фиброзе. **Цель данного обзора** — изучить роль IL-33 в механизме развития фиброза различных органов.

Иммунобиология IL-33

Впервые IL-33 был обнаружен в 2003 году и назван ядерным фактором клеток высокого эндотелия венул из-за выполняемой им роли репрессора транскрипции [49]. В 2005 году Schmitz J. и соавт. идентифицировали IL-33 как член семейства IL-1 [41]. Ген человеческого IL-33 расположен на хромосоме 9p24.1, тогда как ген IL-33 мыши находится на хромосоме 19qC1. Они кодируют пептиды 270 и 266 кДа, соответствующие полноразмерным белкам-предшественникам массой 30 и 29,9 кДа каждый [11]. В условиях гомеостаза эндогенный IL-33 конститутивно экспрессируется в ядре клеток и может связываться с хроматином путем связывания гистонов H2A/H2B. Показано, что данный цитокин может функционировать как негистоновый хромосомный белок, вовлеченный в сборку нуклеопротеиновых комплексов, поддерживая и укрепляя структуру хроматина [41].

IL-33 широко экспрессируется в различных типах клеток, прежде всего в негемопоэтических, включая фибробласты, эндотелиальные клетки, адипоциты, бронхиальные и кишечные эпителиальные клетки [39, 48]. В гематопоэтических клетках, таких как активированные дендритные клетки и макрофаги, экспрессия IL-33 проходит на более низких уровнях [39, 48]. При апоптозе, некрозе клеток, клеточном стрессе или механи-

ческом повреждении тканей экспрессия увеличивается и IL-33 высвобождается во внеклеточное пространство [31]. После освобождения IL-33 целенаправленно воздействует на различные иммунные клетки, в том числе Т-клетки, базофилы, эозинофилы, тучные клетки, врожденные лимфоидные, дендритные клетки и макрофаги, запуская активацию воспаленного ответа [30, 31]. Было обнаружено, что повышенная экспрессия IL-33 наблюдается в эпителиальных клетках легких у пациентов с астмой [31, 38], а также в эпителиальных клетках дыхательных путей у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. Кроме того, в последнее время появляются данные об усиленной экспрессии IL-33 в гепатоцитах при гепатите и в колоноцитах при остром колите [38]. Таким образом, IL-33 действует в качестве сигнала повреждения и оповещения после инфекции или травмы на соседние клетки и ткани, в связи с этим он может влиять на широкий спектр заболеваний.

Клеточные мишени IL-33

Th1 и Th2 CD4⁺ Т-клетки

Хорошо известно, что IL-4 является ключевым цитокином для дифференцировки клеток Th2 из CD4⁺Т-клеток. ST2 преимущественно экспрессируется на клетках Th2-типа. Наивные Т-клетки реагируют *in vivo* на IL-33 продуцированием Th2-ассоциированных цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13 [30]. С другой стороны, ST2 не является существенным для дифференцировки Th2-типа клеток, как показано в исследованиях на ST2-дефицитных мышах (ST2^{-/-}), которые показали нормальное развитие Th2-клеток [18, 45]. У людей IL-33 усиливает продукцию не только цитокинов Th2-типа, но и цитокинов Th1-типа, например IFN γ , полученного из периферической крови, однако его продукция увеличивается незначительно. Кроме того, IL-33 действует как хемоаттрактант для Th2-, но не Th1-клеток [31, 39].

Тучные клетки, базофилы и эозинофилы

IL-33 является мощным индуктором провоспалительных медиаторов тучных клеток [16]. IL-33 стимулирует продуцирование провоспалительных цитокинов и хемокинов (IL-6, IL-1 β , TNF α , IL-8, IL-13, CCL1 и CXCL8) из тучных клеток человека [16] и синергирует с IgE для стимулирования производства цитокинов [10, 43]. Базофилы человека экспрессируют высокие уровни рецептора ST2 и реагируют на IL-33 с увеличением продуцирования IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) [44]. IL-33 синергически усиливает IgE-опосредованную декарбонизацию базофилов [44]. IL-33 индуцирует дегрануляцию эозинофилов и продуцирование IL-8 и супероксидного аниона [8], а также усиливает адгезию эозино-

филов путем стимулирования экспрессии CD11b независимо от IL-4, IL-5 и GM-CSF [8].

Макрофаги и дендритные клетки

IL-33 усиливает индуцированную LPS секрецию TNF α , IL-6 и IL-1 β в мышиных макрофагах [18]. При аллергическом воспалении дыхательных путей IL-33 усиливает опосредованную IL-13 поляризацию альтернативно активированных макрофагов и усиливает их продукцию CCL17 и CCL24 [18]. Также IL-33 способствует развитию дендритных клеток [31, 49]. Интересно, что стимулированные IL-33 дендритные клетки имели увеличенный уровень экспрессии главного комплекса гистосовместимости II типа (МНС-II) и корецепторной молекулы CD86, необходимых для взаимодействия с Т-лимфоцитами. Кроме того, они обладали более выраженной способностью активировать CD4⁺Т-лимфоциты, что проявлялось значительной продукцией IL-5 и IL-13 [39]. Таким образом, экспериментально было показано эффективное взаимодействие IL-33 и дендритных клеток с инициацией иммунного ответа в направлении Th2-типа.

Рецепторный комплекс IL-33

Рецепторный комплекс IL-33 состоит из двух цепей: α -цепи, представленной одиночным рецептором ST2L семейства IL-1, и β -цепи, являющейся общей для рецепторов семейства (IL1-RAcP – IL-1 ассоциированный белок). Обе молекулы рецепторного комплекса для IL-33 имеют Toll/IL-1R (TIR)-домен [17, 33, 50], необходимый для передачи сигнала внутрь клетки (рис. 1).

В настоящее время известны 3 альтернативные сплайсинговые изоформы ST2: мембранно-связанный рецептор ST2L, секретируемая растворимая форма sST2 и вариант формы ST2V. ST2L является членом надсемейства TLR/IL-1R. Он содержит 3 внеклеточных домена IgG, один трансмембранный домен и внутриклеточный домен TIR [17, 31]. ST2L экспрессируется в основном на тучных клетках и на Th2-клетках. Считается, что он является единственным рецептором для идентификации его лиганда IL-33, который активируется посредством связывания с ST2L и затем образует комплекс с IL-1R вспомогательным белком (IL-1RAcP). Образование этого комплекса приводит к последовательной активации MyD88, который активирует сигнальные пути NF- κ B и MAPK, увеличивая экспрессию Th2-ассоциированных цитокинов (IL-4, IL-5 и IL-13) [34] (рис. 1). В sST2 отсутствуют трансмембранные и внутриклеточные области TIR, при этом уровни sST2 увеличиваются в сыворотке пациентов, страдающих различными воспалительными заболеваниями [10]. Он может действовать как рецептор-приманка для IL-33, отрицательно регулируя Th2-опосредованные иммунологические ответы [10, 18]. В отличие от ST2L и sST2,

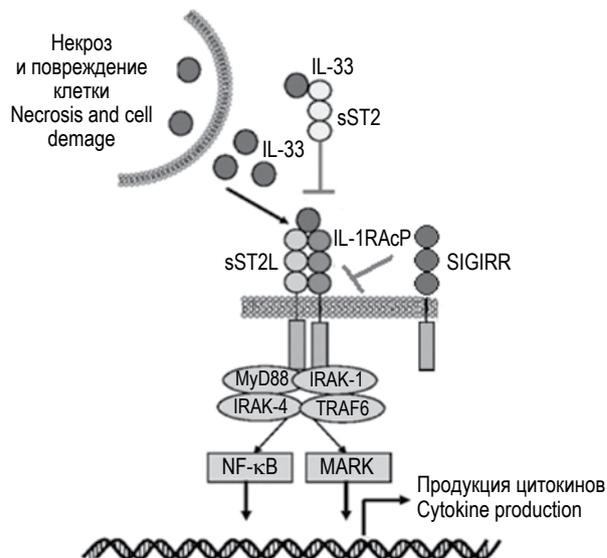


Рисунок 1. Сигнальный путь IL-33/ST2 (модифицировано из [32])

Figure 1. Signaling pathway of IL-33/ST2 (modified from [32])

ST2V широко распространен в желудке, тонком кишечнике и толстой кишке. Точная роль ST2V неизвестна [45, 49]. Другим членом семейства IL-1R, который взаимодействует с белками ST2, является SIGIRR. Он отрицательно регулирует IL-1R- и TLR-опосредованные иммунные ответы [18] и может образовывать комплекс вместе с ST2L для ингибирования IL-33/ST2 сигнального пути [14] (рис. 1). Более того, у SIGIRR $-/-$ мышей воспалительный ответ, индуцированный IL-33, усиливается [4].

IL-33 и фиброз

Фиброз – один из главных компонентов в прогрессировании большинства заболеваний. С момента доказательства роли фиброза в развитии дисфункции различных органов, особенно на конечных стадиях развития, процесс фиброза стали рассматривать в качестве перспективной терапевтической мишени. Однако, несмотря на огромное влияние фиброза на патогенез различных заболеваний, в настоящее время нет методов лечения, которые непосредственно влияют на механизмы фиброза [13]. Комплекс IL-33/ST2 связан с развитием широкого спектра фиброзных заболеваний, при этом как с положительными эффектами на одни заболевания, так отрицательными на другие.

IL-33 и фиброз сердца

Фиброз сердца является компонентом неадаптивной реакции желудочков сердца на патологическое ремоделирование миокарда [11, 13]. Считается, что взаимодействие миоцитов и фибробластов при биомеханической перегрузке приводит к пролиферации фибробластов и их отложению во внеклеточном матриксе, а затем к развитию гипертрофии желудочков серд-

ца и, как следствие, способствует повышению легочного и системного венозного давления, к одышке и периферическому отеку легких [3]. Кроме того, частой причиной смерти при сердечной недостаточности является летальная аритмия, являющаяся результатом фибротических изменений в миокарде желудочков или в проводящей системе сердца.

Хотя фиброз и образование рубцов подразумевают взаимодействие между кардиомиоцитами и фибробластами в поврежденном миокарде, клеточные и паракринные механизмы сигналинга остаются слабоопределенными. Доказательство того, что sST2 является биомаркером для биомеханического напряжения сердца, предполагает, что и система IL-33/ST2 может быть потенциальным патофизиологическим медиатором фиброза. В нескольких экспериментальных работах, выполненных на животных, было показано, что ген ST2 экспрессируется в костной ткани *in vitro* [17]. Эти данные повышают вероятность того, что ST2 участвует в росте или гомеостазе компонентов клеточного матрикса. Что касается сердечно-сосудистых заболеваний, было предложено возможное вовлечение sST2 в ремоделирование желудочков сердца.

В эксперименте на ST2 $-/-$ мышах проводили поперечное сужение миокарда, что приводило к тяжелой гипертрофии миоцитов и к последующему интерстициальному сердечному фиброзу по сравнению с мышами дикого типа (ST2 $+/+$). Кроме того, после перегрузки давлением лечение с помощью рекомбинантного IL-33 уменьшало гипертрофию и фиброз и повышало выживаемость у мышей дикого типа, но не у ST2 $-/-$ мышей [39]. Кроме того, IL-33 индуцирует антигипертрофические эффекты, уменьшает апоптоз и инфаркт кардиомиоцитов, улучшает функцию желудочков, подавляя активность каспазы-3 и увеличивая экспрессию белков ингибиторов апоптоза [42]. Способность sST2 блокировать антигипертрофические эффекты IL-33 указывает на то, что sST2 функционирует как рецептор-приманка для IL-33 в миокарде [42]. Поэтому сигнальный путь IL-33/ST2, вероятно, играет защитную роль в регулировании ответа миокарда на биомеханическую перегрузку в растянутых сердечных фибробластах и кардиомиоцитах [42]. Zhu J. и Carver W. обнаружили, что IL-33 напрямую не ингибирует продукцию коллагена I и коллагена II, а скорее увеличивает экспрессию IL-6 и MCP-1 дозозависимым образом [51]. Эти данные свидетельствуют о ранее не признанной кардиопротективной роли для передачи сигналов IL-33/ST2 в перекрестных связях фибробластов-кардиомиоцитов во время биомеханической перегрузки.

В последнее время появляются клинические исследования, в которых sST2 предлагают использовать в лабораторной диагностике в каче-

стве биомаркера стресса и фиброза кардиомиоцитов [30] и уровень sST2 для стратификации риска пациентов в постинфарктном периоде [2, 8]. После острого инфаркта миокарда экспрессия sST2 быстро повышается в течение первых 4 недель и, в отличие от IL-33, ее уровни коррелируют с текущими процессами фиброза и воспаления [40]. Кроме того, было показано, что антагонисты минералокортикоидных рецепторов уменьшают сердечный фиброз путем модуляции передачи сигналов IL-33/ST2 и галектина-3 [29]. В совокупности эти результаты показывают, что IL-33/ST2 играет защитную роль в сердечном фиброзе, а sST2 отрицательно регулирует этот путь как рецептор-приманка для IL-33.

IL-33 и атеросклероз

Атеросклероз — это хроническое воспалительное заболевание, характеризующееся образованием артериальных фиброзных бляшек и достаточно часто приводящее к развитию ИМ или инсульта. Клетки Th1- и Th2-пути являются ключевыми регуляторами этого заболевания, а регуляторные T-клетки действуют как важные регуляторы баланса Th1/Th2 [33, 34]. Было показано, что цитокины Th1-пути, такие как IL-12, IL-18 и IFN γ , способствуют развитию атеросклероза, тогда как Th2-цитокины IL-10, IL-5 и IL-13, напротив, имеют антиатерогенные эффекты. Первое исследование, связывающее IL-33 с атеросклерозом, показало, что IL-33 может играть защитную роль в развитии атеросклероза посредством индукции IL-5, что помогает контролировать баланс Th1/Th2 [5]. Miller A.M. и соавт. [29] также обнаружили, что IL-33 уменьшает атеросклеротические бляшки в аортальном синусе мышей. Кроме того, IL-33 увеличивает генерацию защитных аутоантител, специфичных для окисленного ЛПНП. Впоследствии McLaren J.E. и соавт. [28] показали, что IL-33 оказывает защитные эффекты при атеросклерозе, главным образом за счет уменьшения образования макрофагов, которые являются ключевой особенностью атеросклеротических бляшек. В различных экспериментах было показано, что IL-33 через свой рецептор может ингибировать экспрессию дезинтегрина, металлопротеиназы 1, 4, 5 и тромбоспондина, которые могут играть роль в регуляции устойчивости атеросклеротической бляшки [2]. Более того, IL-33 индуцирует увеличение регуляторных T-клеток. У мышей с атеросклерозом уровень ST2L в клетках CD4 $^+$ был снижен, при этом уровни sST2 в сыворотке крови были увеличены по сравнению с контрольными мышами, что может быть причиной снижения регуляторных T-клеток при атеросклерозе [46]. Недавнее исследование Nasan A. и соавт. [15] не только подтверждает результаты предыдущих исследований, но и показывает, что снижение уровня IL-33 может увеличить риск развития атероскле-

роза. Таким образом, IL-33 является частью антиатерогенного ответа и может служить новым маркером для прогнозирования повышенного риска развития атеросклероза.

IL-33 и фиброз легких

Фиброз является общим итогом для многих видов заболеваний легких. Легочный фиброз может развиваться вследствие нескольких причин: отягощенная наследственность, аутоиммунные нарушения, вирусные инфекции, радиация и некоторые лекарственные средства. Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) является наиболее распространенным интерстициальным заболеванием легких. Средняя выживаемость людей с легочным фиброзом колеблется от 2 до 3 лет после постановки диагноза [47], при этом патогенез ИЛФ до конца не понят. Было выдвинуто предположение, что травмы легкого приводят к разрушению альвеолярных эпителиальных клеток, что может привести к дисрегуляции процессов восстановления, пролиферации и миграции фибробластов и их превращению в миофибробласты, в дальнейшем к чрезмерному осаждению коллагена в мезенхиму легких и альвеолярного пространства [47]. В целом считается, что ИЛФ необратимое заболевание, но в настоящее время имеется 2 препарата (пирфенидон и нинтада닙), рекомендованных для лечения ИЛФ, однако влияние данных препаратов на протекание заболевания до сих пор является спорным [36].

Одной из причин развития ИЛФ является противоопухолевый препарат блеомицин. Во многих экспериментальных работах было показано, что блеомицин токсически действует на клетки легочной ткани, вызывая повреждение клеток, и стимулирует повышение экспрессии IL-33 [21, 24]. Так, Luzina I.G. и соавт. показали, что IL-33 является провоспалительным и профибротическим регулятором, который может потенцировать повреждение легких, вызванное блеомицином, путем стимуляции экспрессии нескольких цитокинов, таких как TGF- β , IL-6 и MCP-1 [24]. Также было показано, что экспрессия мРНК sST2 в легочной ткани блеомицин-индуцированного легочного фиброза была увеличена между 7 и 21 днями и достигла максимального уровня на 14-й день после лечения блеомицином, который статистически коррелирует с экспрессией мРНК TGF- β 1 [24]. Таким образом, увеличение sST2 может отражать развитие воспалительного процесса и иммунного ответа Th2-типа в фиброзной ткани легких [24]. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что IL-33, по-видимому, имеет провоспалительные и профибротические эффекты при легочном фиброзе, однако роль sST2 при легочном фиброзе пока не очень ясна.

IL-33 и фиброз печени

Различные острые или хронические стимуляции, такие как алкоголь, вирусная инфекция,

холестаза, наркотики, токсины и метаболические заболевания, являются наиболее распространенными причинами фиброза печени [12]. При постоянной стимуляции пациенты медленно прогрессируют до цирроза (состояние, характеризующееся искажением нормальной архитектуры, образованием перегородки и узелков, изменением кровотока, портальной гипертензией и гепатоцеллюлярной карциномой), что в конечном итоге приводит к печеночной недостаточности [20]. Ряд хронических травм печени может спровоцировать активацию звездчатых клеток печени (клетки Ито), которые играют центральную роль в патогенезе фиброза печени. Активированные клетки Ито не только выделяют цитокины и хемокины и взаимодействуют с иммунными клетками для активации иммунного ответа, но также способствуют ангиогенезу и регуляции окислительного стресса [20].

Белок IL-33 конститутивно экспрессируется в здоровой печени, при фиброзе печени у мыши и человека происходит увеличение уровня мРНК IL-33 и ST2. Кроме того, экспрессия белка IL-33 коррелирует с ST2 и экспрессией коллагена [26]. В нормальной печени основным источником IL-33 являются синусоидальные эндотелиальные клетки печени, но при фиброзе печени это в основном происходит за счет активированных звездчатых клеток печени. В эксперименте при стимуляции культивируемых клеток Ито провоспалительными цитокинами происходит увеличение экспрессии IL-33 [26]. В нескольких исследованиях на животных также подчеркивается роль IL-33 при тяжелом фиброзе печени. Так, McHedlidze T. и соавт. выявили, что IL-33 выделяется в ответ на хронический гепатоцеллюлярный стресс и что внеклеточный IL-33 через ST2-зависимый путь приводит к накоплению и активации врожденных лимфоидных клеток (ILC2) печени [27]. Активированные печеночные ILC2 продуцирует IL-13, который, в свою очередь, вызывает активацию и трансдифференцировку клеток Ито в зависимости от IL-4R α - и STAT6-зависимого фактора [26]. Более того, Li и соавт. [22] установили, что IL-33 повышен в сыворотке крови пациентов с атрезией желчевыводящих путей. Введение IL-33 мышам дикого типа заметно увеличивало пролиферацию холянгиоцитов и способствовало устойчивому росту клеток, что приводило к резкому и быстрому увеличению внепеченочных желчных протоков [22]. В связи с этим можно сказать, что сигнальный путь IL-33/ST2 имеет решающее значение для опосредованного фиброза печени.

IL-33 и фиброз кожи

IL-33 экспрессируется в дермальных эндотелиальных клетках и кератиноцитах, в свою оче-

редь ST2 слабо экспрессируется в эндотелиальных клетках и фибробластах [37]. Было показано, что введение IL-33 приводит к увеличению экспрессии мРНК IL-13 и развитию фиброза кожи. Ни у мышей с отсутствием IL-1RAcP (-/-) ни ST2 (-/-) не выявлено гистологических признаков воспаления или подкожного фиброза после лечения IL-33 [37]. Системный склероз представляет собой нарушение соединительной ткани, включая фиброз кожи или внутренних органов. У пациентов с системным склерозом происходит увеличение уровня IL-33 в сыворотке крови, при этом эти уровни коррелируют степенью склероза кожи [25]. Более того, Manetti M. и соавт. обнаружили, что у пациентов с ранним системным склерозом IL-33 отсутствовал в эндотелиальных клетках и эпидермисе, в то время как экспрессия ST2 значительно увеличивалась в эндотелиальных клетках, макрофагах, В-клетках, Т-клетках и активированных миофибробластах кожи. При повреждении эндотелиальных клеток IL-33 может быть мобилизован из эндотелиальных клеток, чтобы через ST2 стимулировать наработку иммунных клеток и фибробластов (миофибробластов) [25]. Эти данные показывают, что IL-33

может способствовать фиброзу кожи через рецептор ST2L.

Заключение

IL-33, новый член семейства IL-1, выполняет двойную роль в качестве цитокина и в качестве ядерного регулятора. В основном IL-33 действует как сигнальная молекула посредством связывания с ее мембранным рецептором ST2L и активирует последующую экспрессию гена. Недавние исследования показали, что IL-33 и ST2L аномально экспрессируются при различных заболеваниях. Несмотря на важные достижения, многие вопросы, касающиеся иммунологии IL-33, еще предстоит решить, включая его точные ядерные эффекты и процесс высвобождения IL-33 из клеток. С учетом различных эффектов IL-33 на любые разновидности фиброза, особенно его защитные эффекты при сердечном фиброзе и атеросклерозе, использовать IL-33 в качестве терапевтического препарата необходимо с осторожностью. Сигнальный путь IL-33/ST2 можно будет рассматривать как новую терапевтическую мишень для лечения множественных фиброзных заболеваний только тогда, когда механизмы его эффектов станут более понятны.

Список литературы / References

1. Ashlin T.G., Buckley M.L., Salter R.C., Johnson J.L., Kwan A.P., Ramji D.P. The anti-atherogenic cytokine interleukin-33 inhibits the expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-1, -4 and -5 in human macrophages: Requirement of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2014, Vol. 46, pp. 113-123.
2. Barbarash O., Gruzdeva O., Uchasova E., Dyleva Y., Belik E., Akbasheva O., Karetnikova V., Shilov A. Prognostic value of soluble ST2 during hospitalization for ST-segment elevation myocardial infarction. *Ann. Lab. Med.*, 2016, Vol. 36, no. 4, pp. 313-319.
3. Baudino T.A., Carver W., Giles W., Borg T.K. Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am. J. Physiol.*, 2006, Vol. 291, pp. 1015-1026.
4. Bulek K., Swaidani S., Qin J., Lu Y., Gulen M.F., Herjan T., Min B., Kastelein R.A., Aronica M., Kosz-Vnenchak M., Li X. The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 5, pp. 2601-2609.
5. Cardilo-Reis L., Gruber S., Schreier S.M., Drechsler M., Papac-Milicevic N., Weber C., Wagner O., Stangl H., Soehnlein O., Binder C.J. Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype. *EMBO Mol. Med.*, 2012, Vol. 4, pp. 1072-1086.
6. Carriere V., Roussel L., Ortega N., Lacorre D.A., Americh L., Aguilar L., Bouche G., Girard J.P. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, pp. 282-287.
7. Chackerian A.A., Oldham E.R., Murphy E.E., Schmitz J., Pflanz S., Kastelein R.A. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, pp. 2551-2555.
8. Cherry W.B., Yoon J., Bartemes K.R., Iijima K., Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 121, no. 6, pp. 1484-1490.
9. Daniels L.B., Bayes-Genis A. Using ST2 in cardiovascular patients: a review. *Future Cardiol.*, 2014, Vol. 10, no. 10, pp. 525-539.
10. Dieplinger B., Mueller T. Soluble ST2 in heart failure. *Clin. Chim. Acta.*, 2015, Vol. 443, pp. 57-70.
11. Diez J., Gonzalez A., Lopez B., Querejeta R. Mechanisms of disease: pathologic structural remodeling is more than adaptive hypertrophy in hypertensive heart disease. *Nature Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, 2005, Vol. 2, no. 4, pp. 209-216.
12. Friedman S.L. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J. Hepatol.* 2003, Vol. 38, no. 1, pp. 38-53.
13. Gao Q., Li Y., Li M. The potential role of IL-33/ST2 signaling in fibrotic diseases. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 98, no. 1, pp. 15-22.
14. Garlanda C., Anders H.J., Mantovani A. TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization. *Trends Immunol.*, 2009, Vol. 30, no. 9, pp. 439-446.

15. Hasan A., Al-Ghimlas F., Warsame S., Al-Hubail A., Ahmad R., Bennakhi A., Al-Arouj M., Behbehani K., Dehbi M., Dermime S. IL-33 is negatively associated with the BMI and confers a protective lipid/metabolic profile in non-diabetic but not diabetic subjects. *BMC Immunol.*, 2014, Vol. 15, p. 19.
16. Iikura M., Suto H., Kajiwara N., Oboki K., Ohno T., Okayama Y., Saito H., Galli S.J., Nakae S. IL-33 can promote survival adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab. Invest.*, 2007, Vol. 87, pp. 971-978.
17. Kakkar R., Lee R.T. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2008, Vol. 7, no. 10, pp. 827-840.
18. Kurowska-Stolarska M., Stolarski B., Kewin P., Murphy G., Corrigan C.J., Ying S., Pitman N., Mirchandani A., Rana B., van Rooijen N., Shepherd M., McSharry C., McInnes I.B., Xu D., Liew F.Y. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 10, pp. 6469-6477.
19. Lax A., Sanchez-Mas J., Asensio-Lopez M.C., Fernandez-Del Palacio M.J., Caballero L., Garrido I.P., Pastor-Perez F.J., Januzzi J.L., Pascual-Figal D.A. Mineralocorticoid receptor antagonists modulate galectin-3 and interleukin-33/ST2 signaling in left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction. *JACC Heart Fail.*, 2015, Vol. 3, no. 1, pp. 50-58.
20. Lee U.E., Friedman S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2011, Vol. 25, no. 2, pp. 195-206.
21. Li D., Guabiraba R., Besnard A.G., Komai-Koma M., Jabir M.S., Zhang L., Graham G.J., Kurowska-Stolarska M., Liew F.Y., McSharry C., Xu D. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 6, pp. 1422-1432.
22. Li J., Razumilava N., Gores G.J., Walters S., Mizuochi T., Mourya R., Bessho K., Wang Y.H., Glaser S.S., Shivakumar P., Bezerra J.A. Biliary repair and carcinogenesis are mediated by IL-33-dependent cholangiocyte proliferation. *J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 124, no. 7, pp. 3241-3251.
23. Liew F.Y., Pitman N.I., McInnes I.B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, pp. 103-110.
24. Luzina I.G., Kopach P., Lockatell V., Kang P.H., Nagarsekar A., Burke A.P., Hasday J.D., Todd N.W., Atamas S.P. Interleukin-33 potentiates bleomycin-induced lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2013, Vol. 49, no. 6, pp. 999-1008.
25. Manetti M., Ibba-Manneschi L., Liakouli V., Guiducci S., Milia A.F., Benelli G., Marrelli A., Conforti M.L., Romano E., Giacomelli R., Matucci-Cerinic M., Cipriani P. The IL-1-like cytokine IL-33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, Vol. 69, no. 3, pp. 598-605.
26. Marvie P., Lisbonne M., L'helgoual'h A., Rauch M., Turlin B., Preisser L., Bourd-Boittin K., Théret N., Gascan H., Piquet-Pellorce C., Samson M. Interleukin-33 over expression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J. Cell. Mol. Med.*, 2010, Vol. 14, no. 6B, pp. 1726-1739.
27. McHedlidze T., Waldner M., Zopf S., Walker J., Rankin A.L., Schuchmann M., Voehringer D., McKenzie A.N., Neurath M.F., Pflanz S., Wirtz S. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*, 2013, Vol. 39, pp. 357-371.
28. McLaren J.E., Michael D.R., Salter R.C., Ashlin T.G., Calder C.J., Miller A.M., Liew F.Y., Ramji D.P. IL-33 reduces macrophage foam cell formation. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 2, pp. 1222-1229.
29. Miller A.M., Xu D., Asquith D.L., Denby L., Li Y., Sattar N., Baker A.H., McInnes I.B., Liew F.Y. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 2, pp. 339-346.
30. Mirchandani A.S., Salmond R.J., Liew F.Y. Interleukin-33 and the function of innate lymphoid cells. *Trends Immunol.*, 2012, Vol. 33, pp. 389-396.
31. Oboki K., Nakae S., Matsumoto K., Saito H. IL-33 and airway inflammation. *Allergy, Asthma Immunol. Res.*, 2011, Vol. 3, no. 2, pp. 81-88.
32. Oboki K., Ohno T., Kajiwara N., Saito H., Nakae S. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergology International*, 2010, Vol. 59, pp. 143-160.
33. Ohno T., Oboki K., Morita H., Kajiwara N., Arae K., Tanaka S., Ikeda M. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 4, e18404. doi: 10.1371/journal.pone.0018404.
34. Palmer G., Lipsky B.P., Smithgall M.D., Meininger D., Siu S., Talabot-Ayer D., Gabay C., Smith D.E. The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. *Cytokine*, 2008, Vol. 42, pp. 358-364.
35. Pei C., Barbour M., Fairlie-Clarke K.J., Allan D., Mu R., Jiang H.R. Emerging role of interleukin-33 in autoimmune diseases. *Immunology*, 2014, Vol. 141, pp. 9-17.
36. Raghu G., Selman M. Nintedanib and pirfenidone. New antifibrotic treatments indicated for idiopathic pulmonary fibrosis offer hopes and raises questions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2015, Vol. 191, no. 3, pp. 252-254.
37. Rankin A.L., Mumm J.B., Murphy E., Turner S., Yu N., McClanahan T.K., Bourne P.A., Pierce R.H., Kastelein R., Pflanz S. IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 3, pp. 1526-1535.
38. Saluja R., Khan M., Church M.K., Maurer M. The role of IL-33 and mast cells in allergy and inflammation. *Clin. Transl. Allergy*, 2015, Vol. 5, p. 33.
39. Sanada S., Hakuno D., Higgins L.J., Schreiter E.R., McKenzie A.N., Lee R.T. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, pp. 1538-1549.

40. Sánchez-Más J., Lax A., Asensio-López M.C., Fernandez-Del Palacio M.J., Caballero L., Santarelli G., Januzzi J.L., Pascual-Figal D.A. Modulation of IL-33/ST2 system in postinfarction heart failure: correlation with cardiac remodeling markers. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 44, no. 7, pp. 643-651.
41. Schmitz J., Owyang A., Oldham E., Song Y., Murphy E., McClanahan T.K., Zurawski G., Moshrefi M., Qin J., Li X., Gorman D.M., Bazan J.F., Kastelein R.A. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 2005, Vol. 23, pp. 479-490.
42. Seki K., Sanada S., Kudinova A.Y., Steinhilber M.L., Handa V., Gannon J., Lee R.T. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ. Heart Fail.*, 2009, Vol. 2, no. 6, pp. 684-691.
43. Silver M.R., Margulis A., Wood N., Goldman S.J., Kasaian M., Chaudhary D. IL-33 synergizes with IgE-dependent and IgE-independent agents to promote mast cell and basophil activation. *Inflamm. Res.*, 2010, Vol. 59, pp. 207-218.
44. Smithgall M.D., Comeau M.R., Yoon B.R., Kaufman D., Armitage R., Smith D.E. IL-33 amplifies both Th1 and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int. Immunol.*, 2008, Vol. 20, pp. 1019-1030.
45. Tago K., Noda T., Hayakawa M., Iwahana H., Yanagisawa K., Yashiro T., Tominaga S. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, Vol. 285, no. 5, pp. 1377-1383.
46. Wasserman A., Ben-Shoshan J., Entin-Meer M., Maysel-Auslender S., Guzner-Gur H., Keren G. Interleukin-33 augments Treg cell levels: a flaw mechanism in atherosclerosis. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2012, Vol. 14, no. 10, pp. 620-623.
47. Wollin L., Maillet I., Quesniaux V., Holweg A., Ryffel B. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2014, Vol. 349, no. 2, pp. 209-220.
48. Wynn T.A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, pp. 524-529.
49. Xu H., Turnquist H.R., Hoffman R., Billia T.R. Role of the IL-33-ST2 axis in sepsis. *Mil. Med. Res.*, 2017, Vol. 4, p. 3.
50. Xu W.D., Zhang M., Zhang Y.J., Ye D.Q. IL-33 in rheumatoid arthritis: potential role in pathogenesis and therapy. *Hum. Immunol.*, 2013, Vol. 74, no. 9, pp. 1057-1060.
51. Zhu J., Carver W. Effects of interleukin-33 on cardiac fibroblast gene expression and activity. *Cytokine*, 2012, Vol. 58, no. 3, pp. 368-379.

Авторы:

Учасова Е.Г. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории исследований гомеостаза отдела диагностики сердечно-сосудистых заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Груздева О.В. — д.м.н., заведующая лабораторией исследований гомеостаза отдела диагностики сердечно-сосудистых заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; доцент кафедры патологической физиологии, медицинской и клинической биохимии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Дылева Ю.А. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории исследований гомеостаза отдела диагностики сердечно-сосудистых заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Каретникова В.Н. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией патофизиологии мультифокального атеросклероза отдела мультифокального атеросклероза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; профессор кафедры кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Authors:

Uchasova E.G., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory Research Homeostasis, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Gruzdeva O.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory Research Homeostasis, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Associate Professor, Department of Pathological Physiology, Medical and Clinical Biochemistry, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Dileva Yu.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory Research Homeostasis, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Karetnikova V.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Pathophysiology Laboratory of Multifocal Atherosclerosis, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Professor, Department of Cardiology and Cardiovascular Surgery, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 16.08.2017

Отправлена на доработку 25.09.2017

Принята к печати 25.10.2017

Received 16.08.2017

Revision received 25.09.2017

Accepted 25.10.2017

РОЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ ТРОФОБЛАСТА С КЛЕТКАМИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ЭНДОТЕЛИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Керкешко Г.О., Корневский А.В., Соколов Д.И., Сельков С.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Преэклампсия является мультисистемным заболеванием, возникающим во второй половине беременности и характеризующимся развитием гипертензии и протеинурии. Преэклампсия до сих пор остается одной из основных причин материнской и неонатальной заболеваемости и смертности. Как полагают, преэклампсия является результатом сложных взаимодействий материнских и плацентарных факторов, однако непосредственная патофизиология этого синдрома остается неясной. Межклеточные взаимодействия являются основой фетоплацентарного развития при физиологически протекающей беременности. Один из механизмов межклеточных взаимодействий связан с выбросом клетками ограниченной мембраной экстраклеточных микровезикул. Концентрация и молекулярный состав экстраклеточных везикул в биологических жидкостях зависят от продуцирующих их клеток, а также стимулов, инициирующих их продукцию. Исследование экстраклеточных везикул при преэклампсии фокусируется на частицах, вырабатываемых клетками сердечно-сосудистой системы матери (эндотелий, гладкие мышцы сосудов) и крови (эритроциты, лейкоциты и тромбоциты), а также клетками синцитиотрофобласта. Изменения в концентрации и молекулярном составе этих экстраклеточных везикул могут вносить вклад в патофизиологию преэклампсии благодаря усилению провоспалительного и прокоагуляционного состояния при беременности. Настоящий обзор посвящен, в первую очередь, характеристике экстраклеточных везикул, продуцируемых синцитиотрофобластом, а также возможной роли их взаимодействия с клетками материнской иммунной системы, эндотелиальными клетками и тромбоцитами в процессе развития преэклампсии. Понимание роли экстраклеточных везикул синцитиотрофобласта в патогенезе преэклампсии могло бы открыть возможности использования полученных данных для ранней и неинвазивной диагностики плацентарных нарушений, а также для прогноза развития этого заболевания.

Ключевые слова: преэклампсия, гипертензия, плацента, трофобласт, микровезикулы, межклеточные взаимодействия

Адрес для переписки:

Керкешко Глеб Олегович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 328-98-91, 323-75-45.
Факс: 8 (812) 323-75-45.
E-mail: gkerkeshko@yandex.ru

Address for correspondence:

Kerkeshko Gleb O.
D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
199034, Russian Federation, St. Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3.
Phone: 7 (812) 328-98-91, 323-75-45.
Fax: 7 (812) 323-75-45.
E-mail: gkerkeshko@yandex.ru

Образец цитирования:

Г.О. Керкешко, А.В. Корневский, Д.И. Соколов, С.А. Сельков «Роль взаимодействия экстраклеточных микровезикул трофобласта с клетками иммунной системы и эндотелия в патогенезе преэклампсии» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 485-514.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-485-514

© Керкешко Г.О. и соавт., 2018

For citation:

G.O. Kerkeshko, A.V. Korenevsky, D.I. Sokolov, S.A. Selkov "The role of interactions between trophoblast-derived extracellular microvesicles, immune cells and endothelium in pathogenesis of pre-eclampsia", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 485-514.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-485-514

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-485-514

THE ROLE OF INTERACTIONS BETWEEN TROPHOBLAST-DERIVED EXTRACELLULAR MICROVESICLES, IMMUNE CELLS AND ENDOTHELIUM IN PATHOGENESIS OF PRE-ECLAMPSIA

Kerkeshko G.O., Korenevsky A.V., Sokolov D.I., Selkov S.A.

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Pre-eclampsia is a multisystemic disease that occurs in the second half of pregnancy, being characterized by the development of hypertension and proteinuria. Pre-eclampsia is still one of the main causes of maternal and neonatal morbidity and mortality. Pre-eclampsia is believed to be a result of complex interactions between maternal and placental factors. However, the exact pathophysiology of this syndrome remains unclear. Intercellular interactions are the basis of fetoplacental development in physiological pregnancy. A special mechanism of intercellular interactions is associated with the release of membrane-bound extracellular microvesicles by cells. Concentration and molecular composition of extracellular vesicles in biological fluids depend on the producer cell types, as well as the stimuli that trigger their formation. The studies of extracellular vesicles in pre-eclampsia focus on the particles produced by the cells of maternal cardiovascular system (endothelium, smooth muscle cells of blood vessels), and blood (erythrocytes, leukocytes, and platelets), like as by the cells of syncytiotrophoblast. Changed concentrations and molecular composition of these extracellular vesicles can contribute to the pathophysiology of pre-eclampsia, due to increased pro-inflammatory and procoagulant state occurring during pregnancy. This review focuses, firstly, on characteristics of the extracellular vesicles produced by syncytiotrophoblast, and possible role of their interaction with maternal immune cells, endothelial cells and platelets in the course of developing pre-eclampsia. Understanding the role of extracellular vesicles of syncytiotrophoblast in pathogenesis of pre-eclampsia could suggest an opportunity of providing these results for early and non-invasive diagnostics of placental disorders, as well as for predicting development of this disease.

Keywords: pre-eclampsia, hypertension, placenta, trophoblast, microvesicles, cell interactions

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-15-01230.

Введение

Преэклампсия (ПЭ) – возникающее во второй половине беременности (после 20-й недели) мультисистемное патологическое состояние, которое характеризуется артериальной гипертензией ($\geq 140/90$ мм рт. ст.) в сочетании с протеинурией ($\geq 0,3$ г в суточной моче) и нередко сопровождается отеками и полиорганной/полисистемной дисфункцией/недостаточностью [132, 182].

Базовые клеточные и молекулярные механизмы, активирующие ПЭ и способствующие ее прогрессированию, в настоящее время изучены недостаточно: нет четких ранних диагностических тестов, а также эффективных адресных фармакологических методов лечения. Единственным радикальным средством устранения синдромов ПЭ на сегодняшний день является родоразрешение. Имея мировой показатель распространенности, по данным разных авторов, от 2 до 9% от общего числа беременностей, ПЭ остается одной из главных проблем ведения пациентов для врачей [3, 15]. Данное заболевание представляет су-

щественный риск развития отдаленных сердечно-сосудистых осложнений как для матери, так и для ребенка. Помимо артериальной гипертензии и протеинурии, объективным признаком ПЭ является состояние гиперкоагуляции, сосудистой дисфункции, а также избыточного (чрезмерного) системного воспалительного ответа, вызванное выбросом плацентарных провоспалительных, антиангиогенных и прокоагулянтных факторов в ответ на ишемически-реперфузионное повреждение плаценты [33, 128, 182].

Накопленные к настоящему времени клинические и эпидемиологические данные дают основание полагать, что ПЭ является гетерогенным заболеванием, в основе которого лежат несколько отличных друг от друга механизмов, выражающихся в различных клинических фенотипах [121]. В современной клинической практике принято выделять два фенотипических варианта проявления ПЭ: с ранней манифестацией клинических симптомов (до 34 недель беременности) и с поздней манифестацией (после 34 недель беременности) [102, 182]. В зависимости от тяжести симптомов, в частности артериального давления, ПЭ разделяют на тяжелую ($\geq 160/110$ мм рт. ст.) и умеренную ($< 160/110$ мм рт. ст.) [62]. Резуль-

таты исследований по изучению этиологии ПЭ позволяют предположить, что она может быть обусловлена как преимущественно фетальными (плацентарными) факторами, так и материнскими факторами риска [102]. Считается, что более ранняя и тяжелая форма ПЭ возникает вследствие преимущественного воздействия плацентарных факторов, в то время как преобладание материнских факторов риска приводит к более позднему и умеренному развитию ПЭ [62].

Роль плаценты в возникновении ПЭ в настоящее время представляется следующим образом. После адгезии бластоцисты к эндометрию начинается формирование ворсин хориона, являющихся основным структурным элементом плаценты. Клетки трофоэктодермы, в зависимости от их пространственного местоположения, дифференцируются либо в находящийся в составе ворсин ворсинчатый цитотрофобласт, либо во вневорсинчатый (экстравиллезный) цитотрофобласт, обладающий инвазивными свойствами [1]. Клетки наружного слоя ворсинчатого цитотрофобласта сливаются друг с другом, образуя единую многоядерную структуру, называемую синцитиотрофобластом (СТБ). Сформированный СТБ покрывает непрерывным слоем всю поверхность многочисленных ворсин, отделяя плодную часть трофобласта от непосредственного контакта с материнской кровью, заполняющей пространство между ворсинами. Клетки вневорсинчатого цитотрофобласта инвазируют дистальные участки снабжающих плаценту материнских спиральных артерий, замещая эндотелиальные и гладкомышечные клетки [110, 135]. Этот процесс гестационной перестройки спиральных артерий превращает их дистальные части из узких сосудов в широкие, малоупругие каналы [180, 181]. Градиент кислорода в матке в ранние сроки беременности способствует инвазии и перестройке спиральных артерий [34]. Предполагается, что ключевым патогенетическим звеном в развитии ПЭ с преобладанием плацентарных факторов является плацентарная ишемия и гипоксия, развивающаяся вследствие нарушения процесса инвазии трофобласта и неполноценной гестационной перестройки спиральных артерий [133, 134]. Связанные с ишемией-реперфузией [86] или с высокой скоростью кровотока в межворсинчатом пространстве [32] повреждения, в свою очередь, запускают процессы высвобождения плацентарных провоспалительных, ангиогенных и прокоагулянтных факторов.

К материнским факторам риска ПЭ в первую очередь относят наследственные и приобретенные тромбофилии, в частности антифосфолипидный синдром [52], которые вследствие тромбообразования могут вызывать блокаду спи-

ральных артерий плаценты. Вклад материнских факторов в развитие ПЭ может реализовываться в условиях сосудистой дисфункции, окислительного стресса и метаболических нарушений, таких как гипертония, ожирение или диабет, которые предшествуют беременности или усугубляются в ходе ее течения и могут являться факторами риска развития ПЭ [52, 102].

Независимо от преобладающего механизма возникновения ПЭ, взаимодействие между материнскими и плацентарными патофизиологическими факторами может приводить к замкнутому кругу избыточного системного воспалительного ответа, сосудистой дисфункции, а также активации прокоагуляционных путей, что в конечном итоге приводит к возникновению симптомов ПЭ [62].

Одним из проявлений ПЭ является феномен усиленной депортации трофобласта, то есть отделения с поверхности его ворсин в омывающую материнскую кровь элементов клеточного и субклеточного размера, с дальнейшим их проникновением через венозные коллекторы матки в нижнюю полую вену, правый отдел сердца, магистральные легочные сосуды и, наконец, в капиллярную сеть легких [2]. Депортация трофобласта была впервые обнаружена немецким патологом Георгом Шморлем, который наблюдал многоядерные клетки плацентарного происхождения (нем. *plazentarzellen*) в легочной ткани женщин, погибших в результате эклампсии [147]. В последующих исследованиях те же клетки были обнаружены в легких, в крови маточных вен и в периферической крови беременных женщин при ПЭ, а также, хотя и в меньшем количестве, при физиологически протекающей беременности на разных ее сроках [22, 42, 49, 83, 85, 88, 90, 146].

Основным источником депортируемых фрагментов трофобласта служит СТБ, по своей морфологии представляющий многоядерный, терминально дифференцированный, поляризованный эпителий [30]. Формирование СТБ происходит на ранних стадиях эмбриогенеза, он сохраняется в течение всей беременности за счет процесса обмена, при котором отмерший материал, отделяющийся от апикальной поверхности, восполняется путем включения в СТБ нижележащих клеток цитотрофобласта [81]. Благодаря своему уникальному положению в области контакта между организмами матери и плода, СТБ является наиболее важным компонентом маточно-плацентарного барьера и выполняет барьерную, обменную, гуморальную функции, а также участвует в формировании иммунологической толерантности организма матери в отношении полуаллогенного организма плода [1]. Через СТБ происходит транспорт питательных веществ от матери к пло-

ду, газообмен, удаление продуктов метаболизма, в нем синтезируется ряд белков, стероидных и белковых гормонов, сигнальных и иммуномодулирующих молекул, являющихся жизненно необходимыми для благополучного протекания беременности [114].

Омываемая кровью матери, свободная апикальная поверхность синцития богата полиморфными микроворсинками, что указывает на огромную подвижность поверхностной синцитиоплазмы [114]. Ядра СТБ обладают уникальной возможностью перемещаться вследствие отсутствия межклеточных перегородок. Наблюдаемое при физиологической беременности и в особенности при ПЭ объединение ядер в группы приводит к формированию таких образований, как синцитиальные «почки» («узелки») (англ. knots) и синцитиальные «ростки» (англ. sprouts), которые могут затем отделяться от эпителиального покрова и попадать в материнский кровоток [31].

Отделяющиеся от СТБ наиболее крупные многоядерные жизнеспособные образования размером 20-100 мкм, образующиеся, как предполагают, из синцитиальных «ростков» и «почек» («узелков») [31], называют депортированным СТБ (синонимы: изолированные или свободные симпласты, многоядерные агрегаты СТБ) (рис. 1). Эти многоядерные фрагменты содержат сохраненные микроворсинки СТБ, под которыми расположен слой общей цитоплазмы, имеющий в своем центре от шести до двадцати сближенных ядер [2]. Отделение плацентарных депортантов длительное время считали патологическим явлением, свойственным для эклампсии и ПЭ [22, 147], но впоследствии было показано, что их образование является естественным процессом и наблюдается на протяжении всей физиологически протекающей беременности [29, 31]. Было подсчитано, что при неосложненной беременности в течение суток в организм матери попадает около ста тысяч многоядерных депортантов [83].

Ограниченные плазматической мембраной фрагменты меньшего, субклеточного размера (~30-5000 нм), объединяемые под общим названием экстраклеточных везикул (ЭВ), также продуцируются СТБ. Такие ЭВ (СТБ-ЭВ) были впервые получены как артефакт *in vitro* при попытке выделения поверхностных мембран СТБ с целью изучения их биохимического состава и транспортных функций [153]. Морфологические наблюдения показали, что с поверхности апикальной мембраны СТБ непрерывно высвобождаются микровезикулы и даже целые микроворсинки [114], кроме того, СТБ также продуцирует значительное количество ЭВ меньшего размера,

называемых экзосомами, которые формируются во внутриклеточных структурах эндосомального происхождения и затем высвобождаются из клетки путем экзоцитоза [114]. Установлено, что СТБ-ЭВ, включающие как микровезикулы, так и экзосомы, появляются в периферической крови матери в конце первого триместра физиологической беременности и их количество значительно возрастает при ПЭ [61, 90]. Наличие образуемых трофобластом и другими клетками ЭВ в периферической крови женщин при неосложненной беременности, а также увеличение их образования при различных патологиях беременности, в частности при ПЭ и гестационном сахарном диабете, было неоднократно показано в работах различных исследователей [62, 113, 115, 117, 139, 141, 143, 154].

Помимо ограниченных мембраной фрагментов крупного и среднего размеров, в крови матери на протяжении всей беременности обнаруживаются лишённые плазматической мембраны малые фрагменты плацентарного происхождения (< 60 нм), содержащие внеклеточную ДНК плода, цитокератин и другие молекулы, их уровень также повышается при ПЭ [103, 129, 149].

Отделяющиеся фрагменты СТБ, начиная с многоядерных агрегатов и жизнеспособных клеток трофобласта и заканчивая СТБ-ЭВ, длительное время считались иммунологически инертными, не играющими существенной регуляторной роли [22]. Однако интерес к изучению депортантов СТБ и в особенности СТБ-ЭВ существенно повысился после открытия их иммуномодулирующих свойств, позволивших предположить их участие в формировании иммунологической толерантности при беременности [6, 36]. В настоящее время СТБ-ЭВ рассматриваются в качестве одного из важнейших сигнальных механизмов, обеспечивающих взаимодействие между плодом и матерью и формирование иммунологической толерантности.

Для лучшего понимания роли СТБ-ЭВ при физиологически протекающей беременности и ПЭ следует кратко остановиться на их основных характеристиках, молекулярном составе и способах выделения, чему посвящен следующий раздел.

Общая характеристика экстраклеточных везикул

Продуцируемые клетками мембранные ЭВ в настоящее время рассматриваются в качестве эффективных медиаторов физиологических, а также патологических процессов [44]. Термин ЭВ включает в себя три основных типа везикул: экзосомы, микровезикулы (также называемые эктосомами) и апоптотические тела (рис. 1). Вопросы биогенеза, методов изоляции, моле-

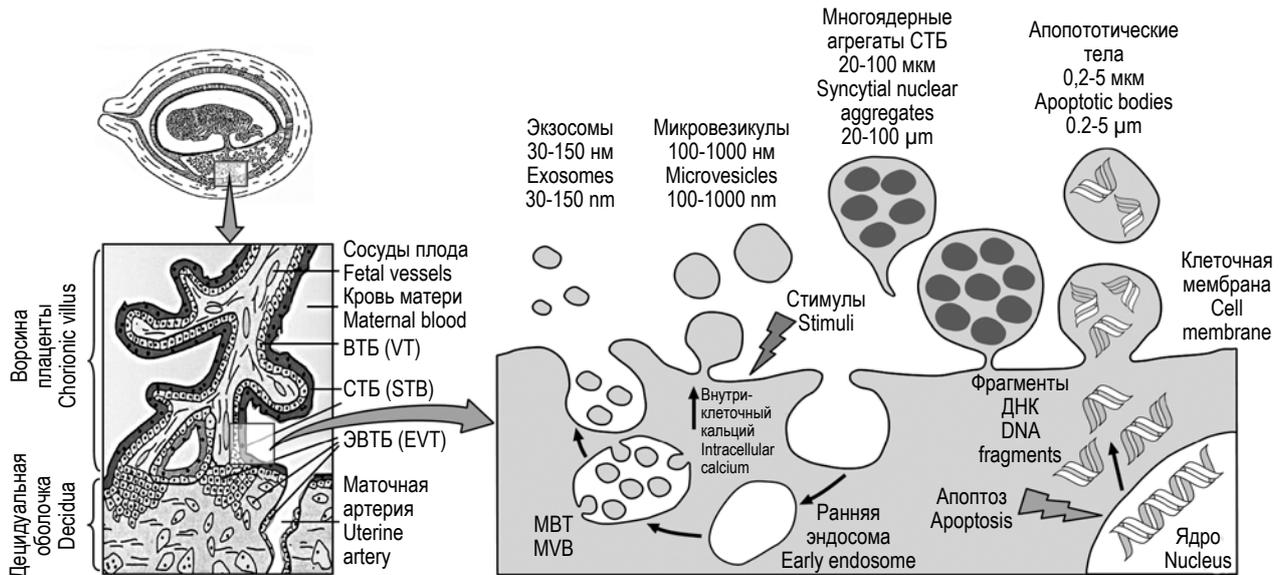


Рисунок 1. Экстраклеточные везикулы и многоядерные агрегаты плацентарного происхождения (модифицировано из [93, 162])

Примечание. ВТБ – ворсинчатый цитотрофобласт; СТБ – синцитиотрофобласт; МВТ – мультивезикулярное тельце; ЭВТБ – вневорсинчатый (экстравиллезный) цитотрофобласт.

Figure 1. Human placental extracellular vesicles and deported multinuclear fragments (modified from [93, 162])

Note. EVT, extravillous cytotrophoblast; MVB, multivesicular body; STB, syncytiotrophoblast; VT, villous cytotrophoblast.

кулярного состава и функций ЭВ глубоко и всесторонне проанализированы в соответствующих обзорах [44, 89], поэтому в данной работе будут только кратко отмечены их основные характеристики.

Самым маленьким типом ЭВ являются экзосомы (30-70 нм – 120-150 нм), которые конститутивно образуются в структурах эндосомального происхождения, называемых мультивезикулярными тельцами, путем отпочковывания вовнутрь их внешней мембраны [44]. Формирование экзосом происходит при участии механизмов эндоцитоза, среди которых наиболее исследован «эндосомальный сортировочный комплекс, необходимый для транспорта» (англ. endosomal sorting complex required for transport, ESCRT), обеспечивающий не только отпочковывание экзосом, но и адресное их наполнение молекулярным грузом. Выброс экзосом во внеклеточную среду осуществляется путем экзоцитоза после слияния мультивезикулярных телец с наружной плазматической мембраной [44]. Микровезикулы (100-200 нм – 1000 нм) отделяются непосредственно от плазматической мембраны в ответ на стимулы, вызывающие повышение уровня внутриклеточного кальция и ремоделирование цитоскелета, такие как клеточная активация, воспаление, гипоксия, окислительный стресс и др. [114, 151]. Образование микровезикул также усиливается на начальных этапах апоптоза, такие микровезикулы составляют отдельную субпопу-

ляцию, не содержат маркеров ядра и отличаются от апоптотических тел (200-300 нм – 3000-5000 нм), которые освобождаются из апоптотических клеток на конечных этапах апоптоза и содержат ядерный материал и органеллы [89, 151].

Исследования, касающиеся роли ЭВ в межклеточных взаимодействиях, фокусируются в основном на изучении микровезикул и экзосом, которые вырабатываются практически всеми интактными и активированными клетками, а также клетками, участвующими в патофизиологических процессах [16, 44, 53, 178]. Как отмечено выше, экзосомы и микровезикулы, помимо способа их образования, различаются и по величине, однако диапазоны размеров этих двух различных классов ЭВ частично перекрываются, и в настоящее время не существует четких методов, позволяющих их разделить исключительно на основе данного параметра [44]. Поверхностно-специфические маркеры ЭВ, которые могли бы использоваться для надежной дифференциации микровезикул и экзосом, пока не найдены. Поэтому в настоящем обзоре мы, говоря об экзосомах и микровезикулах, будем использовать термин ЭВ, как ранее было предложено научным сообществом [67].

В составе ЭВ находятся белки, липиды и различные типы РНК (мРНК, микроРНК, vaultРНК и тРНК), которые обеспечивают контакты ЭВ с клетками-мишенями и передачу им сигнала [44, 89]. Селективный выбор белков, в частности мо-

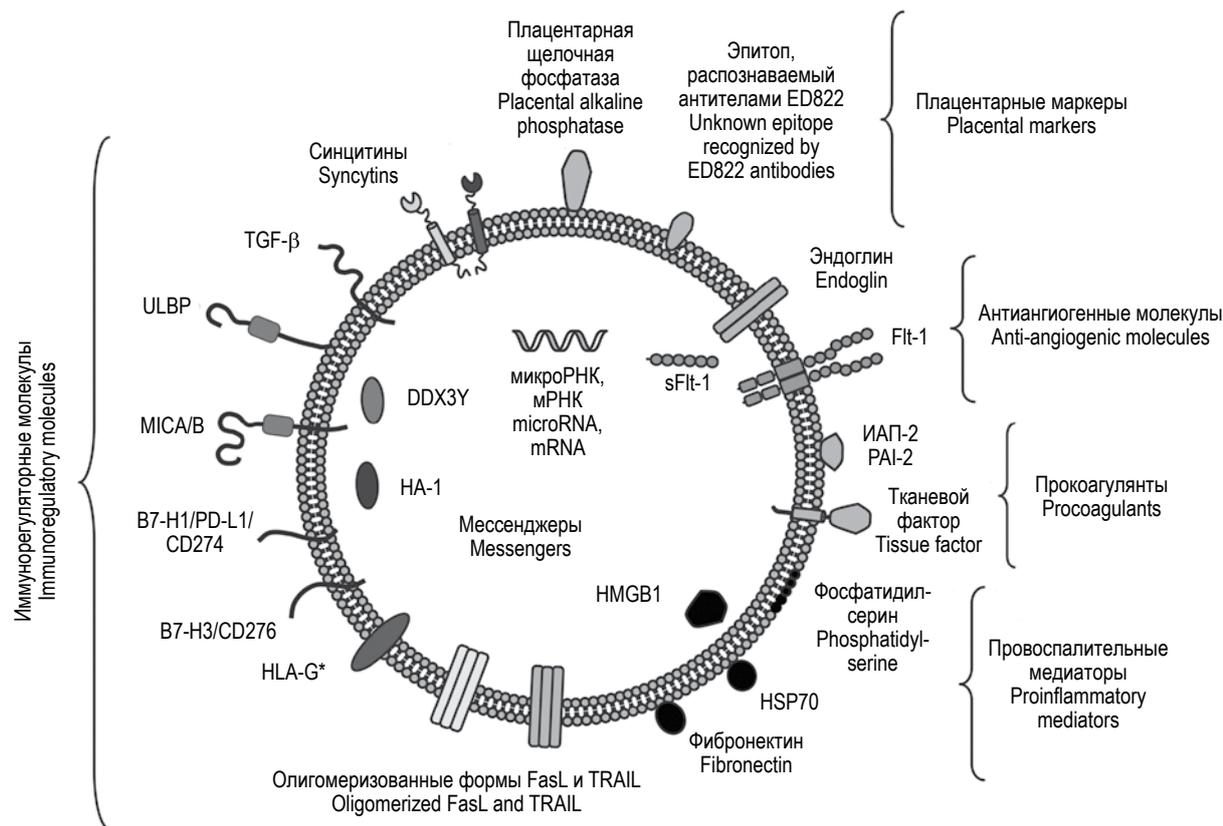


Рисунок 2. Молекулы, участвующие в реализации функций плацентарных экстраклеточных везикул (модифицировано из [114])

Примечание. DDX3Y – содержащий DEAD бокс полипептид 3, Y-сцепленный; B7-H1/PD-L1/CD274 – лиганд белка программируемой смерти 1; B7-H3/CD276 – ко-стимулятор B7-H1; FasL – Fas-лиганд; Flt-1 – fms-подобная тирозинкиназа-1; sFlt-1 – растворимая форма Flt-1; HA-1 (HMHA1) – минорный антиген гистосовместимости человека 1; HLA-G – неклассическая молекула гистосовместимости (* – в зрелой плаценте присутствует только в составе экстраклеточных везикул вневорсинчатого цитотрофобласта); HMGB1 – белок высокоподвижной группы бокс-1; HSP70 – белок теплового шока 70 кДа; MIC A/B, родственные антигенам МНС класса I; ИАП-2 – ингибитор активатора плазминогена 2; TRAIL – индуцирующий апоптоз лиганд семейства TNF; ULBP – UL-16-связывающий белок.

Figure 2. Human placenta derived extracellular vesicle, its functional activities and relevant molecular cargos (modified from [114])

Note. DDX3Y, DEAD box polypeptide 3, Y-linked; B7-H1/PD-L1/CD274, programmed death-ligand 1; B7-H3/CD276, co-stimulator of B7-H1; FasL, Fas ligand; Flt-1, fms-like tyrosine kinase-1; sFlt-1, soluble Flt-1; HA-1 (HMHA1), human minor histocompatibility antigen 1; HLA-G, non-classic human leukocyte antigen (HLA) class I molecule (*, associated with extravillous cytotrophoblast extracellular vesicles in term placenta); HMGB1, high mobility group box-1 protein; HSP70, heat shock protein 70 kDa; MIC A/B, MHC class I chain-related proteins A/B; PAI-2, plasminogen activator inhibitor-2; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; ULBP, UL16 binding protein.

лекул адгезии и гликопротеинов, а также степень экстернализации фосфатидилсерина определяют круг клеток-мишеней, с которыми будут взаимодействовать данные ЭВ после их выброса [17, 44]. После контакта ЭВ с клеткой-мишенью происходит передача сигнала, которая может осуществляться через поверхностные белковые и липидные лиганд-рецепторные взаимодействия, посредством выброса содержимого ЭВ в экстраклеточное пространство в непосредственной близости от клетки-мишени, путем слияния ЭВ с плазматической мембраной клетки-мишени и выброса ее содержимого в цитозоль и, наконец,

посредством эндоцитоза ЭВ и последующего ее слияния с эндосомой [126].

Беременность является идеальной системой для изучения ЭВ, так как она имеет определенную начальную и конечную точки, кроме того, наличие специфических плацентарных маркеров позволяет отличить СТБ-ЭВ от ЭВ, продуцируемых другими типами клеток. В конце беременности плацента, как источник СТБ-ЭВ, оказывается доступной для исследования. Изучение на протяжении беременности СТБ-ЭВ, отражающих функциональное состояние плаценты, может иметь большое значение для ранней диагностики плацентарных нарушений, наблюдае-

мых при ПЭ и других осложнениях беременности [129, 161, 165].

Для получения и анализа ЭВ плацентарного происхождения используются различные методики. Считается, что наиболее точное представление обо всем спектре отделяющихся от СТБ фрагментов и плацентарных ЭВ (многоядерные агрегаты, апоптотические тела, микровезикулы, экзосомы) дает анализ крови маточной вены, а также *ex vivo* перфузатов плаценты [50, 164]. Поскольку основная часть крупных многоядерных фрагментов СТБ задерживается в легочном капиллярном русле, из периферической крови могут быть выделены только наиболее мелкие агрегаты ядер СТБ, а также плацентарные ЭВ всех размеров [88]. В качестве источников ЭВ плацентарного происхождения также используются смывы механически изолированной ворсинчатой части трофобласта, супернатанты культур плацентарных эксплантатов, супернатанты культур первичных линий клеток трофобласта и линий клеток хориокарциномы Jeg-3 и BeWo [129, 172]. Крупные образования, такие как многоядерные агрегаты СТБ, могут быть легко осаждены при помощи низкоскоростного центрифугирования, для изоляции общей фракции всех СТБ-ЭВ, а также фракций, обогащенных микровезикулами или экзосомами, используется преимущественно дифференциальное центрифугирование на более высоких скоростях [50, 162, 172].

Для отделения субпопуляции СТБ-ЭВ от находящихся в материнской крови ЭВ тромбоцитарного, лейкоцитарного и иного происхождения используют методы иммуноферментного анализа и проточной цитометрии на основе специфических моноклональных антител NDOG2 (распознают плацентарную щелочную фосфатазу) и ED822 (распознают неизвестный антиген на апикальной поверхности СТБ) [50, 51, 61, 90, 104, 127, 144, 174] (рис. 2). Несмотря на то что нижний порог обнаружения ЭВ при помощи проточной цитометрии в настоящее время снизился до 200 нм, этот метод до сих пор не позволяет измерять уровень ЭВ, близких по размерам к экзосомам, в то время как методы иммуноферментного анализа дают представление об уровне всех ЭВ, положительных по маркерам СТБ, независимо от их размеров [51].

В процесс формирования ПЭ, помимо плацентарных факторов, могут вносить свой вклад и материнские факторы риска, обнаруживаемые до и во время беременности [62]. Влияние этих факторов на развитие ПЭ может быть опосредовано изменением количества и состава ЭВ неплацентарного происхождения. Поэтому прежде описания роли ЭВ плацентарного происхождения в патогенезе ПЭ следует уделить внимание

возможному влиянию материнских факторов риска на баланс ЭВ в организме матери до беременности.

Экстраклеточные везикулы у небеременных женщин с факторами риска развития преэклампсии

К факторам риска ПЭ относят ожирение, сахарный диабет, гипертонию, а также аутоиммунные заболевания, такие как системная красная волчанка и антифосфолипидный синдром [52]. В крови небеременных женщин с факторами риска развития ПЭ было отмечено повышение количества ЭВ эндотелиального и тромбоцитарного происхождения по сравнению с женщинами без подобных факторов риска [47, 92, 122, 125, 137, 158, 173, 179]. В отношении же лейкоцитарных ЭВ были получены неоднозначные данные: при различных заболеваниях, относящихся к факторам риска ПЭ, их уровень либо увеличивался [47, 92], либо оставался неизменным [179], а иногда даже снижался [122].

Однако наблюдаемые количественные изменения в крови ЭВ различного происхождения у беременных женщин с ПЭ не всегда были сопоставимы с изменениями, отмеченными у небеременных женщин с факторами риска ПЭ. Так, хотя в некоторых исследованиях при ПЭ отмечалось повышение в крови концентрации эндотелиальных ЭВ по сравнению с физиологически протекающей беременностью [64, 109], в других исследованиях подобного изменения не наблюдалось [104, 174]. При ПЭ наблюдалось повышение количества ЭВ лейкоцитарного происхождения по сравнению с неосложненной беременностью [104, 113, 174], в отношении же тромбоцитарных ЭВ в различных работах было показано как увеличение [108], так и снижение [104] или отсутствие изменений их уровня [109, 174].

Неоднозначность данных о влиянии факторов риска ПЭ на количество ЭВ в крови небеременных женщин можно объяснить различием воздействия патологий, входящих в группу факторов риска ПЭ, на продуцирующие ЭВ клетки, а также различиями в методах выделения и подсчета ЭВ. Отсутствие строгого соответствия воздействия факторов риска ПЭ и самой ПЭ, по-видимому, объясняется теми же причинами, а также гетерогенностью самой патологии ПЭ. Вместе с тем полученные данные показывают, что воздействие до беременности факторов риска ПЭ на такие группы материнских клеток, как эндотелиоциты, лейкоциты и тромбоциты, приводит к изменению концентрации и, возможно, молекулярного состава продуцируемых этими клетками ЭВ, что в свою очередь может создавать условия, благоприятствующие возникновению ПЭ при наступлении беременности [62].

Однако, безусловно, наиболее важная роль в формировании ПЭ отводится ЭВ плацентарного происхождения, в особенности СТБ-ЭВ.

Экстраклеточные везикулы плацентарного происхождения

Материнский синдром ПЭ характеризуется избыточной воспалительной реакцией, связанной с эндотелиальной дисфункцией, которая вызывается высвобождением множественных факторов из плаценты в материнский кровоток. Несмотря на то, что некоторые из этих факторов высвобождаются в виде растворимых молекул, теперь становится очевидным, что многие из них связаны с микровезикулами и экзосомами СТБ. Показано, что выделенные из перфузатов плацент СТБ-ЭВ оказывают провоспалительный, противэндотелиальный и прокоагуляторный эффекты, в совокупности сопровождающие развитие ПЭ [61, 114, 129] (рис. 2).

Провоспалительные эффекты СТБ-ЭВ связаны с наличием на их поверхности и/или во внутреннем содержимом молекулярных структур, ассоциированных с опасностью (англ. *danger associated molecular patterns* – DAMP), в частности белка теплового шока 70 (HSP-70) и белка HMGB1 (англ. *high mobility group box-1*) [163]. Прокоагуляционная активность СТБ-ЭВ предположительно опосредуется присутствующим на их поверхности тканевым фактором [59], а противэндотелиальное действие – антиангиогенными молекулами, в числе которых рецептор фактора роста эндотелия сосудов Flt-1, его растворимая форма sFlt-1, а также компонент комплекса TGF- β -рецептора эндоглин [68, 166]. Иммунорегуляторные свойства СТБ-ЭВ, выражающиеся в супрессии NK- и T-клеток, возможно, связаны с экспрессией на их поверхности проапоптотических молекул FasL и TRAIL [157], а также лигандов NKG2D рецепторов MIC A/B [75].

Общее количество всех СТБ-ЭВ в крови повышается с увеличением срока беременности [61, 66], а также в родах [127] и возвращается к уровням, характерным для небеременных, приблизительно через 48 ч после родов. Продуцируемые трофобластом экзосомы обнаруживаются в крови уже с 7-й недели беременности, и их уровень, так же как и совокупное содержание всего спектра СТБ-ЭВ, возрастает в материнском кровотоке с течением беременности [144].

Физиологический процесс отделения микровезикул от СТБ значительно усиливается при патологическом течении беременности, в частности при ПЭ и эклампсии. В ряде исследований показано повышение количества СТБ-ЭВ в материнской крови при ПЭ по сравнению с несложившейся беременностью [61, 90, 123, 129], которое сочетается с усилением их провоспалительного,

антиангиогенного и прокоагулянтного действия и, как правило, коррелирует с тяжестью материнского синдрома ПЭ [41, 66], вызывающего эндотелиальную дисфункцию и обширное разрушение СТБ [114]. Вместе с тем повышение количества СТБ-ЭВ не обнаружено у нормотензивных женщин в случае задержки роста плода, а также при других осложнениях беременности, обычно ассоциируемых с плацентарной дисфункцией [66, 90]. Значительное увеличение количества СТБ-ЭВ в кровотоке женщин с ПЭ во время родов может играть определенную роль в ухудшении состояния матери в послеродовом периоде [127].

Данные о повышении количества СТБ-ЭВ в плазме при ПЭ, полученные при помощи иммуноферментных методов, не всегда подтверждаются методами проточной цитометрии. Так, в ряде исследований не обнаружено различий в количестве СТБ-ЭВ между ПЭ и физиологической беременностью [51, 61, 104, 109, 123]. Полагают, что это связано с увеличением при ПЭ количества СТБ-ЭВ, находящихся ниже порога обнаружения проточной цитометрии [164]. Кроме того, следует учитывать упомянутое выше различие воздействия на трофобласт ПЭ разной степени тяжести, вследствие чего в случае ПЭ средней тяжести повышения уровня СТБ-ЭВ в крови может не наблюдаться [51, 148].

Среди механизмов, ведущих к стимуляции продукции ЭВ при ПЭ, можно выделить повышение уровня апоптоза СТБ [96, 106], а также стимулирующее влияние вызванной ишемией кислородно-глюкозной депривации на высвобождение ЭВ клетками трофобласта [73, 140].

Подобно другим изученным ЭВ, СТБ-ЭВ служат переносчиками широкого спектра молекул, среди которых важнейшее функциональное значение придается белкам, липидам и микроРНК [119, 162, 165]. При ПЭ отмечается изменение размеров и молекулярного состава СТБ-ЭВ, что может влиять на их биологические функции [165, 166].

В настоящее время опубликованы результаты нескольких исследований, посвященных сравнению состава СТБ-ЭВ при ПЭ [23, 24, 87, 98, 129, 145, 163]. В СТБ-ЭВ, выделенных из перфузатов плацент женщин с физиологически протекающей беременностью и ПЭ, 538 белков экспрессировались только при ПЭ, 604 белка – только при физиологической беременности, а 1421 белок оказались общими для обоих видов СТБ-ЭВ [163]. Предварительный анализ показал присутствие в СТБ-ЭВ аларминов и провоспалительных молекул (HSP70, HMGB1, галектин 3, синцитин 1), иммунорегуляторных молекул (B7-H1, CD26, CD200, CD47, галектин 1), белков комплемента

и регуляторных молекул комплемента (C1q, C3, CD55, CD59, витронектин), а также антиангиогенных (CD49e, CD51, CD26, Flt-1, эндоглин) и прокоагулянтных молекул (тканевой фактор и фосфатидилсерин). Установлено, что белки, содержание которых при ПЭ увеличено в крови, также повышено экспрессированы или являются уникальными для СТБ-ЭВ при этом заболевании. К подобным белкам относятся: фетуин А, интер- α -глобулиновый ингибитор Н4, сывороточный амилоидный компонент Р, аполипопротеин Н (или B2GP1) и аполипопротеин АII. Анализ при помощи методов биоинформатики показал, что белки, уникальные для СТБ-ЭВ при ПЭ, ассоциированы с различными патологическими процессами, включая воспалительные, иммунные, сердечно-сосудистые заболевания, болезни репродуктивной системы, а также повреждение различных органов [163].

Исследование протеомного состава СТБ-ЭВ, выделенных из эксплантатов плаценты, показало изменение под влиянием ПЭ уровня экспрессии 25 белков, среди которых: интегрины, аннексины, гистоны, белки теплового шока, белки цитоскелета, а также различные ферменты [23]. При этом уровень экспрессии гистонов, интегринов, а также гликопротеина CD59 при ПЭ снижался, а уровень экспрессии остальных белков повышался. При помощи анализа метаболических путей было установлено, что дифференцированно экспрессированные при ПЭ белки вовлечены в реализацию механизмов иммунного ответа, коагуляции, окислительного стресса, апоптоза, а также метаболизма липидов [23].

При исследовании протеомного состава СТБ-ЭВ из эксплантатов плацент женщин с ранней тяжелой формой ПЭ была количественно оценена экспрессия 3292 белков, 194 из которых оказались дифференцированно экспрессированными при ПЭ по сравнению с физиологически протекающей беременностью (экспрессия 122 была усилена, 72 – подавлена при ПЭ) [98]. Среди белков, отличающихся повышенной экспрессией, по крайней мере два были связаны с воспалением, один белок – с коагуляцией, три белка – с ангиогенезом и васкуляризацией и еще одиннадцать белков – с иммунорегуляцией. Наиболее выраженным оказалось повышение уровня мембранного белка сиглек-6, который экспрессируется только в клетках плаценты человека [28] и способен ингибировать инвазию трофобласта [98].

Экспрессируемые апоптотическими клетками и распознаваемые фагоцитами сигналы, образно называемые «съешь меня» (англ. “eat me” signals), могут играть определенную роль во взаимодействиях между ЭВ и клетками и изменяться при

ПЭ [27]. Среди таких сигналов можно выделить экстернализацию и кластеризацию во внешнем монослое цитоплазматической мембраны фосфатидилсерина и фосфатидилсерин-связывающих молекул, таких как аннексин А1 и лактадгерин (MFG-E8), а также модифицированное гликозилирование, в частности пониженное сиализирование гликанов в гликокаликсе [27, 57, 111].

Изучение липидного спектра СТБ-ЭВ позволило выявить в их составе около 200 различных липидов. Воздействие ПЭ приводило к увеличению содержания фосфатидилсерина и снижению уровней фосфатидилглицерина, фосфатидиловой кислоты и ганглиозида GM3, вовлеченных в процессы воспаления, иммунного ответа, окислительного стресса, апоптоза и коагуляции [24].

Характер гликозилирования белков влияет на многочисленные биологические процессы, такие как фолдинг белков, механизмы клеточной адгезии и молекулярного транспорта, реакции клеток иммунной системы [10, 107]. Поскольку вероятность включения некоторых белков в состав ЭВ зависит от степени их гликозилирования, оно может служить одним из механизмов отбора белков в ЭВ [26, 100]. Поверхностные гликаны играют важную роль в межклеточных взаимодействиях и, вероятно, во взаимодействиях ЭВ с клетками [164]. Характерные изменения профилей поверхностного гликозилирования клеток отмечены при различных заболеваниях: сахарном диабете, атеросклерозе, нейродегенеративных и иммунных расстройствах, а также раке, где изучение ассоциированных с конкретным видом опухоли гликанов привело к разработке многочисленных диагностических и прогностических маркеров [12]. При ПЭ также были отмечены количественные и качественные изменения состава гликанов в гликокаликсе СТБ и клеток эндотелия капилляров терминальных ворсин [159]. Следует предполагать, что изменения состава поверхностных гликанов СТБ должны приводить к изменениям спектров гликозилирования СТБ-ЭВ, что в свою очередь будет влиять на связывание СТБ-ЭВ с клетками-мишенями, их клиренс и иммунную активность. Предварительные исследования поверхностного гликозилирования СТБ-ЭВ при ПЭ показали увеличение на их поверхности сахаров, содержащих прикрепленную к терминальной галактозе сиаловую кислоту, а также остатки галактозы или N-ацетилгалактозамина [164]. Патологические изменения поверхностных гликанов в СТБ-ЭВ при ПЭ могут оказывать влияние на их связывание с клетками-мишенями, клиренс и иммунную активность. Определение поверхностного гликозилирования СТБ-ЭВ может рассматриваться в качестве одного из перспективных маркеров оценки плацентарного стресса.

Продуцируемые клетками трофобласта экзосомы и микровезикулы содержат также молекулы микроРНК, способные модулировать экспрессию различных генов в клетках-мишенях [124]. Роль микроРНК в патогенезе ПЭ активно изучается в настоящее время, предполагается, что изменение их спектра и уровня может приводить к нарушениям плацентации [37, 58] и развитию эндотелиальной дисфункции при данной патологии [54]. Сравнения состава микроРНК в СТБ-ЭВ при физиологической беременности и ПЭ пока не было проведено, однако в недавней работе было показано, что спектр микроРНК в экзосомах материнской периферической крови (включающих значительное количество плацентарных экзосом) изменяется при ПЭ, причем эти изменения касаются микроРНК, мишенями которых являются гены, участвующие в процессах миграции клеток, развития плаценты и ангиогенеза [139].

Предполагается, что одним из факторов, под влиянием которых изменяется молекулярный состав ЭВ трофобласта при ПЭ, является состояние гипоксии. Было показано изменение под воздействием гипоксии протеомного состава экзосом, высвобождаемых клетками цитотрофобласта и мезенхимальными стволовыми клетками плаценты [140, 142].

Таким образом, СТБ-ЭВ являются гетерогенной популяцией микровезикул, которая переносит в материнский кровоток широкий спектр плацентарных липидов, белков, микроРНК. Определение молекулярного состава СТБ-ЭВ может привести к открытию новых биомаркеров ПЭ, что в свою очередь позволит выработать новые подходы к лечению данного заболевания.

Возможная роль плацентарных ЭВ в патогенезе ПЭ, включающих избыточный системный воспалительный ответ, гиперкоагуляцию и сосудистую дисфункцию, как предполагают, обусловлена их взаимодействием с клетками-мишенями, в первую очередь с клетками иммунной системы, тромбоцитами, а также клетками эндотелия сосудов. Поэтому в следующих разделах будут рассмотрены имеющиеся в литературе сведения о воздействии ЭВ трофобласта на эти группы материнских клеток.

Взаимодействие плацентарных экстраклеточных везикул с клетками иммунной системы при физиологически протекающей беременности и преэклампсии

Плацентарные ЭВ влияют на функции материнских клеток, в том числе клеток иммунной системы (нейтрофилов, моноцитов и макрофагов, НК-клеток и Т-лимфоцитов) (табл. 1), а также тромбоцитов и эндотелиальных клеток [43, 112, 154, 156, 167, 172].

Продолжает возрастать количество исследований, свидетельствующих о роли СТБ-ЭВ и многоядерных агрегатов СТБ в комплексной модуляции функций материнских иммунных клеток. Результаты, полученные в экспериментах *in vitro*, позволяют предположить, что фрагменты СТБ участвуют в формировании иммунологической толерантности материнской иммунной системы к организму плода, в активации врожденного иммунитета матери, наблюдаемой при физиологической беременности, а также в формировании избыточного системного воспалительного ответа, сосудистой дисфункции и гиперкоагуляции при ПЭ.

Нейтрофилия является одним из первых клинических изменений на ранних сроках беременности. Во втором триместре с ней связана инфльтрация децидуальной оболочки уникальным подтипом нейтрофилов N2, обладающих иммуносупрессивными и ангиогенными функциями [14]. Их значение доказывается опытами, проведенными на мышах линии ВРН/5, у которых, наряду с умеренной гипертензией, наблюдаются такие патологии беременности, как артериопатия материнской децидуальной оболочки, нарушение плацентации и задержка роста плода. Эти проблемы опосредуются классическими нейтрофилами N1, которые привлекаются посредством активации комплемента к областям aberrантного децидуального воспаления [60]. Циркулирующие нейтрофилы человека активируются в третьем триместре беременности и при физиологически протекающей беременности, но при ПЭ происходит более выраженная их активация [138]. Выделенные из плацент женщин, страдающих ПЭ, СТБ-ЭВ вызывают усиление продукции нейтрофилами супероксидного радикала [13] и могут способствовать увеличению нейтрофильных внеклеточных ловушек в межворсинчатом пространстве плаценты при ПЭ [70]. Эти исследования подтверждают роль нейтрофилов, активированных СТБ-ЭВ, в развитии плацентарной патологии и избыточного системного воспалительного ответа при ПЭ. Взаимодействия СТБ-ЭВ с другими гранулоцитами до сих пор не исследованы.

Макрофаги удаляют остатки разрушенных клеток плаценты, клеточный дебрис в пределах трансплацентарного барьера [4]. Существуют убедительные доказательства взаимодействия между СТБ-ЭВ/многоядерными агрегатами СТБ и моноцитами/макрофагами при физиологической беременности и ПЭ. Моноциты периферической крови быстро связывают и поглощают СТБ-ЭВ как *in vitro*, так и *in vivo* [61, 156]. При инкубации моноцитов линии U937 или макрофагов, выделенных из периферической крови, с многоядерными агрегатами СТБ наблюда-

лись противовоспалительные изменения, такие как увеличение секреции противовоспалительных цитокинов, в частности IL-10, повышение экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы, снижение секреции провоспалительных цитокинов и поверхностной экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости класса II [6, 7]. Предполагается, что этот эффект обусловлен апоптотической природой многоядерных агрегатов СТБ, захват и фагоцитоз которых альвеолярными макрофагами и циркулирующими моноцитами может обуславливать толерантность клеток материнской иммунной системы к аллоантигенам плода [36]. Снижение врожденного иммунного ответа может также происходить через воздействие противовоспалительной молекулы CD200, ассоциированной с СТБ-ЭВ и многоядерными агрегатами СТБ [145].

Подавление адаптивной активности иммунных клеток матери является одним из механизмов, благодаря которым в плаценте не происходит иммунного отторжения. Тем не менее для физиологически протекающей беременности характерно состояние контролируемого системного воспалительного ответа, возникающего вследствие активации врожденных иммунных реакций матери, возможно, как физиологическая компенсация подавления иммунных ответов, опосредуемых Т- и НК-клетками [138]. Исследования показали, что СТБ-ЭВ, а также экзосомы вневорсинчатого цитотрофобласта стимулируют выброс провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови и моноцитами [20, 21, 61, 112, 156]. Это позволяет предположить, что СТБ-ЭВ могут стимулировать системный воспалительный ответ матери при беременности. Кроме того, обработка мононуклеарных клеток периферической крови препаратами СТБ-ЭВ, выделенных из эксплантатов плацент женщин, страдающих ПЭ, вызывала значительное повышение выброса провоспалительных цитокинов и хемокинов, включая IL-1 β , по сравнению с воздействием СТБ-ЭВ, выделенных из плацент женщин с физиологически протекающей беременностью [78]. Это позволяет предположить, что при ПЭ наблюдаются как качественные, так и количественные изменения молекулярного состава СТБ-ЭВ.

В-клетки, в значительной степени менее изученные в репродуктивной иммунологии, способны не только участвовать в гуморальном иммунном ответе путем выработки антител [19], но и осуществлять модуляцию иммунных ответов дендритных клеток, НК- и Т-клеток путем секреции различных цитокинов [25, 120]. В-клетки быстро связывают и поглощают СТБ-ЭВ, что предполагает возможность их взаимодействия

в условиях *in vivo*, однако функциональные последствия подобных контактов пока не известны [156].

Продуцируемые СТБ ЭВ снижают пролиферацию лимфоцитов периферической крови [169], при этом особенно выраженный ингибирующий эффект обнаружен в отношении Т-лимфоцитов [55]. Показано, что воздействие СТБ-ЭВ на Т-клетки ингибирует их активацию, пролиферацию и выброс цитокинов (следует отметить, что данный эффект зависел от способа выделения СТБ-ЭВ) [70], а также снижает экспрессию ζ -цепи (CD3 zeta) функционального комплекса Т-клеточного рецептора и Янус-киназы 3 (Jak3), усиливая апоптоз Т-клеток [136].

В настоящее время выявлен ряд синтезируемых трофобластом соединений, которые, выделяясь в свободном виде или в составе микровезикул, снижают цитотоксическую активность НК- и Т-клеток, а также оказывают иммуносупрессивное воздействие на материнские лимфоциты. Так, в составе СТБ-ЭВ обнаружены синтезируемые СТБ неклассические молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса MIC A/B и родственные им белки семейства ULBP (белок, связывающий антиген UL-16 цитомегаловируса) [75], являющиеся лигандами и ингибиторами рецептора NKG2D – основного активирующего иммунного рецептора, экспрессируемого большинством цитотоксических лимфоцитов человека: НК-клетками, CD8 $^+$ $\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ -субпопуляциями Т-клеток [114, 116]. Изолированные плацентарные экзосомы, содержащие лиганды рецептора NKG2D, снижают экспрессию этого рецептора на поверхности НК- и Т-клеток и, как следствие, их цитотоксическую активность [75].

В качестве другого класса модуляторов иммунологической активности лимфоцитов рассматриваются белки синцитин 1 и 2 (продукты эндогенного ретровируса человека), также экспрессируемые тканями трофобласта и жизненно необходимые для нормального развития плаценты [93, 105]. Синцитины были обнаружены в составе микровезикул, выделенных из культуральных сред эксплантатов плаценты, первичной культуры клеток ворсинчатого цитотрофобласта, культуры клеток линии BeWo, а также из периферической крови беременных женщин [77, 170, 175]. Содержащие синцитин 1 микровезикулы оказывали иммуносупрессорный эффект, сходный с воздействием рекомбинантного синцитина 1, снижая секрецию ряда цитокинов (IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , IFN γ , CXCL10 и др.) активированными лимфоцитами периферической крови [77, 170]. Предполагают, что находящиеся на поверхности экзосом синцитины

ТАБЛИЦА 1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПЛАЦЕНТАРНЫХ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ С КЛЕТКАМИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

TABLE 1. PLACENTAL EXTRACELLULAR VESICLES AND IMMUNE CELL INTERACTIONS

Тип везикул Vesicle type	Источник везикул Source of vesicles	Характеризация везикул Characterisation	Клетки иммунной системы Immune cells
Экзосомы, микровезикулы, апоптотические тела (?) СТБ STB exosomes, microvesicles, apoptotic bodies (?) [13]	Зрелая* плацента (механическое разрушение) Term* placenta (mechanical dissection)	–	Нейтрофилы здоровых мужчин Neutrophils from healthy male donors
Экзосомы, микровезикулы, апоптотические тела (?) СТБ STB exosomes, microvesicles, apoptotic bodies (?) [69]	Эксплантаты зрелой* плаценты (культивирование 72 ч) 72-h culture of term* placenta explants	–	Нейтрофилы здоровых доноров Neutrophils from healthy donors
Апоптотические многоядерные агрегаты СТБ и одноядерные клетки трофобласта Apoptotic SNA and mononuclear trophoblasts [7]	Эксплантаты плаценты 12 н.б. (культивирование 72 ч) 72-h culture of 12-week placenta explants	ИГХ IHC	Моноцитоподобные клетки линии U937 U937 monocytic leukemia cell line
Апоптотические многоядерные агрегаты СТБ и одноядерные клетки трофобласта Apoptotic SNA and mononuclear trophoblasts [6]	Эксплантаты зрелой плаценты (культивирование 72 ч) 72-h culture of term placenta explants	ИГХ IHC	Макрофаги моноцитарного происхождения небеременных женщин Monocyte-derived macrophages from non-pregnant donors
Экзосомы, микровезикулы, апоптотические тела (?) СТБ STB exosomes, microvesicles, apoptotic bodies (?) [112]	Зрелая плацента (механическое разрушение; перфузия ex vivo; культивирование эксплантатов 72 ч при 3% и 20% O₂) Term placenta (mechanical dissection, ex vivo placental perfusion, 72-h culture of explants at 3% and 20% O ₂)	Наличие ПЩФ Presence of PLAP	Моноциты мужчин Male monocytes

Таблица 1
Table 1

<p>Эффект ЭВ на клетки иммунной системы Effect of EV on immune cells</p>	<p>Влияние преэклампсии Effect of preeclampsia</p>	<p>Соединения, ответственные за наблюдаемые эффекты Compounds, responsible for the observed effects</p>
<p>Образование супероксидных радикалов активированными нейтрофилами Stimulated neutrophils to produce superoxide</p>	<p>↑ образования супероксидных радикалов активированными нейтрофилами Increased production of superoxide radicals by activated neutrophils</p>	<p>–</p>
<p>Образование НВЛ активированными нейтрофилами Activated neutrophils to form NETs</p>	<p>↑ образования НВЛ в межворсинчатом пространстве плаценты Increased formation of NETs in the intervillous space of the placenta</p>	<p>–</p>
<p>Фагоцитоз апоптотического дебриса; ↓ секреции IL-1β; ↑ секреции IL-10; ↑ экспрессии ИДО Decreased IL-1β release and increased IL-10 secretion and IDO expression following phagocytosis of apoptotic explant debris</p>	<p>–</p>	<p>–</p>
<p>↑ секреции противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-1ra); ↓ секреции провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-12p70, IL-8); ↓ экспрессии маркеров активации (MHC class II, CD80, CD86, CD40 и др.); ↑ экспрессии PD-L1; ↑ экспрессии ИДО Increased anti-inflammatory cytokine (IL-10, IL-1ra) release and decreased pro-inflammatory cytokine (IL-1β, IL-12p70, IL-8) release. Reduced surface markers of activation (MHC class II, CD80, CD86, CD40 etc.) and increased PD-L1 and IDO expression</p>	<p>–</p>	<p>–</p>
<p>Перфузаты, эксплантаты при 20% O₂: ↑ секреции провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-1β, IL-6); ↑ экспрессии CD54 Stimulated pro-inflammatory cytokine (IL-8, IL-1β, IL-6) secretion and CD54 expression following activation of monocytes by EV from perfusates and explants cultured at 20% O₂</p>	<p>–</p>	<p>–</p>

Тип везикул Vesicle type	Источник везикул Source of vesicles	Характеризация везикул Characterisation	Клетки иммунной системы Immune cells
<p>Экзосомы (?) ЭВТБ EVT exosomes (?) [20]</p>	<p>Клетки линии Swan71 (ЭВТБ первого триместра беременности) Swan71 cell line (first trimester EVT)</p>	<p>–</p>	<p>Моноцитоподобные клетки линии THP-1; макрофаги моноцитарного происхождения небеременных женщин THP-1 monocytic leukemia cell line; monocyte-derived macrophages from non-pregnant donors</p>
<p>Экзосомы (?) ЭВТБ EVT exosomes (?) [21]</p>	<p>Клетки линии Swan71 (ЭВТБ первого триместра беременности) Swan71 cell line (first trimester EVT)</p>	<p>–</p>	<p>Макрофаги моноцитарного происхождения небеременных женщин Monocyte-derived macrophages from non-pregnant donors</p>
<p>Экзосомы, микровезикулы, апоптотические тела (?) СТБ STB exosomes, microvesicles, apoptotic bodies (?) [70]</p>	<p>Зрелая плацента (эксплантаты – культивирование 72 ч, механическое разрушение, перфузия ex vivo) Term placenta (72-h culture of explants, mechanical dissection, ex vivo perfusion)</p>	<p>–</p>	<p>ФМА/иономицин-стимулированные Т-лимфоциты здоровых доноров PMA/ionomycin-stimulated T lymphocytes from healthy donors</p>
<p>Экзосомы, микровезикулы, апоптотические тела (?) СТБ STB exosomes, microvesicles, apoptotic bodies (?) [61]</p>	<p>Зрелая плацента (перфузия ex vivo) Term placenta (ex vivo perfusion)</p>	<p>–</p>	<p>МПК небеременных женщин; субпопуляции моноцитов и лимфоцитов PBMC from non-pregnant donors; subpopulations of monocytes and lymphocytes</p>

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

<p>Эффект ЭВ на клетки иммунной системы Effect of EV on immune cells</p>	<p>Влияние преэклампсии Effect of preeclampsia</p>	<p>Соединения, ответственные за наблюдаемые эффекты Compounds, responsible for the observed effects</p>
<p>Поглощение экзосом клетками линии ТНР-1; ↑ секреции провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, TNFα и др.); ↑ миграции клеток линии ТНР-1 и первичной культуры макрофагов Internalized by THP-1 cells and induced pro- inflammatory cytokine (IL-1β, IL-6, TNFα etc.) release and migration of THP-1 cells and primary macrophages</p>	<p>–</p>	<p>–</p>
<p>Поглощение экзосом; ↑ секреции IL-1β (достаточен поверхност- ный контакт с экзосомами) Internalized by macrophages and induced IL-1β release, surface contact with exosome being sufficient</p>	<p>–</p>	<p>Фибронектин Fibronectin</p>
<p>СТБ-ЭВ, независимо от способа выделения: отсутствие эффекта на активацию и апоп- тоз; э-СТБ-ЭВ и м-СТБ-ЭВ: ↓ пролиферации; ↓ синтеза и секреции IL-2 и IFNγ п-СТБ-ЭВ: ↑ пролиферации; ↑ синтеза и секреции IFNγ EV showed no effect on activation and apoptosis regardless of the isolation technique. Explant and mechanically derived EV inhibited proliferation, IL-2 and IFNγ synthesis and secretion by T cells. Perfusion-derived EV increased T cell proliferation and IFNγ synthesis and secretion</p>	<p>–</p>	<p>–</p>
<p>МПК: ↑ секреции провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-12p70, IL-18); моноциты: связывание везикул СТБ; ↑ экспрессии TNFα, IL-12p70; CD56⁺ и CD56⁻ лимфоциты: слабое ↑ экспрессии IFNγ PBMC increased pro-inflammatory cytokine (TNFα, IL-12p70, IL-18) release. Monocytes bound STB vesicles and increased TNFα and IL-12p70 expression. CD56⁺ and CD56⁻ lymphocytes slightly increased IFNγ expression</p>	<p>Отсутствие влияния на количество связан- ных с моноцитами вези- кул СТБ No effect on the number of STB vesicles associated with monocytes</p>	<p>–</p>

<p>Тип везикул Vesicle type</p>	<p>Источник везикул Source of vesicles</p>	<p>Характеризация везикул Characterisation</p>	<p>Клетки иммунной системы Immune cells</p>
<p>Экзосомы, микровезикулы, апоптотические тела (?) СТБ STB exosomes, microvesicles, apoptotic bodies (?) [156]</p>	<p>Зрелая плацента (перфузия ex vivo) Term placenta (ex vivo perfusion)</p>	<p>–</p>	<p>МПК беременных (35-39 н.б.) и небеременных женщин; субпопуляции моноцитов и В-лимфоцитов PBMC from pregnant (35-39 weeks) donors and non-pregnant donors; subpopulations of monocytes and B lymphocytes</p>
<p>Экзосомы, микровезикулы, апоптотические тела (?) ВТБ VT exosomes, microvesicles, apoptotic bodies (?) [77]</p>	<p>Клетки хориокарциномы линии BeWo BeWo choriocarcinoma cell line</p>	<p>–</p>	<p>МПК небеременных здоровых женщин PBMC from non-pregnant healthy donors</p>
<p>Экзосомы, микровезикулы, апоптотические тела (?) СТБ STB exosomes, microvesicles, apoptotic bodies (?) [78]</p>	<p>Эксплантаты плаценты 8-12 н.б. и зрелой плаценты Explants of 8-12-week and term placenta</p>	<p>ЭМ EM</p>	<p>МПК небеременных здоровых женщин PBMC from non-pregnant healthy donors</p>
<p>Экзосомы, микровезикулы, апоптотические тела (?) СТБ STB exosomes, microvesicles, apoptotic bodies (?) [169]</p>	<p>Зрелая плацента (механическое и ультразвуковое разрушение) Term placenta (mechanical and sonication disruption)</p>	<p>–</p>	<p>ФГА-стимулированные лимфоциты здоровых доноров PHA-stimulated lymphocytes from healthy donors</p>

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

<p>Эффект ЭВ на клетки иммунной системы Effect of EV on immune cells</p>	<p>Влияние преэклампсии Effect of preeclampsia</p>	<p>Соединения, ответственные за наблюдаемые эффекты Compounds, responsible for the observed effects</p>
<p>МПК: ↑ секреции провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8); моноциты и В-лимфоциты: связывание ПЩФ-позитивных везикул PBMC increased pro-inflammatory cytokine (TNFα, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8) release. Monocytes and B lymphocytes bound PLAP⁺ vesicles</p>	<p>–</p>	<p>–</p>
<p>↑ секреции провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNFα и др.) ↓ ЛПС-индуцированной секреции провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, TNFα и др.) Increased pro-inflammatory cytokine (IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNFα etc.) release and decreased LPS induced pro-inflammatory cytokine (IL-1β, IL-6, TNFα etc.) release</p>	<p>–</p>	<p>Синцитин 1 Syncytin 1</p>
<p>ЭВ плаценты 8-12 н.б. ↑ секреции провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17, TNFα и др.); ↓ ЛПС-индуцированной секреции IL-1β; ЭВ зрелой плаценты: отсутствие эффекта на секрецию IL-1β; ↑ секреции IL-8, TNFα; ↓ ЛПС-индуцированной секреции IL-1β 8-12-week placenta explants: EV increased pro-inflammatory cytokine (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17, TNFα etc.) release and decreased LPS induced IL-1β release; term placenta explants: EV showed no effect on IL-1β release, but increased IL-8 and TNFα release and decreased LPS induced IL-1β release</p>	<p>↑ секреции IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17, TNFα и др. ци- токинов; ↑ ЛПС-индуцированной секреции IL-1β, IL-6, TNFα и др. цитокинов Increased IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17, and TNFα release; increased LPS induced IL-1β, IL-6, and TNFα release</p>	<p>–</p>
<p>↓ пролиферации; ↓ секреции IL-2; ↓ экспрессии IL-2R P55 Inhibited proliferation, IL-2 release and IL-2R P55 expression</p>	<p>–</p>	<p>–</p>

Тип везикул Vesicle type	Источник везикул Source of vesicles	Характеризация везикул Characterisation	Клетки иммунной системы Immune cells
<p>Экзосомы, микровезикулы, апоптотические тела (?) цитотрофобласта Cytotrophoblast exosomes, microvesicles, apoptotic bodies (?) [5]</p>	<p>Первичная культура клеток трофобласта (8+ н.б.); линии клеток цитотрофобласта А3 и HTR8 Trophoblast primary cells (8+ weeks of gestation); cytotrophoblast A3 and HTR8 cells</p>	<p>–</p>	<p>Т-клетки линии Jurkat Jurkat cell line</p>
<p>Экзосомы СТБ STB exosomes [136]</p>	<p>Плазма крови 28-30 н.б. Plasma (28-30 weeks of gestation)</p>	<p>ЭМ, Вестерн блоттинг (ПЩФ) EM, western blot (PLAP)</p>	<p>МПК небеременных женщин; Т-клетки линии Jurkat PBMC from non-pregnant healthy donors; Jurkat cell line</p>
<p>Экзосомы СТБ STB exosomes [75]</p>	<p>Эксплантаты плаценты 8-16 н.б. (культивирование 24 ч) 24-h culture of 8-16-week placenta explants</p>	<p>ИЭМ (CD63, ПЩФ) IEM (CD63, PLAP)</p>	<p>МПК небеременных женщин; субпопуляции лимфоцитов PBMC from non-pregnant healthy donors; subpopulations of lymphocytes</p>
<p>Экзосомы СТБ STB exosomes [157]</p>	<p>Эксплантаты плаценты 8-14 н.б. (культивирование 24 ч) 24-h culture of 8-14-week placenta explants</p>	<p>ИЭМ (CD63, ПЩФ) IEM (CD63, PLAP)</p>	<p>МПК небеременных женщин; активированные Т-клетки линии Jurkat PBMC from non-pregnant healthy donors; activated Jurkat cells</p>

Примечание. * – зрелость плаценты указана для контрольных образцов, в случае преэклампсии срок беременности мог быть снижен; ↑ – повышение; ↓ – снижение; н.б. – неделя беременности; СТБ – синцитиотрофобласт; ВТБ – ворсинчатый цитотрофобласт; ЭВТБ – вневорсинчатый (экстравиллезный) цитотрофобласт; ЭВ – экстраклеточные везикулы; э-СТБ-ЭВ, м-СТБ-ЭВ, п-СТБ-ЭВ – экстраклеточные везикулы синцитиотрофобласта, полученные в результате культивирования эксплантатов плаценты, ее механического разрушения и перфузии *ex vivo* соответственно; МПК – мононуклеары периферической крови; НВЛ – нейтрофильная внеклеточная ловушка; ПЩФ – плацентарная щелочная фосфатаза; ИДО – индоламин-

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Эффект ЭВ на клетки иммунной системы Effect of EV on immune cells	Влияние преэклампсии Effect of preeclampsia	Соединения, ответственные за наблюдаемые эффекты Compounds, responsible for the observed effects
<p>Индукция апоптоза Induced apoptosis</p>	-	FasL
<p>Т-клетки линии Jurkat: ↑ экспрессии SOCS-2; ↓ экспрессии CD3 zeta и JAK3; субпопуляции CD8⁺ и CD4⁺Т-лимфоцитов: ↓ экспрессии CD3 zeta Increased SOCS-2 and decreased CD3 zeta and JAK3 expression in Jurkat cells and decreased CD3-zeta expression in CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes</p>	-	FasL, PD-L1/B7-H1 (?)
<p>МПК: ↓ поверхностной экспрессии NKG2D; ↓ цитотоксической активности; субпопуляции NK/CD56⁺, CD8⁺ и γδ Т-клеток: ↓ поверхностной экспрессии NKG2D (без нарушения синтеза перфорина) Down regulated NKG2D receptor expression and decreased cytotoxic activity in PBMC and down regulated NKG2D receptor expression (without affecting the perforin-mediated lytic pathway) in subpopulations of NK/CD56⁺, CD8⁺ и γδ T lymphocytes</p>	-	MIC A/B, ULBP1-5
<p>Индукция апоптоза Induced apoptosis</p>	-	<p>Мембранно-связанные формы FasL и TRAIL Membrane FasL and TRAIL</p>

2,3-диоксигеназа; ИГХ – иммуногистохимия; ЛПС – липополисахарид; ФГА – фитогемагглютинин; ФМА – 4-форбол-12-миристан-13-ацетат; ЭМ – электронная микроскопия; ИЭМ – иммуноэлектронная микроскопия.

Note. *, term placenta for control samples; in the case of pre-eclampsia, gestational age could be lowered; STB, syncytiotrophoblast; VT, villous cytotrophoblast; EVT, extravillous cytotrophoblast; EV, extracellular vesicle; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; NET, neutrophil extracellular trap; PLAP, placental alkaline phosphatase; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; IHC, immunohistochemistry; LPS, lipopolysaccharide; PHA, phytohemagglutinin; PMA, 4-phorbol-12-myristate-13-acetate; EM, electron microscopy; IEM, immunoelectron microscopy.

непосредственно участвуют в механизмах, обеспечивающих контакт и поглощение экзосом клетками-мишенями [105, 175]. При ПЭ наблюдалось снижение по сравнению с физиологической беременностью экспрессии синцитина в СТБ [95], а также в экзосомах, выделенных из периферической крови [175].

В составе экзосом СТБ обнаружен также цитокин TGF- β [114], снижающий экспрессию NKG2D рецепторов на поверхности NK-клеток и их цитотоксическую активность [94].

Состояние иммунной привилегии плода поддерживается плацентой, в частности благодаря экспрессии клетками трофобласта проапоптотических молекул, таких как FasL (Fas-лиганд), TRAIL (индуцирующий апоптоз лиганд семейства TNF), B7-H1 (PD-L1, CD274) (лиганд белка программируемой смерти-1) и его костимулятор B7-H3 (CD276) [114]. Было показано, что у человека FasL синтезируется трофобластом начиная с первого триместра беременности, при этом FasL не обнаруживается на поверхности клеток, а хранится в цитоплазматических секреторных гранулах в составе интралюминальных микровезикул, а затем секретируется в составе экзосом [5, 56, 136]. Связанные с СТБ-ЭВ Fas-лиганд и TRAIL способствуют апоптозу Т-клеток линии Jurkat, а также активированных мононуклеарных клеток периферической крови [157]. При ПЭ наблюдали снижение экспрессии FasL и повышение экспрессии Fas клетками трофобласта [11, 130, 171], а также снижение экспрессии Fas-рецептора на поверхности децидуальных NK-клеток и цитотоксических Т-клеток [45, 46]. Такое изменение соотношения проапоптотических молекул в клетках трофобласта и цитотоксических лимфоцитах может являться одним из механизмов, приводящих к повышению уровня апоптоза СТБ, наблюдаемому при ПЭ [11, 171].

Наряду с общим ингибированием цитотоксичности Т- и NK-клеток, содержащиеся в ЭВ трофобласта антигены гистосовместимости могут также вносить вклад в формирование иммунологической толерантности материнского организма [1]. Клетки трофобласта не содержат классических высокополиморфных молекул главного комплекса гистосовместимости HLA-A и HLA-B [55]. Вместе с тем на поверхности клеток экстравиллезного трофобласта экспрессируется классическая молекула главного комплекса гистосовместимости HLA-C (в ассоциированной с β_2 -микроглобулином форме), а также неклассические низкополиморфные молекулы гистосовместимости локусов HLA-G, HLA-E и HLA-F [55, 72]. Экспрессия мембранно-связанной формы HLA-G на поверхности клеток ворсинчатого трофобласта [18, 84], а также в экзосомах СТБ зрелой плаценты [91, 114] не была

обнаружена, что привело к господствующему в настоящий момент мнению об отсутствии экспрессии HLA-G в СТБ [99, 114, 164]. Вместе с тем существуют данные о возможной экспрессии в СТБ и ворсинчатом цитотрофобласте растворимой, секретлируемой формы HLA-G [84, 155]. Мембранно-связанные молекулы HLA-G5 присутствуют в составе экзосом недифференцированного ворсинчатого цитотрофобласта, однако, по мере его дифференциации и синцитиализации, присутствие HLA-G5 в составе этих экзосом снижается вплоть до полного исчезновения [91]. Последние исследования показали также наличие в СТБ антигенов HLA-F и HLA-C, предположительно в мембранно-связанной и растворимой форме [72].

Важной особенностью всех этих антигенов является то, что они являются лигандами рецепторов децидуальных NK-клеток: HLA-E служит лигандом для ингибирующего рецептора CD94/NKG2, HLA-F и HLA-C могут взаимодействовать с рецепторами KIR3DL1/2 и KIR2DS4, HLA-G – с рецепторами ILT2, ILT4 и KIR2DL4 [65, 72]. Молекула локуса HLA-G подавляет цитотоксическую и пролиферативную активность NK-клеток, цитотоксических CD8⁺Т-лимфоцитов, стимулирует формирование Treg-клеток, оказывает влияние на созревание и функции антигенпрезентирующих клеток [35].

Установлено, что пониженная или измененная экспрессия HLA-G клетками вневорсинчатого цитотрофобласта, а также полиморфизм гена HLA-G связаны с риском возникновения ПЭ [48, 63, 160]. Предполагают, что клетки трофобласта с нарушенной экспрессией HLA-G более уязвимы для децидуальных NK-клеток, вследствие чего может снижаться глубина инвазии трофобласта и нарушаться процесс ремоделирования спиральных артерий миометрия, частично опосредуемый инвазивным трофобластом. Недостаточное ремоделирование спиральных артерий может привести к нарушениям маточно-плацентарного кровотока и каскаду событий, приводящих к материнскому синдрому ПЭ. Показано, что ПЭ различным образом влияет на экспрессию подтипов этого антигена в плаценте: уровень HLA-G1 значительно снижается как при ранней, так и при поздней ПЭ, в то время как уровень HLA-G5 при поздней ПЭ повышается [74].

В СТБ экспрессируются также полученные от отца минорные антигены гистосовместимости, такие как белки MIC A/B и ULBP, а также DDX3Y и HA-1 [164]. Минорные антигены гистосовместимости DDX3Y и HA-1 выделяются из эксплантатов плаценты в составе многоядерных агрегатов СТБ, что может представлять собой механизм, с помощью которого материнская иммунная система подвергается воздействию

аллоантигенов плода и индуцирует антиген-специфические регуляторные цитотоксические Т-клетки, обеспечивая материнскую иммунологическую толерантность [79, 101]. Экспрессия HA-1 в клетках цитотрофобласта увеличивается при гипоксии, а также повышается в СТБ и его многоядерных агрегатах при ПЭ [101]. Повышенная экспрессия HA-1 в СТБ и его многоядерных агрегатах в сочетании с повышенной депортацией СТБ и повышением уровня провоспалительных цитокинов могут приводить к наблюдаемой при ПЭ избыточной активации материнской иммунной системы.

Следующей возможной мишенью плацентарных ЭВ являются тромбоциты, через активацию которых, как предполагают, СТБ-ЭВ могут вносить вклад в развитие состояния гиперкоагуляции при ПЭ.

Экстраклеточные везикулы и гиперкоагуляция при преэклампсии

Одной из характерных черт ПЭ является избыточная активация системы свертывания крови и повышение активации тромбоцитов [108]. В СТБ и ворсинчатом цитотрофобласте продуцируются тканевый фактор и ингибиторы пути тканевого фактора, тканевой активатор плазминогена и ингибиторы активатора плазминогена 1 и 2 [8, 68, 80, 131, 168]. Эти факторы, участвующие в регуляции процесса коагуляции, также присутствуют в СТБ-ЭВ [9]. У женщин с ПЭ в СТБ наблюдалось увеличение экспрессии тканевого фактора с одновременным снижением уровня его ингибиторов [168], повышение количества содержащих тканевый фактор ЭВ в крови [9], сопровождавшееся повышением активности тканевого фактора в СТБ-ЭВ, что проявлялось в более высоком уровне активации тромбоцитов под действием СТБ-ЭВ женщин с ПЭ по сравнению с СТБ-ЭВ женщин с физиологической беременностью [59, 167]. Более того, терапия с использованием аспирина, рекомендуемого женщинам с высоким риском развития ПЭ для предотвращения агрегации тромбоцитов [96], блокировала агрегацию тромбоцитов, вызванную СТБ-ЭВ женщин с ПЭ, что является возможной причиной благоприятного клинического эффекта аспирина [167].

Поскольку эндотелиальная дисфункция является одним из центральных элементов синдрома ПЭ, особое внимание исследователей, помимо воздействия на клетки иммунной системы и тромбоциты, обращено на воздействие плацентарных ЭВ на эндотелиальные клетки.

Экстраклеточные везикулы трофобласта и дисфункция эндотелия при преэклампсии

К настоящему времени появилось значительное число работ, посвященных влиянию на клетки эндотелия дегриса СТБ, состоящего

из многоядерных агрегатов и СТБ-ЭВ меньших размеров [38, 39, 40, 150, 177]. Согласно одной из гипотез, при физиологически протекающей беременности структурный материал трофобласта отделяется в основном в ходе процессов, сходных с апоптозом, и оказывает подавляющий эффект на эндотелиальные иммунные реакции, в то время как при ПЭ частицы трофобласта отделяются и попадают в кровяное русло в большей степени в ходе процессов некротического характера [40, 82]. Проведенные *in vitro* эксперименты по изучению поглощения частиц трофобласта эндотелиальными клетками, полученными из капилляров легочной артерии, показали, что поглощение именно некротического, а не апоптотического дегриса трофобласта вызывает активацию клеток эндотелия, в то же время апоптотический дегрис обладает толерогенными свойствами, снижая активацию эндотелиальных клеток, наблюдаемую после поглощения некротического дегриса [39, 40, 41]. Преобладание у дегриса трофобласта толерогенных свойств при физиологической беременности может играть важную роль в снижении реакции материнского эндотелия на некротический материал СТБ, что особенно важно для эндотелия легочного капиллярного русла, где задерживается значительное количество крупных фрагментов, депортируемых СТБ. Под воздействием дегриса СТБ, выделенного из плацент женщин с физиологически протекающей беременностью, наблюдались изменения в транскриптоме и протеоме эндотелиальных клеток, которые могут отражать запуск механизмов, обеспечивающих адаптацию материнской сердечно-сосудистой системы к беременности [177]. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (линия HUVEC) легко связывают и поглощают СТБ-ЭВ [164]. Показано, что СТБ-ЭВ обладают антиангиогенными и гипотензивными свойствами, ингибируя *in vitro* рост монослоя эндотелиальных клеток, а также снижая *ex vivo* релаксацию предварительно суженных (с помощью норадреналина) кровеносных сосудов [43, 71, 76, 152]. Кроме того, обработанные СТБ-ЭВ супернатанты культуры клеток линии HUVEC способны активировать нейтрофилы, что указывает на возможную роль СТБ-ЭВ как в дисфункции эндотелиальных клеток, так и в развитии избыточного воспалительного ответа при ПЭ [176].

Отмечено, что дегрис СТБ, полученный из плацент женщин с ПЭ, содержит повышенный уровень IL-1 β , прокаспазы 1 и активной каспазы 1, а также активирован *in vitro* микрососудистые эндотелиальные клетки линии HMEC-1 [150]. Недавно было показано, что полученные путем перфузии плаценты и выделенные из периферической крови СТБ-ЭВ содержат активную

эндотелиальную NO-синтазу, но не содержат растворимой индуцибельной NO-синтазы. При этом активность эндотелиальной NO-синтазы в составе СТБ-ЭВ снижалась при ПЭ, что может быть одной из причин снижения биодоступности оксида азота при данном заболевании [118]. Негативное воздействие совокупного дегриса СТБ и отдельной фракции СТБ-ЭВ на функции эндотелиальных клеток, продемонстрированное в опытах *in vitro* и *ex vivo*, позволяет предположить, что повышение их уровня в крови вносит вклад в развитие дисфункции эндотелия при ПЭ. Кроме того, воздействие СТБ-ЭВ на материнские эндотелиальные клетки может быть опосредовано описанным выше их влиянием на активность иммунных клеток и тромбоцитов. Поскольку в СТБ-ЭВ содержится широкий спектр микроРНК, в частности регулирующих активность генов, вовлеченных в регуляцию ангиогенеза, можно предположить, что изменение их уровней при ПЭ может служить одной из причин эндотелиальной дисфункции [54, 139].

Разнообразие источников, размера и состава продуцируемых плацентой СТБ-ЭВ может обуславливать разнообразие их эффектов в отношении иммунной, сердечно-сосудистой и свертывающей систем матери. Предполагается, что при физиологических условиях в материнском кровотоке существует естественный баланс между количеством микровезикул и экзосом плацентарного происхождения, необходимый для благополучного протекания беременности. Экзосомы, характеризующиеся эндосомальным происхождением и малыми размерами, оказывают положительный эффект на процесс плацентации [141], а также обладают иммуносупрессивными свойствами, благодаря чему участвуют в формировании иммунологической толерантности при беременности [114, 129]. Более крупные микровезикулы, отщепляющиеся от наружной мембраны клеток СТБ и вневорсинчатого цитотрофобласта, вносят вклад в формирование умеренной системной воспалительной реакции и гиперкоагуляции, свойственных для физиологической беременности, благодаря наличию у них иммуностимулирующей, антиангиогенной и прокоагуляционной активности [129]. При ПЭ окислительный и воспалительный стресс вызывает активацию СТБ, приводящую к усиленному высвобождению более крупных микровезикул, включающих как иммуносупрессивный апоптотический материал, так и содержимое некротического происхождения, обладающее иммуностимулирующей, антиангиогенной и прокоагулянтной активностью [129]. Таким образом, изменение баланса между циркулирующими плацентарными экзосомами и микровезикулами мо-

жет играть центральную роль в развитии ПЭ [114, 129]. Поэтому на сегодняшний день одной из актуальных задач является установление диапазона концентраций плацентарных микровезикул и экзосом в материнском кровотоке, а также количественного соотношения между этими двумя видами везикул при физиологически протекающей беременности. Использование этого показателя может послужить надежным и неинвазивным инструментом для оценки окислительного стресса в плаценте, а также для прогнозирования и мониторинга патологических состояний беременности [114].

Заключение

Существенная роль в процессе физиологической беременности отводится взаимодействиям между клетками плаценты и клетками иммунной, сердечно-сосудистой и свертывающей систем матери (клетки эндотелия сосудов, циркулирующие лейкоциты и тромбоциты), осуществляемым при помощи ЭВ. Исходя из комплексной природы возникновения ПЭ, можно предположить, что взаимодействие плацентарных и материнских клеток, опосредуемое ЭВ, способствует инициации и развитию ПЭ как при наличии, так и при отсутствии выявленных предшествующих факторов риска. Для выяснения механизмов инициации и прогрессии ПЭ требуется дальнейшее изучение воздействия плацентарных ЭВ на материнские клетки, а также поиск находящихся в их составе функционально значимых молекул (белков, липидов и РНК), обеспечивающих передачу сигналов клеткам-мишеням. Понимание роли конкретных компонентов плацентарных ЭВ в патогенезе ПЭ будет способствовать развитию панели биомаркеров, которые помогут выявить беременных женщин с риском развития ПЭ. Кроме того, поскольку между материнскими сердечно-сосудистой, иммунной и свертывающей системами могут существовать двунаправленные связи, опосредованные ЭВ, есть вероятность того, что путем выбора в качестве терапевтической цели при ПЭ одной из этих систем удастся улучшить функционирование двух других систем. Так как при физиологически протекающей беременности большинство ЭВ в крови имеют тромбоцитарное происхождение, терапевтические мероприятия, направленные на стабилизацию тромбоцитов, могут скорректировать состояние избыточного воспаления и гиперкоагуляции при ПЭ, что в свою очередь позволит уменьшить степень сосудистой дисфункции и активации иммунной системы.

Список литературы / References

1. Айламазян Э.К., Степанова О.И., Сельков С.А., Соколов Д.И. Клетки иммунной системы матери и клетки трофобласта: «конструктивное сотрудничество» ради достижения совместной цели // Вестник РАМН, 2013. Т. 68, № 11. С. 12-21. [Ailamazyan E.K., Stepanova O.I., Selkov S.A., Sokolov D.I. Cells of immune system of mother and trophoblast cells: constructive cooperation for the sake of achievement of the joint purpose. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2013, Vol. 68, no. 11, pp. 12-21. (In Russ.)]
2. Милованов А.П., Волощук И.Н. Депортированный синцитиотрофобласт и плацентарные микро-частицы в организме матери при нормальной беременности и преэклампсии (28 лет спустя) // Архив патологии, 2017. Т. 79, № 1. С. 61-67. [Milovanov A.P., Voloshchuk I.N. Deported syncytiotrophoblast and placental microparticles in the mother's body during normal pregnancy and preeclampsia (28 years later). *Arkhiv patologii = Archive of Pathology*, 2017, Vol. 79, no. 1, pp. 61-67. (In Russ.)]
3. Abalos E., Cuesta C., Grosso A.L., Chou D., Say L. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2013, Vol. 170, no. 1, pp. 1-7.
4. Abrahams V.M., Kim Y.M., Straszewski S.L., Romero R., Mor G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2004, Vol. 51, no. 4, pp. 275-282.
5. Abrahams V.M., Straszewski-Chavez S.L., Guller S., Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol. Hum. Reprod.*, 2004, Vol. 10, no. 1, pp. 55-63.
6. Abumaree M.H., Chamley L.W., Badri M., El-Muzaini M.F. Trophoblast debris modulates the expression of immune proteins in macrophages: a key to maternal tolerance of the fetal allograft? *J. Reprod. Immunol.*, 2012, Vol. 94, no. 2, pp. 131-141.
7. Abumaree M.H., Stone P.R., Chamley L.W. The effects of apoptotic, deported human placental trophoblast on macrophages: possible consequences for pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2006, Vol. 72, no. 1-2, pp. 33-45.
8. Aharon A., Brenner B., Katz T., Miyagi Y., Lanir N. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor levels in trophoblast cells: implications for placental hemostasis. *Thromb. Haemost.*, 2004, Vol. 92, no. 4, pp. 776-786.
9. Aharon A., Katzenell S., Tamari T., Brenner B. Microparticles bearing tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in gestational vascular complications. *J. Thromb. Haemost.*, 2009, Vol. 7, no. 6, pp. 1047-1050.
10. Alavi A., Axford J.S. The pivotal nature of sugars in normal physiology and disease. *Wien Med. Wochenschr.*, 2006, Vol. 156, no. 1-2, pp. 19-33.
11. Allaire A.D., Ballenger K.A., Wells S.R., McMahon M.J., Lessey B.A. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet. Gynecol.*, 2000, Vol. 96, no. 2, pp. 271-276.
12. Almeida A., Kolarich D. The promise of protein glycosylation for personalised medicine. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, Vol. 1860, no. 8, pp. 1583-1595.
13. Aly A.S., Khandelwal M., Zhao J., Mehmet A.H., Sammel M.D., Parry S. Neutrophils are stimulated by syncytiotrophoblast microvillous membranes to generate superoxide radicals in women with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2004, Vol. 190, no. 1, pp. 252-258.
14. Amsalem H., Kwan M., Hazan A., Zhang J., Jones R.L., Whittle W., Kingdom J.C., Croy B.A., Lye S.J., Dunk C.E. Identification of a novel neutrophil population: proangiogenic granulocytes in second-trimester human decidua. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 6, pp. 3070-3079.
15. Ananth C.V., Keyes K.M., Wapner R.J. Pre-eclampsia rates in the United States, 1980-2010: age-period-cohort analysis. *BMJ*, 2013, Vol. 347, f6564. doi: 10.1136/bmj.f6564.
16. Anderson H.C., Mulhall D., Garimella R. Role of extracellular membrane vesicles in the pathogenesis of various diseases, including cancer, renal diseases, atherosclerosis, and arthritis. *Lab. Invest.*, 2010, Vol. 90, no. 11, pp. 1549-1557.
17. Andreu Z., Yanez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 442.
18. Apps R., Murphy S.P., Fernando R., Gardner L., Ahad T., Moffett A. Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. *Immunology*, 2009, Vol. 127, no. 1, pp. 26-39.
19. Arck P.C., Hecher K., Solano M.E. B cells in pregnancy: functional promiscuity or tailored function? *Biol. Reprod.*, 2015, Vol. 92, no. 1, p. 12.
20. Atay S., Gercel-Taylor C., Suttles J., Mor G., Taylor D.D. Trophoblast-derived exosomes mediate monocyte recruitment and differentiation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 65, no. 1, pp. 65-77.
21. Atay S., Gercel-Taylor C., Taylor D.D. Human trophoblast-derived exosomal fibronectin induces pro-inflammatory IL-1beta production by macrophages. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 66, no. 4, pp. 259-269.
22. Attwood H.D., Park W.W. Embolism to the lungs by trophoblast. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.*, 1961, Vol. 68, no. 4, pp. 611-617.
23. Baig S., Kothandaraman N., Manikandan J., Rong L., Ee K.H., Hill J., Lai C.W., Tan W.Y., Yeoh F., Kale A., Su L.L., Biswas A., Vasoo S., Choolani M. Proteomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in preeclampsia. *Clin. Proteomics*, 2014, Vol. 11, no. 1, p. 40.
24. Baig S., Lim J.Y., Fernandis A.Z., Wenk M.R., Kale A., Su L.L., Biswas A., Vasoo S., Shui G., Choolani M. Lipidomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in adverse pregnancy outcomes. *Placenta*, 2013, Vol. 34, no. 5, pp. 436-442.
25. Bao Y., Cao X. The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: a comprehensive review. *J. Autoimmun.*, 2014, Vol. 55, pp. 10-23.

26. Batista B.S., Eng W.S., Pilobello K.T., Hendricks-Munoz K.D., Mahal L.K. Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *J. Proteome Res.*, 2011, Vol. 10, no. 10, pp. 4624-4633.
27. Biermann M., Maueroeder C., Brauner J.M., Chaurio R., Janko C., Herrmann M., Munoz L.E. Surface code – biophysical signals for apoptotic cell clearance. *Phys. Biol.*, 2013, Vol. 10, no. 6, 065007. doi: 10.1088/1478-3975/10/6/065007.
28. Brinkman van der Linden E.C., Hurtado-Ziola N., Hayakawa T., Wiggleton L., Benirschke K., Varki A., Varki N. Human-specific expression of Siglec-6 in the placenta. *Glycobiology*, 2007, Vol. 17, no. 9, pp. 922-931.
29. Burton G.J. Deportation of syncytial sprouts from the term human placenta. *Placenta*, 2011, Vol. 32, no. 1, pp. 96-98.
30. Burton G.J., Fowden A.L. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2015, Vol. 370, no. 1663, 20140066. doi: 10.1098/rstb.2014.0066.
31. Burton G.J., Jones C.J. Syncytial knots, sprouts, apoptosis, and trophoblast deportation from the human placenta. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.*, 2009, Vol. 48, no. 1, pp. 28-37.
32. Burton G.J., Woods A.W., Jauniaux E., Kingdom J.C. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*, 2009, Vol. 30, no. 6, pp. 473-482.
33. Burton G.J., Yung H.W. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens.*, 2011, Vol. 1, no. 1-2, pp. 72-78.
34. Caniggia I., Winter J., Lye S.J., Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*, 2000, Vol. 21, Suppl. A, pp. S25-S30.
35. Carosella E.D., Gregori S., LeMaout J. The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 25, pp. 6499-6505.
36. Chamley L.W., Chen Q., Ding J., Stone P.R., Abumaree M. Trophoblast deportation: just a waste disposal system or antigen sharing? *J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 88, no. 2, pp. 99-105.
37. Chen D.B., Wang W. Human placental micrornas and preeclampsia. *Biol. Reprod.*, 2013, Vol. 88, no. 5, p. 130.
38. Chen Q., Chen L., Liu B., Vialli C., Stone P., Ching L.M., Chamley L. The role of autocrine TGFbeta1 in endothelial cell activation induced by phagocytosis of necrotic trophoblasts: a possible role in the pathogenesis of pre-eclampsia. *J. Pathol.*, 2010, Vol. 221, no. 1, pp. 87-95.
39. Chen Q., Guo F., Jin H.Y., Lau S., Stone P., Chamley L. Phagocytosis of apoptotic trophoblastic debris protects endothelial cells against activation. *Placenta*, 2012, Vol. 33, no. 7, pp. 548-553.
40. Chen Q., Stone P.R., McCowan L.M., Chamley L.W. Phagocytosis of necrotic but not apoptotic trophoblasts induces endothelial cell activation. *Hypertension*, 2006, Vol. 47, no. 1, pp. 116-121.
41. Chen Y., Huang Y., Jiang R., Teng Y. Syncytiotrophoblast-derived microparticle shedding in early-onset and late-onset severe pre-eclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 2012, Vol. 119, no. 3, pp. 234-238.
42. Chua S., Wilkins T., Sargent I., Redman C. Trophoblast deportation in pre-eclamptic pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1991, Vol. 98, no. 10, pp. 973-979.
43. Cockell A.P., Larmont J.G., Smarason A.K., Redman C.W., Sargent I.L., Poston L. Human placental syncytiotrophoblast microvillous membranes impair maternal vascular endothelial function. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1997, Vol. 104, no. 2, pp. 235-240.
44. Colombo M., Raposo G., Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2014, Vol. 30, pp. 255-289.
45. Darmochwal-Kolarz D., Leszczynska-Gorzela B., Rolinski J., Oleszczuk J. The expression and concentrations of Fas/APO-1 (CD95) antigen in patients with severe pre-eclampsia. *J. Reprod. Immunol.*, 2001, Vol. 49, no. 2, pp. 153-164.
46. Darmochwal-Kolarz D., Rolinski J., Leszczynska-Gorzela B., Oleszczuk J. Fas antigen expression on the decidual lymphocytes of pre-eclamptic patients. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2000, Vol. 43, no. 4, pp. 197-201.
47. Dignat-George F., Camoin-Jau L., Sabatier F., Arnoux D., Anfosso F., Bardin N., Veit V., Combes V., Gentile S., Moal V., Sanmarco M., Sampol J. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb. Haemost.*, 2004, Vol. 91, no. 4, pp. 667-673.
48. Djuricic S., Hviid T.V. HLA class Ib molecules and immune cells in pregnancy and preeclampsia. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 652.
49. Douglas G.W., Thomas L., Carr M., Cullen N.M., Morris R. Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1959, Vol. 78, no. 5, pp. 960-973.
50. Dragovic R.A., Collett G.P., Hole P., Ferguson D.J., Redman C.W., Sargent I.L., Tannetta D.S. Isolation of syncytiotrophoblast microvesicles and exosomes and their characterisation by multicolour flow cytometry and fluorescence nanoparticle tracking analysis. *Methods*, 2015, Vol. 87, pp. 64-74.
51. Dragovic R.A., Southcombe J.H., Tannetta D.S., Redman C.W., Sargent I.L. Multicolor flow cytometry and nanoparticle tracking analysis of extracellular vesicles in the plasma of normal pregnant and pre-eclamptic women. *Biol. Reprod.*, 2013, Vol. 89, no. 6, p. 151.
52. Duckitt K., Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*, 2005, Vol. 330, p. 565.
53. el Andaloussi S., Mager I., Breakefield X.O., Wood M.J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2013, Vol. 12, no. 5, pp. 347-357.

54. Escudero C.A., Herlitz K., Troncoso F., Acurio J., Aguayo C., Roberts J.M., Truong G., Duncombe G., Rice G., Salomon C. Role of extracellular vesicles and microRNAs on dysfunctional angiogenesis during preeclamptic pregnancies. *Front. Physiol.*, 2016, Vol. 7, p. 98.
55. Ferreira L.M., Meissner T.B., Tilburgs T., Strominger J.L. HLA-G: at the interface of maternal-fetal tolerance. *Trends Immunol.*, 2017, Vol. 38, no. 4, pp. 272-286.
56. Frangsmyr L., Baranov V., Nagaeva O., Stendahl U., Kjellberg L., Mincheva-Nilsson L. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol. Hum. Reprod.*, 2005, Vol. 11, no. 1, pp. 35-41.
57. Franz S., Herrmann K., Furnrohr B.G., Sheriff A., Frey B., Gaipl U.S., Voll R.E., Kalden J.R., Jack H.M., Herrmann M. After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death Differ.*, 2007, Vol. 14, no. 4, pp. 733-742.
58. Fu G., Brkic J., Hayder H., Peng C. MicroRNAs in human placental development and pregnancy complications. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, Vol. 14, no. 3, pp. 5519-5544.
59. Gardiner C., Tannetta D.S., Simms C.A., Harrison P., Redman C.W., Sargent I.L. Syncytiotrophoblast microvesicles released from pre-eclampsia placenta exhibit increased tissue factor activity. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 10, e26313. doi: 10.1371/journal.pone.0026313.
60. Gelber S.E., Brent E., Redecha P., Perino G., Tomlinson S., Davisson R.L., Salmon J.E. Prevention of defective placentation and pregnancy loss by blocking innate immune pathways in a syngeneic model of placental insufficiency. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 3, pp. 1129-1138.
61. Germain S.J., Sacks G.P., Sooranna S.R., Sargent I.L., Redman C.W. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 9, pp. 5949-5956.
62. Gilani S.I., Weissgerber T.L., Garovic V.D., Jayachandran M. Preeclampsia and extracellular vesicles. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2016, Vol. 18, no. 9, p. 68.
63. Goldman-Wohl D., Yagel S. Preeclampsia – a placenta developmental biology perspective. *J. Reprod. Immunol.*, 2009, Vol. 82, no. 2, pp. 96-99.
64. Gonzalez-Quintero V.H., Smarkusky L.P., Jimenez J.J., Mauro L.M., Jy W., Hortsman L.L., O'Sullivan M.J., Ahn Y.S. Elevated plasma endothelial microparticles: preeclampsia versus gestational hypertension. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2004, Vol. 191, no. 4, pp. 1418-1424.
65. Goodridge J.P., Burian A., Lee N., Geraghty D.E. HLA-F and MHC class I open conformers are ligands for NK cell Ig-like receptors. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 7, pp. 3553-3562.
66. Goswami D., Tannetta D.S., Magee L.A., Fuchisawa A., Redman C.W., Sargent I.L., von Dadelszen P. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta*, 2006, Vol. 27, no. 1, pp. 56-61.
67. Gould S.J., Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*, 2013, Vol. 2, no. 1, 20389. doi: 10.3402/jev.v2i0.20389.
68. Guller S., Tang Z., Ma Y.Y., Di Santo S., Sager R., Schneider H. Protein composition of microparticles shed from human placenta during placental perfusion: potential role in angiogenesis and fibrinolysis in preeclampsia. *Placenta*, 2011, Vol. 32, no. 1, pp. 63-69.
69. Gupta A.K., Hasler P., Holzgreve W., Gebhardt S., Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum. Immunol.*, 2005, Vol. 66, no. 11, pp. 1146-1154.
70. Gupta A.K., Rusterholz C., Holzgreve W., Hahn S. Syncytiotrophoblast micro-particles do not induce apoptosis in peripheral T lymphocytes, but differ in their activity depending on the mode of preparation. *J. Reprod. Immunol.*, 2005, Vol. 68, no. 1-2, pp. 15-26.
71. Gupta A.K., Rusterholz C., Huppertz B., Malek A., Schneider H., Holzgreve W., Hahn S. A comparative study of the effect of three different syncytiotrophoblast micro-particles preparations on endothelial cells. *Placenta*, 2005, Vol. 26, no. 1, pp. 59-66.
72. Hackmon R., Pinnaduwa L., Zhang J., Lye S.J., Geraghty D.E., Dunk C.E. Definitive class I human leukocyte antigen expression in gestational placentation: HLA-F, HLA-E, HLA-C, and HLA-G in extravillous trophoblast invasion on placentation, pregnancy, and parturition. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 77, no. 6, e12643. doi: 10.1111/aji.12643.
73. Han J., Yang B.P., Li Y.L., Li H.M., Zheng X.H., Yu L.L., Zhang Q., Zheng Y.R., Yi P., Li L., Guo J.X., Zhou Y.G. RhoB/ROCK mediates oxygen-glucose deprivation-stimulated syncytiotrophoblast microparticle shedding in preeclampsia. *Cell Tissue Res.*, 2016, Vol. 366, no. 2, pp. 411-425.
74. He Y.D., Li Y.L., Chen Q. Expression of various subtypes of human leukocyte antigen-G in placenta of patients complicated with severe pre-eclampsia. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2012, Vol. 47, no. 1, pp. 29-32.
75. Hedlund M., Stenqvist A.C., Nagaeva O., Kjellberg L., Wulff M., Baranov V., Mincheva-Nilsson L. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 1, pp. 340-351.
76. Hoegh A.M., Tannetta D., Sargent I., Borup R., Nielsen F.C., Redman C., Sorensen S., Hviid T.V. Effect of syncytiotrophoblast microvillous membrane treatment on gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *BJOG*, 2006, Vol. 113, no. 11, pp. 1270-1279.

77. Holder B.S., Tower C.L., Forbes K., Mulla M.J., Aplin J.D., Abrahams V.M. Immune cell activation by trophoblast-derived microvesicles is mediated by syncytin 1. *Immunology*, 2012, Vol. 136, no. 2, pp. 184-191.
78. Holder B.S., Tower C.L., Jones C.J., Aplin J.D., Abrahams V.M. Heightened pro-inflammatory effect of preeclamptic placental microvesicles on peripheral blood immune cells in humans. *Biol. Reprod.*, 2012, Vol. 86, no. 4, p. 103.
79. Holland O.J., Linscheid C., Hodes H.C., Nauser T.L., Gilliam M., Stone P., Chamley L.W., Petroff M.G. Minor histocompatibility antigens are expressed in syncytiotrophoblast and trophoblast debris: implications for maternal alloreactivity to the fetus. *Am. J. Pathol.*, 2012, Vol. 180, no. 1, pp. 256-266.
80. Hube F., Reverdiau P., Iochmann S., Trassard S., Thibault G., Gruel Y. Demonstration of a tissue factor pathway inhibitor 2 messenger RNA synthesis by pure villous cytotrophoblast cells isolated from term human placentas. *Biol. Reprod.*, 2003, Vol. 68, no. 5, pp. 1888-1894.
81. Huppertz B., Kadyrov M., Kingdom J.C. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2006, Vol. 195, no. 1, pp. 29-39.
82. Huppertz B., Kingdom J., Caniggia I., Desoye G., Black S., Korr H., Kaufmann P. Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. *Placenta*, 2003, Vol. 24, no. 2-3, pp. 181-190.
83. Ikle F.A. Dissemination of syncytial trophoblastic cells in the maternal blood stream during pregnancy. *Bull. Schweiz Akad. Med. Wiss.*, 1964, Vol. 20, pp. 62-72.
84. Ishitani A., Sageshima N., Lee N., Dorofeeva N., Hatake K., Marquardt H., Geraghty D.E. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 3, pp. 1376-1384.
85. Jaameri K.E., Koivuniemi A.P., Carpen E.O. Occurrence of trophoblasts in the blood of toxemic patients. *Gynaecologia*, 1965, Vol. 160, no. 5, pp. 315-320.
86. Jauniaux E., Hempstock J., Greenwold N., Burton G.J. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am. J. Pathol.*, 2003, Vol. 162, no. 1, pp. 115-125.
87. Jia R., Li J., Rui C., Ji H., Ding H., Lu Y., De W., Sun L. Comparative proteomic profile of the human umbilical cord blood exosomes between normal and preeclampsia pregnancies with high-resolution mass spectrometry. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2015, Vol. 36, no. 6, pp. 2299-2306.
88. Johansen M., Redman C.W., Wilkins T., Sargent I.L. Trophoblast deportation in human pregnancy – its relevance for pre-eclampsia. *Placenta*, 1999, Vol. 20, no. 7, pp. 531-539.
89. Kalra H., Drummen G.P., Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 2, p. 170.
90. Knight M., Redman C.W., Linton E.A., Sargent I.L. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1998, Vol. 105, no. 6, pp. 632-640.
91. Kshirsagar S.K., Alam S.M., Jasti S., Hodes H., Nauser T., Gilliam M., Billstrand C., Hunt J.S., Petroff M.G. Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes. *Placenta*, 2012, Vol. 33, no. 12, pp. 982-990.
92. Lacroix R., Plawinski L., Robert S., Doeuve L., Sabatier F., Martinez de Lizarrondo S., Mezzapesa A., Anfoso F., Leroyer A.S., Poullin P., Jourde N., Njock M.S., Boulanger C.M., Angles-Cano E., Dignat-George F. Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica*, 2012, Vol. 97, no. 12, pp. 1864-1872.
93. Lavielle C., Cornelis G., Dupressoir A., Esnault C., Heidmann O., Vernochet C., Heidmann T. Paleovirology of 'syncytins', retroviral env genes exapted for a role in placentation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2013, Vol. 368, no. 1626, 20120507. doi: 10.1098/rstb.2012.0507.
94. Lee J.C., Lee K.M., Kim D.W., Heo D.S. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 12, pp. 7335-7340.
95. Lee X., Keith J.C., Jr., Stumm N., Moutsatsos I., McCoy J.M., Crum C.P., Genest D., Chin D., Ehrenfels C., Pijnenborg R., van Assche F.A., Mi S. Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia. *Placenta*, 2001, Vol. 22, no. 10, pp. 808-812.
96. le Fevre M.L., U.S. Preventive Services Task Force Low-dose aspirin use for the prevention of morbidity and mortality from preeclampsia: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann. Intern. Med.*, 2014, Vol. 161, no. 11, pp. 819-826.
97. Leung D.N., Smith S.C., To K.F., Sahota D.S., Baker P.N. Increased placental apoptosis in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2001, Vol. 184, no. 6, pp. 1249-1250.
98. Li H., Han L., Yang Z., Huang W., Zhang X., Gu Y., Li Y., Liu X., Zhou L., Hu J., Yu M., Yang J., Li Y., Zheng Y., Guo J., Han J., Li L. Differential proteomic analysis of syncytiotrophoblast extracellular vesicles from early-onset severe preeclampsia, using 8-plex iTRAQ labeling coupled with 2D nano LC-MS/MS. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2015, Vol. 36, no. 3, pp. 1116-1130.
99. Li L., Schust D.J. Isolation, purification and *in vitro* differentiation of cytotrophoblast cells from human term placenta. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2015, Vol. 13, p. 71.
100. Liang Y., Eng W.S., Colquhoun D.R., Dinglasan R.R., Graham D.R., Mahal L.K. Complex N-linked glycans serve as a determinant for exosome/microvesicle cargo recruitment. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, no. 47, pp. 32526-32537.

101. Linscheid C., Heitmann E., Singh P., Wickstrom E., Qiu L., Hodes H., Nauser T., Petroff M.G. Trophoblast expression of the minor histocompatibility antigen HA-1 is regulated by oxygen and is increased in placentas from preeclamptic women. *Placenta*, 2015, Vol. 36, no. 8, pp. 832-838.
102. Lisonkova S., Joseph K.S. Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early-versus late-onset disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2013, Vol. 209, no. 6, p. 544.
103. Lo Y.M., Leung T.N., Tein M.S., Sargent I.L., Zhang J., Lau T.K., Haines C.J., Redman C.W. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin. Chem.*, 1999, Vol. 45, no. 2, pp. 184-188.
104. Lok C.A., van der Post J.A., Sargent I.L., Hau C.M., Sturk A., Boer K., Nieuwland R. Changes in microparticle numbers and cellular origin during pregnancy and preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy*, 2008, Vol. 27, no. 4, pp. 344-360.
105. Lokossou A.G., Toudic C., Barbeau B. Implication of human endogenous retrovirus envelope proteins in placental functions. *Viruses*, 2014, Vol. 6, no. 11, pp. 4609-4627.
106. Lu J., Zhou W.H., Ren L., Zhang Y.Z. CXCR4, CXCR7, and CXCL12 are associated with trophoblastic cells apoptosis and linked to pathophysiology of severe preeclampsia. *Exp. Mol. Pathol.*, 2016, Vol. 100, no. 1, pp. 184-191.
107. Lyons J.J., Milner J.D., Rosenzweig S.D. Glycans instructing immunity: the emerging role of altered glycosylation in clinical immunology. *Front. Pediatr.*, 2015, Vol. 3, p. 54.
108. Macey M.G., Bevan S., Alam S., Verghese L., Agrawal S., Beski S., Thuraisingham R., MacCallum P.K. Platelet activation and endogenous thrombin potential in pre-eclampsia. *Thromb. Res.*, 2010, Vol. 125, no. 3, e76-e81. doi: 10.1016/j.thromres.2009.09.013.
109. Marques F.K., Campos F.M., Filho O.A., Carvalho A.T., Dusse L.M., Gomes K.B. Circulating microparticles in severe preeclampsia. *Clin. Chim. Acta*, 2012, Vol. 414, pp. 253-258.
110. Meekins J.W., Pijnenborg R., Hanssens M., McFadyen I.R., van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1994, Vol. 101, no. 8, pp. 669-674.
111. Meesmann H.M., Fehr E.M., Kierschke S., Herrmann M., Bilyy R., Heyder P., Blank N., Krienke S., Lorenz H.M., Schiller M. Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes. *J. Cell. Sci.*, 2010, Vol. 123, Pt 19, pp. 3347-3356.
112. Messerli M., May K., Hansson S.R., Schneider H., Holzgreve W., Hahn S., Rusterholz C. Feto-maternal interactions in pregnancies: placental microparticles activate peripheral blood monocytes. *Placenta*, 2010, Vol. 31, no. 2, pp. 106-112.
113. Mikhailova V.A., Ovchinnikova O.M., Zainulina M.S., Sokolov D.I., Selkov S.A. Detection of microparticles of leukocytic origin in the peripheral blood in normal pregnancy and preeclampsia. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2014, Vol. 157, no. 6, pp. 751-756.
114. Mincheva-Nilsson L., Baranov V. Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2014, Vol. 72, no. 5, pp. 440-457.
115. Mincheva-Nilsson L., Baranov V. The role of placental exosomes in reproduction. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 6, pp. 520-533.
116. Mincheva-Nilsson L., Nagaeva O., Chen T., Stendahl U., Antsiferova J., Mogren I., Hernestal J., Baranov V. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 6, pp. 3585-3592.
117. Mitchell M.D., Peiris H.N., Kobayashi M., Koh Y.Q., Duncombe G., Illanes S.E., Rice G.E., Salomon C. Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2015, Vol. 213, Suppl. 4, pp. S173-S181.
118. Motta-Mejia C., Kandzija N., Zhang W., Mhlomi V., Cerdeira A.S., Burdujan A., Tannetta D., Dragovic R., Sargent I.L., Redman C.W., Kishore U., Vatish M. Placental vesicles carry active endothelial nitric oxide synthase and their activity is reduced in preeclampsia. *Hypertension*, 2017, Vol. 70, no. 2, pp. 372-381.
119. Mouillet J.F., Ouyang Y., Coyne C.B., Sadovsky Y. MicroRNAs in placental health and disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2015, Vol. 213, Suppl. 4, pp. S163-S172.
120. Moulin V., Andris F., Thielemans K., Maliszewski C., Urbain J., Moser M. B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function *in vivo*: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 4, pp. 475-482.
121. Myatt L., Redman C.W., Staff A.C., Hansson S., Wilson M.L., Laivuori H., Poston L., Roberts J.M.; Global Pregnancy CoLaboratory. Strategy for standardization of preeclampsia research study design. *Hypertension*, 2014, Vol. 63, no. 6, pp. 1293-1301.
122. Nielsen C.T., Ostergaard O., Johnsen C., Jacobsen S., Heegaard N.H. Distinct features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 2011, Vol. 63, no. 10, pp. 3067-3077.
123. Orozco A.F., Jorgez C.J., Ramos-Perez W.D., Popek E.J., Yu X., Kozinetz C.A., Bischoff F.Z., Lewis D.E. Placental release of distinct DNA-associated micro-particles into maternal circulation: reflective of gestation time and preeclampsia. *Placenta*, 2009, Vol. 30, no. 10, pp. 891-897.

124. Ouyang Y., Bayer A., Chu T., Tyurin V.A., Kagan V.E., Morelli A.E., Coyne C.B., Sadovsky Y. Isolation of human trophoblastic extracellular vesicles and characterization of their cargo and antiviral activity. *Placenta*, 2016, Vol. 47, pp. 86-95.
125. Preston R.A., Jy W., Jimenez J.J., Mauro L.M., Horstman L.L., Valle M., Aime G., Ahn Y.S. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension*, 2003, Vol. 41, no. 2, pp. 211-217.
126. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell. Biol.*, 2013, Vol. 200, no. 4, pp. 373-383.
127. Reddy A., Zhong X.Y., Rusterholz C., Hahn S., Holzgreve W., Redman C.W., Sargent I.L. The effect of labour and placental separation on the shedding of syncytiotrophoblast microparticles, cell-free DNA and mRNA in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta*, 2008, Vol. 29, no. 11, pp. 942-949.
128. Redman C.W., Sargent I.L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, 2005, Vol. 308, no. 5728, pp. 1592-1594.
129. Redman C.W., Tannetta D.S., Dragovic R.A., Gardiner C., Southcombe J.H., Collett G.P., Sargent I.L. Review: Does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*, 2012, Vol. 33, pp. S48-S54.
130. Resic Karara J., Zekic Tomas S., Marusic J., Roje D., Kuzmic Prusac I. Fas and FasL expression in placentas complicated with intrauterine growth retardation with and without preeclampsia. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 2016, Vol. 29, no. 7, pp. 1154-1159.
131. Reverdiau P., Jarousseau A.C., Thibault G., Khalfoun B., Watier H., Lebranchu Y., Bardos P., Gruel Y. Tissue factor activity of syncytiotrophoblast plasma membranes and tumoral trophoblast cells in culture. *Thromb. Haemost.*, 1995, Vol. 73, no. 1, pp. 49-54.
132. Roberts J.M., August P.A., Bakris G., Barton J.R., Bernstein I.M., Gaiser R.R., Granger J.P., Jeyabalan A., Johnson D.D., Karumanchi S., Lindheimer M., Owens M.Y., Saade G.R., Sibai B.M., Spong C.Y., Tsigas E., Joseph G.F., O'Reilly N., Politzer A., Son S., Ngaiza K. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, 2013, Vol. 122, no. 5, pp. 1122-1131.
133. Roberts J.M., Escudero C. The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.*, 2012, Vol. 2, no. 2, pp. 72-83.
134. Roberts J.M., Lain K.Y. Recent insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta*, 2002, Vol. 23, no. 5, pp. 359-372.
135. Roberts J.M., Redman C.W. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet*, 1993, Vol. 341, no. 8858, pp. 1447-1451.
136. Sabapatha A., Gercel-Taylor C., Taylor D.D. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2006, Vol. 56, no. 5-6, pp. 345-355.
137. Sabatier F., Darmon P., Hugel B., Combes V., Sanmarco M., Velut J.G., Arnoux D., Charpiot P., Freyssinet J.M., Oliver C., Sampol J., Dignat-George F. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes*, 2002, Vol. 51, no. 9, pp. 2840-2845.
138. Sacks G.P., Studena K., Sargent K., Redman C.W. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998, Vol. 179, no. 1, pp. 80-86.
139. Salomon C., Guanzon D., Scholz-Romero K., Longo S., Correa P., Illanes S.E., Rice G.E. Placental exosomes as early biomarker of preeclampsia – potential role of exosomal microRNAs across gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2017, Vol. 102, no. 9, pp. 3182-3194.
140. Salomon C., Kobayashi M., Ashman K., Sobrevia L., Mitchell M.D., Rice G.E. Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 11, e79636. doi: 10.1371/journal.pone.0079636.
141. Salomon C., Rice G.E. Role of exosomes in placental homeostasis and pregnancy disorders. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2017, Vol. 145, pp. 163-179.
142. Salomon C., Ryan J., Sobrevia L., Kobayashi M., Ashman K., Mitchell M., Rice G.E. Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 7, e68451. doi: 10.1371/journal.pone.0068451.
143. Salomon C., Scholz-Romero K., Sarker S., Sweeney E., Kobayashi M., Correa P., Longo S., Duncombe G., Mitchell M.D., Rice G.E., Illanes S.E. Gestational diabetes mellitus is associated with changes in the concentration and bioactivity of placenta-derived exosomes in maternal circulation across gestation. *Diabetes*, 2016, Vol. 65, no. 3, pp. 598-609.
144. Salomon C., Torres M.J., Kobayashi M., Scholz-Romero K., Sobrevia L., Dobierzewska A., Illanes S.E., Mitchell M.D., Rice G.E. A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 6, e98667. doi: 10.1371/journal.pone.0098667.
145. Sargent I. Microvesicles and pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens.*, 2013, Vol. 3, no. 2, p. 58.
146. Schmidt M., Hoffmann B., Beelen D., Gellhaus A., Winterhager E., Kimmig R., Kasimir-Bauer S. Detection of circulating trophoblast particles in peripheral maternal blood in preeclampsia complicated pregnancies. *Hypertens. Pregnancy*, 2008, Vol. 27, no. 2, pp. 131-142.
147. Schmorl G. Pathologisch-anatomische untersuchungen über puerperal-eklampsie (pathological and anatomical examinations of puerperal-eclampsia). Leipzig: FCW Vogel, 1893. 106 p.

148. Schneider H. Characterization of extracellular vesicles in plasma of pregnant women using multicolor flow cytometry and nanoparticle tracking analysis. *Biol. Reprod.*, 2013, Vol. 89, no. 6, p. 152.
149. Schrocksnadel H., Daxenbichler G., Artner E., Steckel-Berger G., Dapunt O. Tumor markers in hypertensive disorders of pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 1993, Vol. 35, no. 4, pp. 204-208.
150. Shen F., Wei J., Snowise S., DeSousa J., Stone P., Viall C., Chen Q., Chamley L. Trophoblast debris extruded from preeclamptic placenta activates endothelial cells: a mechanism by which the placenta communicates with the maternal endothelium. *Placenta*, 2014, Vol. 35, no. 10, pp. 839-847.
151. Simak J., Gelderman M.P. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus. Med. Rev.*, 2006, Vol. 20, no. 1, pp. 1-26.
152. Smarason A.K., Sargent I.L., Starkey P.M., Redman C.W. The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and pre-eclamptic women on the growth of endothelial cells *in vitro*. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1993, Vol. 100, no. 10, pp. 943-949.
153. Smith N.C., Brush M.G., Luckett S. Preparation of human placental villous surface membrane. *Nature*, 1974, Vol. 252, no. 5481, pp. 302-303.
154. Sokolov D.I., Ovchinnikova O.M., Korenkov D.A., Viknyanschuk A.N., Benken K.A., Onokhin K.V., Selkov S.A. Influence of peripheral blood microparticles of pregnant women with preeclampsia on the phenotype of monocytes. *Transl. Res.*, 2016, Vol. 170, pp. 112-123.
155. Solier C., Aguerre-Girr M., Lenfant F., Campan A., Berrebi A., Rebmann V., Grosse-Wilde H., Le Bouteiller P. Secretion of pro-apoptotic intron 4-retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast. *Eur. J. Immunol.*, 2002, Vol. 32, no. 12, pp. 3576-3586.
156. Southcombe J., Tannetta D., Redman C., Sargent I. The immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 5, e20245. doi: 10.1371/journal.pone.0020245.
157. Stenqvist A.C., Nagaeva O., Baranov V., Mincheva-Nilsson L. Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 11, pp. 5515-5523.
158. Stepanian A., Bourguignat L., Hennou S., Coupaye M., Hajage D., Salomon L., Alessi M.C., Msika S., de Prost D. Microparticle increase in severe obesity: not related to metabolic syndrome and unchanged after massive weight loss. *Obesity (Silver Spring)*, 2013, Vol. 21, no. 11, pp. 2236-2243.
159. Sukhikh G.T., Ziganshina M.M., Nizyaeva N.V., Kulikova G.V., Volkova J.S., Yarotskaya E.L., Kan N.E., Shchyogolev A.I., Tyutyunnik V.L. Differences of glycocalyx composition in the structural elements of placenta in preeclampsia. *Placenta*, 2016, Vol. 43, pp. 69-76.
160. Tang Y., Liu H., Li H., Peng T., Gu W., Li X. Hypermethylation of the HLA-G promoter is associated with preeclampsia. *Mol. Hum. Reprod.*, 2015, Vol. 21, no. 9, pp. 736-744.
161. Tannetta D., Collett G., Vatish M., Redman C., Sargent I. Syncytiotrophoblast extracellular vesicles – circulating biopsies reflecting placental health. *Placenta*, 2017, Vol. 52, pp. 134-138.
162. Tannetta D., Dragovic R., Alyahyaei Z., Southcombe J. Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.*, 2014, Vol. 11, no. 6, pp. 548-563.
163. Tannetta D., Mackeen M., Kessler B., Sargent I., Redman C. Multi-dimensional protein identification technology analysis of syncytiotrophoblast vesicles released from perfused preeclampsia placentas. *Pregnancy Hypertens.*, 2012, Vol. 2, no. 3, pp. 201-202.
164. Tannetta D., Masliukaite I., Vatish M., Redman C., Sargent I. Update of syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 119, pp. 98-106.
165. Tannetta D., Sargent I. Placental disease and the maternal syndrome of preeclampsia: missing links? *Curr. Hypertens. Rep.*, 2013, Vol. 15, no. 6, pp. 590-599.
166. Tannetta D.S., Dragovic R.A., Gardiner C., Redman C.W., Sargent I.L. Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 2, e56754. doi: 10.1371/journal.pone.0056754.
167. Tannetta D.S., Hunt K., Jones C.I., Davidson N., Coxon C.H., Ferguson D., Redman C.W., Gibbins J.M., Sargent I.L., Tucker K.L. Syncytiotrophoblast extracellular vesicles from pre-eclampsia placentas differentially affect platelet function. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 11, e0142538. doi: 10.1371/journal.pone.0142538.
168. Teng Y., Jiang R., Lin Q., Ding C., Ye Z. The relationship between plasma and placental tissue factor, and tissue factor pathway inhibitors in severe pre-eclampsia patients. *Thromb. Res.*, 2010, Vol. 126, no. 1, e41-e45. doi: 10.1016/j.thromres.2010.02.012.
169. Thibault G., Degenne D., Girard A.C., Guillaumin J.M., Lacord M., Bardos P. The inhibitory effect of human syncytiotrophoblast plasma membrane vesicles on *in vitro* lymphocyte proliferation is associated with reduced interleukin 2 receptor expression. *Cell. Immunol.*, 1991, Vol. 138, no. 1, pp. 165-174.
170. Tolosa J.M., Schjenken J.E., Clifton V.L., Vargas A., Barbeau B., Lowry P., Maiti K., Smith R. The endogenous retroviral envelope protein syncytin-1 inhibits LPS/PHA-stimulated cytokine responses in human blood and is sorted into placental exosomes. *Placenta*, 2012, Vol. 33, no. 11, pp. 933-941.
171. Tomas S.Z., Prusac I.K., Roje D., Tadin I. Trophoblast apoptosis in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 2011, Vol. 71, no. 4, pp. 250-255.
172. Tong M., Chamley L.W. Placental extracellular vesicles and feto-maternal communication. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2015, Vol. 5, no. 3, a023028. doi: 10.1101/cshperspect.a023028.

173. Tramontano A.F., Lyubarova R., Tsiakos J., Palaia T., Deleon J.R., Ragolia L. Circulating endothelial microparticles in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.*, 2010, Vol. 2010, 250476. doi: 10.1155/2010/250476.
174. Vanwijk M.J., Svedas E., Boer K., Nieuwland R., Vanbavel E., Kublickiene K.R. Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2002, Vol. 187, no. 6, pp. 1686-1693.
175. Vargas A., Zhou S., Ethier-Chiasson M., Flipo D., Lafond J., Gilbert C., Barbeau B. Syncytin proteins incorporated in placenta exosomes are important for cell uptake and show variation in abundance in serum exosomes from patients with preeclampsia. *FASEB J.*, 2014, Vol. 28, no. 8, pp. 3703-3719.
176. von Dadelszen P., Hurst G., Redman C.W. Supernatants from co-cultured endothelial cells and syncytiotrophoblast microvillous membranes activate peripheral blood leukocytes *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 1999, Vol. 14, no. 4, pp. 919-924.
177. Wei J., Lau S.Y., Blenkiron C., Chen Q., James J.L., Kleffmann T., Wise M., Stone P.R., Chamley L.W. Trophoblastic debris modifies endothelial cell transcriptome *in vitro*: a mechanism by which fetal cells might control maternal responses to pregnancy. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 30632. doi: 10.1038/srep30632.
178. Yanez-Mo M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borrás F.E., Buzas E.I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., Colas E., Cordeiro-da Silva A., Fais S., Falcon-Perez J.M., Ghobrial I.M., Giebel B., Gimona M., Graner M., Gursel I., Gursel M., Heegaard N.H., Hendrix A., Kierulff P., Kokubun K., Kosanovic M., Kralj-Iglic V., Kramer-Albers E.M., Laitinen S., Lasser C., Lener T., Ligeti E., Line A., Lipps G., Llorente A., Lotvall J., Mancek-Keber M., Marcilla A., Mittelbrunn M., Nazarenko I., Nolte-'t Hoen E.N., Nyman T.A., O'Driscoll L., Olivan M., Oliveira C., Pallinger E., Del Portillo H.A., Reventos J., Rigau M., Rohde E., Sammar M., Sanchez-Madrid F., Santarem N., Schallmoser K., Ostendorf M.S., Stoorvogel W., Stukelj R., van der Grein S.G., Vasconcelos M.H., Wauben M.H., De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles*, 2015, Vol. 4, 27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066.
179. Zhang X., McGeoch S.C., Johnstone A.M., Holtrop G., Sneddon A.A., MacRury S.M., Megson I.L., Pearson D.W., Abraham P., De Roos B., Lobley G.E., O'Kennedy N. Platelet-derived microparticle count and surface molecule expression differ between subjects with and without type 2 diabetes, independently of obesity status. *J. Thromb. Thrombolysis*, 2014, Vol. 37, no. 4, pp. 455-463.
180. Zhou Y., Damsky C.H., Chiu K., Roberts J.M., Fisher S.J. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J. Clin. Invest.*, 1993, Vol. 91, no. 3, pp. 950-960.
181. Zhou Y., Damsky C.H., Fisher S.J. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J. Clin. Invest.*, 1997, Vol. 99, no. 9, pp. 2152-2164.
182. Ziganshina M.M., Pavlovich S.V., Bovin N.V., Sukhikh G.T. Hyaluronic acid in vascular and immune homeostasis during normal pregnancy and preeclampsia. *Acta Naturae*, 2016, Vol. 8, no. 3, pp. 59-71.

Авторы:

Керкешко Г.О. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Корневский А.В. — д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Соколов Д.И. — д.б.н., доцент, заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kerkeshko G.O., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Korenevsky A.V., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology and Cell Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 05.07.2017

Отправлена на доработку 22.10.2017

Принята к печати 28.11.2017

Received 05.07.2017

Revision received 22.10.2017

Accepted 28.11.2017

РОЛЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Киселевский М.В.¹, Анисимова Н.Ю.^{1,2}, Должикова Ю.И.²,
Власенко Р.Я.¹, Сенатов Ф.С.², Караулов А.В.³

¹ ФГБНУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² Национальный технический университет «МИСиС», Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Способность мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (МСК) дифференцироваться в несколько видов мезенхимальных тканей делает эти клетки основными кандидатами для создания тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины. МСК способствуют интеграции биоимплантата с нативной костью и стимулируют процесс остеогенеза, но также обладают иммуномодулирующими свойствами, контролируя воспалительные реакции и модифицируя иммунные клетки. МСК влияют не только на иммунный ответ организма, препятствуя реакции иммунологического отторжения имплантированных тканеинженерных конструкций, но могут также оказывать воздействие на иммунные реакции костной ткани. МСК играют важную роль в регенерации кости, регулируя образование остеобластов и подавляя активность эффекторов воспаления и остеокластогенез. Доклинические и первые клинические испытания биоимплантатов кости, заселенных МСК, свидетельствуют о перспективности данной стратегии получения тканеинженерных конструкций для регенерации костей.

Ключевые слова: мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, иммуномодулирующая активность, биоимплантаты костей, остеоиммунология, тканеинженерные конструкции

ROLE OF MESENCHYMAL MULTIPOTENT STROMAL CELLS IN REMODELING OF BONE DEFECTS

Kiselevsky M.V.^a, Anisimova N.Yu.^{a,b}, Dolzhikova Yu.I.^b,
Vlasenko R.Ya.^a, Senatov F.S.^b, Karaulov A.V.^c

^a N.N. Blokhin National Medical Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

^b National University of Science and Technology MISiS, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Ability of mesenchymal multipotent stromal cells (MSCs) to differentiate into several types of mesenchymal tissues allows to consider these cells the main candidates for creating tissue engineering

Адрес для переписки:

Киселевский Михаил Валентинович
ФГБНУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ
115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.
Тел./факс: 8 (499) 324-27-94.
E-mail: kisele@inbox.ru

Address for correspondence:

Kiselevsky Mikhail V.
N.N. Blokhin National Medical Center of Oncology
115478, Russian Federation, Moscow, Kashirskoe highway, 24.
Phone/Fax: 7 (499) 324-27-94.
E-mail: kisele@inbox.ru

Образец цитирования:

М.В. Киселевский, Н.Ю. Анисимова, Ю.И. Должикова, Р.Я. Власенко, Ф.С. Сенатов, А.В. Караулов «Роль мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток в ремоделировании костной ткани» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 515-522.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-515-522

© Киселевский М.В. и соавт., 2018

For citation:

M.V. Kiselevsky, N.Yu. Anisimova, Yu.I. Dolzhikova, R.Ya. Vlasenko, F.S. Senatov, A.V. Karaulov "Role of mesenchymal multipotent stromal cells in remodeling of bone defects", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 515-522.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-515-522

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-515-522

constructions for regenerative medicine. MSCs promote integration of bio-implants into the native bone and stimulate osteogenesis. MSCs are characterized by immunomodulatory properties, due to inflammation control and modification of immune cells. MSCs affect not only the *in vivo* immune response by preventing immunological rejection of implanted tissue engineering designs, but it can also influence the bone tissue immunity. MSCs play an important role in bone regeneration, by regulating the osteoblastic generation, and suppressing activity of inflammation effectors and osteoclastogenesis. Some pre-clinical and first clinical trials of bone bio-implants colonized with MSC, demonstrate promising outlooks for this strategy in order to obtain tissue engineering constructions for bone regeneration.

Keywords: mesenchymal multipotent stromal cells, immunomodulating activity, bone bioimplants, osteoimmunology, tissue engineering constructions

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России, уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI57817X0235.

Введение

Кость является одной из наиболее часто подвергающихся трансплантации тканей и уступает первенство лишь компонентам крови. «Золотым стандартом» до сих пор считается пересадка аутологичной кости, однако этот метод имеет существенные ограничения, связанные с возможным объемом резецируемой для замещения кости, и сопряжен с дополнительным хирургическим вмешательством. Альтернативой этому подходу является использование аллогенной кости, но в этом случае существует риск иммунологического отторжения донорской кости и возможность инфицирования реципиента. Перспективным направлением для замещения расширенных костных дефектов является создание биоимплантатов на основе синтетических биосовместимых материалов, импрегнированных ростовыми факторами, стимулирующими ремоделирование кости, или заселенных стволовыми (мультипотентными) клетками. Чаще всего для заселения используют мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки (МСК) [1, 43, 58, 60]. Низкий уровень экспрессии МНС класса II и костимулирующих молекул CD80 и CD86 позволяет использовать для заселения биоимплантатов не только аутологичные, но и аллогенные МСК. Способность МСК дифференцироваться в несколько видов мезенхимальных тканей и продукция ими ростовых факторов делает эти клетки основными кандидатами при создании тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины [6, 8, 53]. Источником МСК могут служить различные ткани, однако чаще всего в этом качестве используют жировую ткань и костный мозг.

Иммуномодулирующие свойства МСК и ремоделирование кости

МСК не только способствуют интеграции биоимплантата с нативной костью и стимулируют

процесс остеогенеза, но также обладают иммуномодулирующими свойствами, контролируя воспалительные ответы и модифицируя реакции иммунных клеток [42].

В физиологических условиях повышение уровней ростовых факторов и цитокинов приводит к миграции МСК к месту повреждения и образованию новой кости за счет остеогенной дифференцировки. С другой стороны, МСК участвуют в регуляции иммунологических реакций, сопряженных с процессами ремоделирования костной ткани, и вызывают ингибирование пролиферации и продукции цитокинов антигенпрезентирующими клетками и Т-лимфоцитами [37]. Недифференцированные МСК секретируют простагландин E2 (PGE2) и оксид азота (NO), индуцируя, таким образом, иммунодепрессивные эффекты, что рассматривается как вероятный механизм предупреждения отторжения биоимплантата [40]. Способность дифференцировки МСК человека в остеобластный фенотип в сочетании с биоактивными матриксами может быть использована для замещения поврежденных костей пациента вследствие травм, остеопороза, врожденных патологий развития костей и злокачественных новообразований [27]. Заселение синтетических матриксов аллогенными МСК обеспечивает основу для формирования неокости, в то время как иммуномодулирующие свойства МСК позволяют подавлять разрушительные воздействия иммунного ответа хозяина на имплантат [36]. К настоящему времени накопились многочисленные данные о влиянии аллогенных дифференцированных МСК на иммунную систему хозяина. Однако отсутствие стандартизированных доклинических испытаний требует дальнейших исследований для оценки влияния МСК на иммунный ответ реципиента и формирование костной ткани, чтобы оценить целесообразность и безопасность использования этих клеток при восстановлении дефектов костей [31].

МСК обладают мощными иммуномодулирующими свойствами, как правило, негативно влияющими на пролиферацию и дифференцировку различных иммунных клеток [38]. Механизмы иммуномодуляции МСК еще до конца не выяс-

нены, однако установлено, что они реализуются клеточно-зависимыми механизмами и растворимыми факторами [56]. Целый ряд медиаторов опосредует иммунодепрессивный эффект МСК, включая трансформирующий фактор роста- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), простагландин E2 (PGE2), фактор роста гепатоцитов (HGF), индоламин-пиррол-2,3-диоксигеназу (IDO), оксид азота (NO) и интерлейкин-10 (IL-10), продукция которых индуцируется провоспалительными цитокинами IFN γ , TNF α , IL-1, IL-1 β . Межклеточные контакты также являются ключевым фактором, влияющим на иммуномодулирующие эффекты МСК. Посредством контакт-зависимых механизмов МСК контролируют активированные Т-клетки, снижая выживаемость и пролиферацию Т-клеток, а также увеличивают образование Т-регуляторных лимфоцитов. В осуществлении межклеточных контактов участвуют такие адгезионные молекулы МСК, как CD274 (PDL 1) и galectin-1, которые индуцируются IFN γ и осуществляют иммуномодулирующее действие МСК [47]. МСК регулируют как адаптивный, так и врожденный иммунитет — посредством угнетения активации и пролиферации Т- и В-лимфоцитов, подавления созревания дендритных клеток, ингибирования пролиферации и цитотоксичности NK-клеток, а также способствуя образованию регуляторных Т-клеток [59]. МСК также препятствуют образованию плазматических клеток и индуцируют IL-10⁺ и CD19⁺CD38^{high}CD24^{high} В-клетки, которые рассматриваются как регуляторные В-клетки (Vreg). Однако характер иммуномодулирующего действия МСК в значительной степени зависит от микроокружения, и воспалительная среда может влиять на иммуномодулирующий эффект МСК. В условиях иммунологического покоя МСК способствуют выживанию В-клеток и образованию Vreg, которые участвуют реализации иммунологического гомеостаза. В условиях воспаления и при добавлении IFN γ МСК подавляют активность В-клеток, ингибируя пролиферацию В-клеток и уменьшая продукцию антител. В то же время они при определенных условиях могут ингибировать образование Vreg. *In vivo* резидентные МСК индуцируют толерогенные В-клетки в условиях иммунологического покоя, а при воспалительных состояниях МСК подавляют гуморальные реакции [22].

МСК оказывают супрессивное действие на NK клетки, при этом опухолеассоциированные МСК более эффективно ингибируют активность NK, в основном за счет угнетения продукции IFN γ субпопуляцией CD56^{bright} [21]. Следовательно, при стимуляции регенеративных процессов МСК снижают вероятность отторжения имплантата за счет угнетения клеточного

и гуморального иммунитета, а также благодаря ингибированию воспалительных реакций, что повышает их ценность для трансплантации клеточно- и тканеинженерных конструкций.

Противомикробная активность МСК

МСК обладают противомикробными свойствами, эти эффекты являются как прямыми, так и опосредованными. МСК выделяют антимикробные пептиды, включая кателицидины, липокалин-2 и бета-дефенсины [32].

Установлено, что МСК несут Toll-подобные рецепторы (TLR), посредством которых происходит модификация их дифференцировки и иммунорегуляторных свойств. Бактериальные продукты могут усиливать продукцию МСК бактериостатических соединений, таких как катехилизин LL-37. Агонисты TLR3 стимулируют продукцию МСК цитокинов, участвующих в регуляции воспалительного ответа: IFN α/β , IL-6 и IL-8. Было обнаружено, что активация МСК TLR3-лигандами вызывала высвобождение факторов, повышающих выживаемость нейтрофилов. Кроме того, было показано, что агонисты TLR3 стимулируют большее высвобождение хемокинов нейтрофилами, чем другие агонисты TLR и стимулируют миграционные свойства МСК.

При инфекции МСК также взаимодействуют с эффекторами врожденного иммунитета, включая нейтрофилы и моноциты, усиливая их антибактериальную активность, а также рекрутируют моноциты в область инфекции и направляют дифференцировку макрофагов в фенотип M2, который ассоциируется с ускоренным заживлением ран [29, 33, 39]. На моделях сепсиса показано усиление фагоцитарной и киллерной активности моноцитов и нейтрофилов после воздействия факторов, секретируемых активированными МСК [2, 7].

Установлено также, что МСК действуют синергично с антибиотиками и повышают выживаемость мышей с модельным сепсисом, снижают выраженность воспалительной реакции за счет рекрутирования иммунных клеток, а также стимулируют репаративные процессы посредством активации ангиогенеза и популяции резидентных стволовых клеток. Различные взаимодополняющие механизмы действия объясняют способность активированных МСК контролировать течение инфекции [9, 49].

NK способны элиминировать инфицированные вирусом, стрессированные и опухолевые клетки. Они также являются важным источником IFN γ , который стимулирует провоспалительные Th1-ответы. С другой стороны, NK-клетки также могут выполнять регуляторные функции, в том числе стимулировать неангиогенез [4]. МСК

могут способствовать регенеративной функции НК. НК-клетки с ангиогенными свойствами могут индуцироваться из периферических НК-клеток при комбинации гипоксии, TGF- β и деметилирующих агентов [10]. Опосредованный НК-ангиогенез регулируется МСК в периферических тканях и способствует индукции репаративных процессов после воспаления [45].

Способность МСК контролировать течение инфекции определяется множественными взаимодействующими механизмами, в том числе усилением антимикробной активности эффекторов врожденного иммунитета и стимуляцией репаративных процессов, что может иметь важное значение при замещении дефектов костей биоимплантатами.

МСК и иммунные реакции кости

МСК влияют не только на иммунный ответ организма, препятствуя реакции иммунологического отторжения имплантированных тканеинженерных конструкций, но могут также оказывать воздействие на иммунные реакции самой костной ткани. В последние годы сформировалось новое направление в иммунологии, описывающее перекрестное регулирование иммунной и костной систем, получившее название «остеоиммунология». Были установлены взаимные влияния сигнальных молекул костной ткани и костного мозга, обусловленные пространственной близостью этих тканей. Так, была показана важная роль остеобластов в создании ниш для гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге [48]. С другой стороны, макрофаги стимулируют остеобластогенез посредством секреции IL-18, а Т-клетки способны влиять на остеокластогенез, продуцируя IL-1, IL-6, IFN γ или IL-4 [12, 14]. К остеоиммунологическим механизмам относится и опосредованное остеокластами разрушение костной ткани, наблюдаемое при физиологических и патологических состояниях [5].

Для образования и слияния многоядерных клеток, экспрессирующих маркеры, специфичные для остеокластов, необходимы цитокины, такие как мембранный белок RANKL, принадлежащий к семейству TNF, и макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF). RANKL является ключевым фактором дифференцировки и активации остеокластов, а также играет важную роль в регуляции иммунной системы. Этот белок экспрессируется на Т-хелперах и вовлечен в созревание дендритных клеток. Активация Т-лимфоцитов приводит к индукции экспрессии этого цитокина, повышению остеокластогенеза и резорбции костной ткани [34, 41].

Износ костных имплантатов, сопровождающийся высвобождением микрочастиц биоматериала в окружающие ткани, является одной из основных причин асептического воспаления — так называемого перипротезного остеоли-

за. В реализации этого явления ключевую роль играют макрофаги, опосредующие хроническую воспалительную реакцию в ответ на продукты износа биоматериалов секрецией хемокинов и провоспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, способствуют рекрутированию макрофагов и остеокластогенезу в области имплантации [44, 55].

В то время как активированные макрофаги и остеокласты играют ключевую роль в перипротезном остеолизе, баланс «костного оборота» определяется не только резорбцией кости, но и ее образованием. В физиологических условиях остеокласт-опосредованная резорбция кости тесно связана с образованием новой кости остеобластами [46]. При остеолизе, вызванном реакцией на имплантат, активные остеобласты и их предшественники значительно снижаются, что способствует уменьшению костной массы. Поэтому современные стратегии лечения асептического остеолиза предполагают использование костноформирующих клеток, таких как МСК. Кроме того, МСК могут индуцировать поляризацию и пролиферацию макрофагов регуляторного фенотипа посредством продукции IL-10, снижения уровней секреции TNF и IL-12. Имеются данные о том, что внутривенное введение МСК приводит к увеличению уровня моноцитов/макрофагов регуляторного типа в кровотоке и повышению содержания регуляторных макрофагов в воспаленной ткани. Введенные локально, МСК привлекают макрофаги и способствуют их поляризации в регуляторный фенотип [16]. Более того, фагоцитоз фрагментов погибших МСК макрофагами стимулирует их регенеративную и иммуномодулирующую функцию [38]. Влияние МСК на функцию макрофагов и остеокластов имеет важное значение для оценки целесообразности использования этих клеток-предшественников при создании биоимплантатов костей [18].

Остеобласты являются частью линии костнообразующих клеток, которые включают МСК, предостеобласты, остеобласты и остециты. МСК находятся в строме костного мозга, надкостнице и стенках местной микроциркуляции и дифференцируются в костноформирующие остеобласты, проходя определенные стадии. Последовательность дифференцировки МСК в остеобласты не до конца изучена, но характеризуется кратковременной экспрессией транскрипционных факторов SOX9, RUNX2 и Osterix. Сигналы, которые инициируют дифференцировку МСК-остеобластов, также не достаточно хорошо охарактеризованы, но известно, что включают растворимые медиаторы семейства фактора роста фибробластов [35].

Активность МСК может быть усилена воспалительными стимулами, которые сопоставимы с начальным воспалительным статусом при

переломе костей, являющимся оптимальным для формирования костной ткани. Транзиторное воздействие TNF α , ЛПС или других лигандов TLR увеличивает остеогенез и зависит от дозы, времени и периода воздействия стимулов [13]. Однако, воздействие хронической воспалительной среды вызывает активацию остеокластов и нарушение остеогенеза МСК и изменяет баланс ремоделирования кости в сторону остеолитического процесса [54].

Заключение

Современное развитие биотехнологии не позволяет создавать сложные органы *de novo* [52] и в значительной степени ограничивается стимуляцией врожденных способностей регенерации организма, которые могут быть дополнены заменой отдельных участков ткани и индукцией регенеративного каскада [19]. Существующая стратегия тканевой инженерии обычно заключается в экспансии *in vivo* популяций мультипотентных клеток, таких как МСК, с последующей их трансплантацией в виде клеточной суспензии или заселенных МСК скаффолдов в поврежденные области [23]. Благодаря уникальному регенеративному потенциалу и иммуномодулирующим свойствам МСК обладают большими перспективами в тканевой инженерии и реконструктивной терапии не только за счет непосредственного участия в регенерации тканей, но и вследствие модулирующего влияния на иммуногенез реципиента в ответ на внедрение чужеродного тела (имплантата) [28].

Кость является динамической тканью, которая отличается способностью к восстановлению после травмы без рубцевания [57]. Дифференцировка МСК в остеобласты при этом играет решающую роль в регенерации и ремоделировании костей. Полученные из костного мозга МСК считаются адекватным источником для тканевой инженерии костей из-за их способности к остеогенной дифференцировке [36]. МСК могут быть выделены также из пуповинной крови, плаценты, жировой ткани и т.п. Эффективность остеогенной дифференцировки различных МСК человека была продемонстрирована при заселении ими биосовместимых полимерных матриц. При этом было обнаружено, что МСК, полученные из костного мозга, продемонстрировали боль-

шую эффективность дифференцировки в остеобласты, чем остальные виды МСК [56]. Эти клетки обычно трансплантируются в трехмерные пористые скаффолды, обеспечивающие необходимую внеклеточную среду, которая содержит физические и химические сигналы для развития и регенерации ткани [15]. Несмотря на то что в течение ряда лет разрабатывались стратегии, основанные на различных типах биоматериалов и стволовых клеток, современная тканевая инженерия не нашла широкого применения в клинических условиях [20, 26]. Для достижения этой цели потребуется глубокое понимание нормальных физиологических процессов развития тканей и механизмов, лежащих в основе взаимодействия между МСК и биоматериалами во время тканеобразования, поскольку многие важные детали остаются неясными [17]. Биоматериалы играют решающую роль при создании тканеинженерных конструкций [25]. Материал должен иметь возможность сохранять свою структуру и целостность в течение предсказуемых периодов времени для обеспечения нового формирования и созревания тканей даже в условиях нагрузки [24, 50].

Таким образом, МСК играют важную роль в регенерации кости, как путем регулирования образования остеокластов, так и негативного влияния на эффекторы воспаления и остеокластогенез [11]. МСК обладают способностью регенерировать мезенхимальные ткани, регулировать метаболизм костей и модулировать воспаление, что делает их привлекательными кандидатами для клеточных технологий в регенеративной медицине. Современные стратегии создания тканеинженерных конструкций активно используют МСК для улучшения интеграции имплантатов и предотвращения иммунологического отторжения. В доклинических исследованиях показано, что заселение биосовместимых материалов МСК значительно повышает остеокондуктивность и улучшает интеграцию имплантатов [30, 38]. Первые клинические испытания скаффолдов, заселенных МСК, подтверждают их эффективность [20]. Это свидетельствует о перспективности использования тканеинженерных конструкций, полученных на основе биосовместимых скаффолдов, заселенных МСК для регенерации костей.

Список литературы / References

1. Киселевский М.В., Анисимова Н.Ю., Корнюшенков Е.А., Шепелев А.Д., Чвалун С.Н., Полоцкий Б.Е., Давыдов М.И. Биосовместимые синтетические матрицы трахеи на основе полимерных ультраволокнистых материалов, колонизированные мезенхимальными мультипотентными клетками // Современные технологии в медицине, 2016. Т. 8, № 1. С. 7-13. [Kiselevsky M.V., Anisimova N.Yu., Kornushenkov E.A., Shepelev A.D., Chvalun S.N., Polotsky B.E., Davydov M.I. Biocompatible synthetic tracheal matrices based on polymer. *Sovremennye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2016, Vol. 8, no. 1, pp. 7-13. (In Russ.)]

2. Климович В.Б. Иммуномодулирующая активность мезенхимальных стромальных (стволовых) клеток // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 2. С. 107-126. [Klimovich V.B. Immunomodulatory activity of mesenchymal stromal (stem) cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 2, pp. 107-126. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-2-107-12.
3. Alcayaga-Miranda F., Cuenca J., Martin A., Contreras L., Figueroa F.E., Khour M. Combination therapy of menstrual derived mesenchymal stem cells and antibiotics ameliorates survival in sepsis. *Stem Cell Res. Ther.*, 2015, Vol. 6, no. 6, p. 199.
4. Arck P.C., Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat. Med.*, 2013, Vol. 19, no. 5, pp. 548-556.
5. Aubin J. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev. Endocrinol. Metab. Disord.*, 2001, Vol. 2, no. 1, pp. 81-94.
6. Bianco P., Cao X., Frenette P.S., Mao J.J., Robey P.G., Simmons P.J., Wang C.Y. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat. Med.*, 2013, Vol. 19, no. 1, pp. 35-42.
7. Brandau S., Jakob M., Bruderek K., Bootz F., Giebel B., Radtke S., Mauel K., Jäger M., Flohé S.B., Lang S. Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, e106903. doi: 10.1371/journal.pone.0106903.
8. Bunpetch V., Wu H., Zhang S., Ouyang H.W. From "bench to bedside": current advancement on large-scale production of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*, 2017, Vol. 26, no. 9, pp. 1662-1673.
9. Carty F., Mahon B.P., English K. The influence of macrophages on mesenchymal stromal cell therapy: Passive or aggressive agents? *Clin. Exp. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 1, pp. 1-11.
10. Cerdeira A.S., Rajakumar A., Royle C.M., Lo A., Husain Z., Thadhani R.I., Sukhatme V.P., Karumanchi S.A., Kopcow H.D. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 8, pp. 3939-3948.
11. Chena F.-M., Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog. Polym. Sci.*, 2016. Vol. 53, no. 1, pp. 86-168.
12. Cheng J., Liu J., Shi Z., Jules J., Xu D., Luo S., Wei S., Feng X. Molecular mechanisms of the biphasic effects of interferon- γ on osteoclastogenesis. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2012, Vol. 32, no. 1, pp. 34-45.
13. Croes M., Oner F.C., Kruyt M.C., Blokhuis T.J., Bastian O., Dhert W.J., Alblas J. Proinflammatory mediators enhance the osteogenesis of human mesenchymal stem cells after lineage commitment. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 7, e0132781. doi: 10.1371/journal.pone.0132781.
14. Cornish J., Gillespi M.T., Callon K.E., Horwood N.J., Moseley J.M., Reid I.R. Interleukin-18 is a novel mitogen of osteogenic and chondrogenic cells. *Endocrinology*, 2005, Vol. 144, no. 4, pp. 1194-1201.
15. Dawson J.I., Oreffo R.O. Bridging the regeneration gap: stem cells, biomaterials and clinical translation in bone tissue engineering. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, Vol. 473, no. 2, pp. 124-131.
16. Dayan V., Yannarelli G., Billia F., Filomeno P., Wang X.H., Davies J.E., Keating A. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.*, 2011, Vol. 106, no. 6, pp. 1299-1310.
17. Discher D.E., Mooney D.J., Zandstra P.W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, 2009, Vol. 324, no. 5935, pp. 1673-1677.
18. Eggenhofer E., Hoogduijn M.J. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant. Res.*, 2012, Vol. 1, no. 1, pp. 1-12.
19. Feinberg A.W. Engineered tissue grafts: opportunities and challenges in regenerative medicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, 2012, Vol. 4, no. 2, pp. 207-220.
20. Fisher M.B., Mauck R.L. Tissue engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2013, Vol. 19, no. 1, pp. 1-13.
21. Galland S., Vuille J., Martin P., Letovanec I. Tumor-derived mesenchymal stem cells use distinct mechanisms to block the activity of natural killer cell subsets. *Cell Rep.*, 2017, Vol. 20, no. 12, pp. 2891-2905.
22. Gao F., Chiu S.M., Motan D.A., Zhang Z., Chen L., Ji H.L., Zhang Z., Chen L., Ji H.L., Tse H.F., Fu Q.L., Lian Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis.*, 2016, Vol. 21, no. 7, e2062. doi: 10.1038/cddis.2015.327.
23. Griffith L.G., Naughton G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science*, 2002, Vol. 295, no. 5556, pp. 1009-1014.
24. Guarino V., Causa F., Ambrosio L. Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue. *Expert. Rev. Med. Devices*, 2007, Vol. 4, no. 3, pp. 405-418.
25. Haker J.S., Giammara B.L. Biomaterials and biomedical devices. *Science*, 1988, Vol. 242, no. 4880, pp. 885-892.
26. Hanson S., D'Souza R.N., Hematti P. Biomaterial-mesenchymal stem cell constructs for immunomodulation in composite tissue engineering. *Tissue Eng. Part A*, 2014, Vol. 20, no. 15-16, pp. 2162-2168.
27. Hardy J.G., Villancio-Wolter M.K., Sukhavasi R.C., Mouser D.J., Aguilar D. Jr, Geissler S.A., Kaplan D.L., Schmidt C.E. Electrical stimulation of human mesenchymal stem cells on conductive nanofibers enhances their differentiation toward osteogenic outcomes. *Macromolecular Rapid Communications*, 2015, Vol. 36, no. 1, pp. 1884-1890.

28. Harrison R.H., St-Pierre J.P., Stevens M.M. Tissue engineering and regenerative medicine: a year in review. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2014, Vol. 20, no. 1, pp. 1-16.
29. Liu D., Yi C., Fong C.C., Jin Q., Wang Z., Yu W.K., Sun D., Zhao J., Yang M. Activation of multiple signaling pathways during the differentiation of mesenchymal stem cells cultured in a silicon nanowire microenvironment. *Nanomed.*, 2014, Vol. 10, no. 6, pp. 1153-1163.
30. Johnson V., Webb T., Norman A., Coy J., Kurihara J., Regan D., Dow S. Activated mesenchymal stem cells interact with antibiotics and host innate immune responses to control chronic bacterial infections. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, p. 9575.
31. Katagiri W., Osugi M., Kawai T., Hibi H. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. *Head Face Med.*, 2016, Vol. 12, no. 5, pp. 1-10.
32. Kiernan C.H., Wolvius E.B., Brama P.A.J., Farrell E. The immune response to allogeneic differentiated mesenchymal stem cells in the context of bone tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2018, Vol. 24, no. 1, pp. 75-83.
33. Krasnodembskaya A., Song Y., Fang X., Gupta N., Serikov V., Lee J.W., Matthay M.A. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells*, 2010, Vol. 28, no. 25, pp. 2229-2238.
34. Lee K., Silva E.A., Mooney D.J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J. R. Soc. Interface*, 2011, Vol. 8, no. 55, pp. 153-170.
35. Li M., Hasegawa T., Hogo H., Tatsumi S., Liu Z., Guo Y., Sasaki M., Tabata C., Yamamoto T., Ikeda K., Amizuka N. Histological examination on osteoblastic activities in the alveolar bone of transgenic mice with induced ablation of osteocytes. *Histol. Histopathol.*, 2013, Vol. 28, no. 3, pp. 327-335.
36. Lin G.L., Hankenson K.D. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J. Cell Biochem.*, 2011, Vol. 112, no. 12, pp. 3491-3501.
37. Liu H., Kemeny, D.M., Heng B.C., Ouyang H.W., Melendez A.J., Cao T. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 5, pp. 2864-2871.
38. Liu W.H., Liu J.J., Wu J., Zhang L.L., Liu F., Yin L., Zhang M.M., Yu B. Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin 10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 38, no. 1, e55487. doi: 10.1371/journal.pone.0055487.
39. Lu W., Fu C., Song L., Yao Y., Zhang X., Chen Z., Li Y., Ma G., Shen C. Exposure to supernatants of macrophages that phagocytized dead mesenchymal stem cells improves hypoxic cardiomyocytes survival. *Int. J. Cardiol.*, 2012, Vol. 165, no. 2, pp. 333-340.
40. Luk F., Carreras-Planella L., Korevaar S.S. Inflammatory conditions dictate the effect of mesenchymal stem or stromal cells on b cell function. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1042. doi: 10.3389/fmmu.2017.01042.
41. Mukonoweshuro B., Brown C.J., Fisher J., Ingham E. Immunogenicity of undifferentiated and differentiated allogeneic mouse mesenchymal stem cells. *J. Tissue Eng.*, 2014, Vol. 5, no. 1, pp. 1-15.
42. Neuss S., Denecke B., Gan L., Lin Q. Transcriptome analysis of MSC and MSC-derived osteoblasts on resomer® Lt706 and Pcl: impact of biomaterial substrate on osteogenic differentiation. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 9, e23195. doi: 10.1371/journal.pone.0023195.
43. New S.E., Ibrahim A., Guasti L. Towards reconstruction of epithelialized cartilages from autologous adipose tissue-derived stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2016, Vol. 11, no. 11, pp. 3078-3089.
44. Niaza K., Senatov F., Anisimova N., Kiselevskiy M., Kaloshkin S. Effect of co-incubation with mesenchymal stromal cells in cultural medium on structure and mechanical properties of polylactide-based scaffolds. *BioNano Science*, 2017, Vol. 7, no. 4, pp. 712-717.
45. Nich C., Takakubo Y., Pajarinen J., Ainola M., Salem A., Sillat T., Rao A.J., Raska M., Tamaki Y., Takagi M., Konttinen Y.T., Goodman S.B., Gallo J. Macrophages-key cells in the response to wear debris from joint replacements. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2013, Vol. 101, no. 10, pp. 3033-3045.
46. Petri R.M., Hackel A., Hahnel K., Dumitru C.A., Bruderek K., Flohe S.B., Paschen A., Lang S., Brandau S. Activated tissue-resident mesenchymal stromal cells regulate natural killer cell immune and tissue-regenerative function. *Stem Cell Reports*, 2017, Vol. 9, pp. 985-998.
47. Raggatt L.J., Partridge N.C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J. Biol. Chem.*, 2010, Vol. 285, no. 33, pp. 25103-25108.
48. Raicevic G., Najar M., Najimi M., El Taghdouini A., van Grunsven L.A., Sokal E., Toungouz M. Influence of inflammation on the immunological profile of adult-derived human liver mesenchymal stromal cells and stellate cells. *Cytotherapy*, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 174-185.
49. Rauner M., Sipos W., Pietschmann P. Osteoimmunology. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2007, Vol. 143, no. 1, pp. 31-48.
50. Roszer T. Understanding the Mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, no. 1, pp. 1-16.
51. Santo V.E., Gomes M.E., Mano J.F., Reis R.L. Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering – Part I: recapitulation of native tissue healing and variables for the design of delivery systems. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2013, Vol. 19, no. 4, pp. 308-326.

52. Senatov F.S., Zadorozhnyy M.Yu., Niaza K.V., Medvedev V.V., Kaloshkin S.D., Anisimova N.Yu., Kiselevskiy M.V., Yang K.-C. Shape memory effect in 3D-printed scaffolds for self-fitting implants. *Eur. Polymer J.*, 2017, Vol. 93, no. 1, pp. 222-231.
53. Soto-Gutierrez A., Wertheim J.A., Ott H.C., Gilbert T.W. Perspectives on whole-organ assembly: moving toward transplantation on demand. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 11, pp. 3817-3823.
54. Sutton M.T., Fletcher D., Ghosh S.K., Weinberg A., van Heeckeren R., Kaur S., Sadeghi Z., Hijaz A., Reese J., Lazarus H.M., Lennon D.P., Caplan A.I., Bonfield T.L. Antimicrobial properties of mesenchymal stem cells: therapeutic potential for cystic fibrosis infection, and treatment. *Stem Cells Int.*, 2016, Vol. 2016, no. 1, pp. 1-12.
55. Wang M.L., Nesti L.J., Tuli R., Lazatin J., Danielson K.G., Sharkey P.F., Tuan R.S. Titanium particles suppress expression of osteoblastic phenotype in human mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, 2002, Vol. 20, no. 6, pp. 1175-1184.
56. Xue R., Qian Y., Li L., Yao G., Yang L., Sun Y. Polycaprolactone nanofiber scaffold enhances the osteogenic differentiation potency of various human tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.*, 2017, Vol. 8, no. 1, p. 148.
57. Yagi H., Soto-Gutierrez A., Parekkadan B., Kitagawa Y., Tompkins R.G., Kobayashi N., Yarmush M.L. Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.*, 2010, Vol. 19, no. 6, pp. 667-679.
58. Zhang S., Chen X., Hu Y., Wu J., Cao Q., Chen S., Gao Y. All-trans retinoic acid modulates Wnt3A-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via activating the PI3K/AKT/GSK3beta signalling pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2016, Vol. 42, no. 422, pp. 243-253.
59. Zhou Y., Tsai T.L., Li W.J. Strategies to retain properties of bone marrow-derived mesenchymal stem cells *ex vivo*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2017, Vol. 1409, no. 1, pp. 3-17.
60. Zimmermann J.A., Hettiaratchi M.H., McDevitt T.C. Enhanced Immunosuppression of T cells by sustained presentation of bioactive interferon- γ within three-dimensional mesenchymal stem cell constructs. *Stem Cells Transl. Med.*, 2017, Vol. 6, no. 1, pp. 223-237.

Авторы:

Киселевский М.В. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета ФГБНУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Анисимова Н.Ю. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБНУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ; научный сотрудник центра композиционных материалов, Национальный технический университет «МИСиС», Москва, Россия

Должикова Ю.И. — инженер центра композиционных материалов, Национальный технический университет «МИСиС», Москва, Россия

Власенко Р.Я. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБНУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Сенатов Ф.С. — к.ф.-м.н., научный сотрудник центра композиционных материалов Национальный технический университет «МИСиС», Москва, 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:

Kiselevsky M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Cellular Immunity, N.N. Blokhin National Medical Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Anisimova N.Yu., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunity, N.N. Blokhin National Medical Center of Oncology; Research Associate, Center for Composite Materials, National University of Science and Technology MISiS, Moscow, Russian Federation

Dolzhikova Yu.I., Engineer, Center for Composite Materials, National University of Science and Technology MISiS, Moscow, Russian Federation

Vlasenko R.Ya., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunity, N.N. Blokhin National Medical Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Senatov F.S., PhD (Physics and Mathematics), Research Associate, Center for Composite Materials, National University of Science and Technology MISiS, Moscow, Russian Federation

Karaulov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 11.12.2017

Отправлена на доработку 13.12.2017

Принята к печати 26.12.2017

Received 11.12.2017

Revision received 13.12.2017

Accepted 26.12.2017

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ FCR У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ НА ОСНОВАНИИ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ

Назарова Е.Л., Сухорукова Э.Е., Минаева Н.В., Шардаков В.И., Фокина Е.С.

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Резюме. В многочисленных исследованиях показано, что распространенные варианты генов иммунного/воспалительного ответа могут оказывать влияние на эффективность лечения хронического лимфолейкоза (CLL). В ранее опубликованной работе мы представили данные, что полиморфные варианты ряда генов иммунного ответа у больных CLL ассоциированы с различной скоростью прогрессирования заболевания. Установлены корреляционные связи распределения модификационных профилей генов при доброкачественной и прогрессирующей формах CLL. В данном исследовании отражены результаты фармакогенетических изысканий, направленных на выявление ассоциаций между полиморфизмом генов иммунного ответа и эффективностью лечения FCR больных CLL. Исследовались 19 полиморфных участков 14 генов иммунного ответа у 33 пациентов с CLL, получавших терапию FCR. Генотипы *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR9*, *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-17A*, *CD14*, *TNF α* , *FCGR2A* определяли методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами. Больные CLL были разделены на несколько групп в зависимости от сроков ответа на лечение FCR: с частичной/полной ремиссией заболевания после двух, четырех, шести курсов лечения и с отсутствием ответа на терапию. Выявленные статистически значимые различия в распределении частот гаплотипов затрагивали гены *IL-1 β* (C-3953T) ($p = 0,02-0,009$), *IL-10* (C-819T) ($p = 0,04$), *IL-10* (G-1082A) ($p = 0,04-0,002-0,006$), *FCGR2A* (His166Arg) ($p = 0,006$), *TLR4* (Thr399Ile) ($p = 0,02$), *TLR6* (Ser249Pro) ($p = 0,04$), *TLR9* (A2848G) ($p = 0,04-0,007$), *CD14* (C-159T) ($p = 0,03$). При проверке гипотезы достоверности результатов множественных сравнений была подтверждена значимость обнаруженных событий только для гена *IL-10* (G-1082A) ($p < 0,01$; $\chi^2 = 20,082$). Полученные результаты показывают взаимосвязь между мутационным статусом гена *IL-10*-1082 и сроками ответа на терапию FCR, а также позволяют выделить группу больных с первично-резистентными к FCR формами CLL до начала лечения. Обсуждается роль взаимоотношений между полиморфизмом гена *IL-10* и продукцией IL-10 с вероятностью возникновения и характером течения В-зрелоклеточных опухолей лимфатической системы. Доказанным считается, что IL-10 является фактором роста для неизмененных и трансформированных В-лимфоцитов человека, контролирует баланс между клеточным и гуморальным иммунными ответами, обладает выраженной иммуносупрессивной активностью, наряду со способностью стимулировать пролиферацию опухолевых клеток. Приводятся обоснования прове-

Адрес для переписки:

Назарова Елена Львовна
ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»
610027, Россия, г. Киров, ул. Красноармейская, 72.
Тел./факс: 8 (8332) 54-97-31.
E-mail: nazarova@niigpk.ru

Address for correspondence:

Nazarova Elena L.
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency
610027, Russian Federation, Kirov, Krasnoarmeiskaya str., 72.
Phone/Fax: 7 (8332) 54-97-31.
E-mail: nazarova@niigpk.ru

Образец цитирования:

Е.Л. Назарова, Э.Е. Сухорукова, Н.В. Минаева, В.И. Шардаков, Е.С. Фокина «Оценка эффективности терапии FCR у больных хроническим лимфолейкозом на основании иммуногенетических критериев» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 523-534. doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-523-534

© Назарова Е.Л. и соавт., 2018

For citation:

E.L. Nazarova, E.E. Sukhorukova, N.V. Minaeva, V.I. Shardakov, E.S. Fokina "Evaluation of FCR therapy efficacy in patients with chronic lymphocytic leukemia based on immunogenetic criteria", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 523-534. doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-523-534

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-523-534

дения фармакогеномных исследований при CLL для прогнозирования эффективности конкретного препарата или комбинации лекарственных средств у каждого пациента, что в перспективе позволит обнаружить фактор, влияющий на успех терапии уже на ранних ее этапах.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, ритуксимаб, полиморфизм генов, иммунный ответ, интерлейкин-10, эффективность лечения

EVALUATION OF FCR THERAPY EFFICACY IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA BASED ON IMMUNOGENETIC CRITERIA

Nazarova E.L., Sukhorukova E.E., Minaeva N.V., Shardakov V.I., Fokina E.S.

Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation

Abstract. A number of studies have shown that distinct common variants of the genes controlling immune/inflammatory response may affect efficiency of chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment. In a recently published paper, we reported polymorphic variants of some immune response genes in CLL patients to be associated with different rates of disease progression. Correlations between the distribution of gene modification profiles in indolent and aggressive forms of CLL have been established. The present study describes results of pharmacogenetic studies aimed for identifying associations between the immune response genes polymorphism, and efficacy of FCR treatment regimen in CLL patients. 19 polymorphic loci of 14 immune response genes were studied in 33 patients with CLL who received FCR therapy. The *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR9*, *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-17A*, *CD14*, *TNF α* , *FCGR2A* genotypes were determined by polymerase chain reaction with allele-specific primers. CLL patients were divided into several groups depending on the terms of response to FCR treatment, i.e., achieving partial/complete remission after two, four, six courses of treatment, and those who did not respond to the therapy. Statistically significant differences in the distribution of haplotype frequencies were detected for the following genes: *IL-1 β* (C-3953T, $p = 0.02-0.009$); *IL-10* (C-819T, $p = 0.04$); *IL-10* (G-1082A, $p = 0.04-0.002-0.006$), *FCGR2A* (His166Arg, $p = 0.006$); *TLR4* (Thr399Ile, $p = 0.02$); *TLR6* (Ser249Pro, $p = 0.04$); *TLR9* (A2848G, $p = 0.04-0.007$); *CD14* (C-159T, $p = 0.03$). When testing the significance hypothesis by multiple comparisons, the difference for the detected events was confirmed only for *IL-10* gene (G-1082A, $p < 0.01$; $\chi^2 = 20,082$). The results show a relationship between the allelic status of the *IL-10-1082* gene and the timing of response to FCR therapy, as well as predict a group of patients with primary-resistant CLL before treatment. The role of the relationship between *IL-10* gene polymorphism and IL-10 production is discussed in connection with occurrence risk and clinical course of mature B-cell lymphoid malignancies. IL-10 is thought to be a growth factor for normal and transformed human B-lymphocytes, it controls a balance between cellular and humoral immune responses while exerting a pronounced immunosuppressive activity, along with ability to stimulate tumor cell proliferation. A rationale for conducting pharmacogenomic studies in CLL is provided, in order to predict efficiency of a specific drug or their combination in a distinct patient, thus representing chances to detect a factor which may influence success of the therapy since its earlier stage.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, rituximab, gene polymorphism, immune response, interleukin-10, treatment efficacy

Введение

Несмотря на значительные успехи в лечении хронического лимфолейкоза (CLL — chronic lymphocytic leukemia), медиана выживаемости при современной терапии весьма гетерогенна и колеблется от 79 до 119 месяцев. Изменчивость характера течения CLL и результатов лечения во многом обусловлены биологическими свойствами опухоли, а также участием в патогенезе заболевания генетических и иммунологических факто-

ров [39]. В начале 1980-х годов использовались две простые клинические системы стадирования, предложенные К.Р. Rai и соавт. [34] и J.L. Binet и соавт. [8], которые впоследствии применялись для оценки прогноза CLL. Дополнительно идентифицировано множество биологических прогностических параметров, таких как мутационный статус генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (IGH), повторяющиеся цитогенетические аномалии (делеция 17p) [23], уровни

бета-2-микроглобулина и тимидинкиназы, экспрессия CD38, ZAP-70 и CD49d. Позднее исследователи обнаружили феномен стереотипии гена BCR (B-cell receptor – В-клеточный рецептор) и обосновали прогностическое значение некоторых подтипов BCR. С использованием технологии массивного параллельного секвенирования подтвержден гетерогенный мультиклональный пейзаж CLL. Повторяющиеся соматические мутации могут быть сгруппированы в соответствии с вариациями генов: 1) участвующих в ответе на повреждение ДНК и в контроле клеточного цикла (*TP53*, *ATM*, *RBI*, *BIRC3*), 2) являющихся звеньями пути передачи сигнала Notch (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *FBXW7*), 3) вовлеченных в развитие воспаления (*MYD88*, *DDX3X*, *MAPK1*), 4) определяющих процессинг РНК (*SF3B1*) и 5) опосредующих передачу сигнала посредством цитокинов (*NRAS*, *KRAS*, *BRAF*). Помимо мутаций некоторых генов (*TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1*), коррелирующих с неблагоприятным характером течения CLL, прогностическое значение других мутаций еще до конца не определено. Проведенными исследованиями подтверждена теория эволюции клонов при CLL и селекция субклональных драйверных мутаций под влиянием терапии. Значение этих сложных событий, вероятно, будет установлено в дальнейшем, а в настоящее время для выбора тактики лечения в рутинной клинической практике используются только клональные и субклональные мутации гена *TP53* [24].

Баланс сигналов, передаваемых посредством различных цитокинов, играет важную роль в регуляции неизменной функции иммунной системы. Его нарушение является основой патогенеза многочисленных иммуноопосредованных заболеваний, в частности злокачественных опухолей. Показано, что продукция цитокинов находится под контролем генетических факторов. В генах цитокинов, особенно в их промоторных регионах, обнаружены различные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP – single nucleotide polymorphisms). Некоторые из них связаны с различным уровнем экспрессии цитокинов, что влияет на уровень других цитокинов, участвующих в иммунном ответе. Исследованиями выявлена роль интерлейкина (IL)-10, фактора некроза опухоли (TNF)- α и трансформирующего фактора роста (TGF)- β в возникновении и развитии различных видов В-клеточных лимфом. Эти цитокины поддерживают рост и выживание неизменных и трансформированных клеток, включая В-лимфоциты, а также способствуют развитию резистентности к лекарственным средствам [39].

В последние годы появилось несколько новых вариантов терапии CLL, включая ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTK) ибрутиниб, инги-

битор дельта-изоформы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) иделалисиб в комбинации с ритуксимабом, антагонист Vcl-2 – венетоклакс, а также новые антитела против CD20 – обинутузумаб и офатумумаб. Большинство из этих препаратов уже включены в алгоритмы лечения CLL и отражены в международных практических рекомендациях. Тем не менее использование сочетания флударабина, циклофосамида и ритуксимаба (FCR) остается основным вариантом терапии первой линии большинства пациентов с CLL без делеции/мутации гена *TP53* и значимых сопутствующих соматических и инфекционных заболеваний. Данный вариант лечения особенно эффективен у больных с благоприятными молекулярно-генетическими характеристиками опухолевого клона, в том числе мутационным статусомIGHV [24].

Ритуксимаб способен ингибировать конститутивно активированный путь передачи сигнала ядерного фактора- κ B (NF- κ B – nuclear factor- κ B) в трансформированных В-лимфоцитах, приводя к усилению чувствительности злокачественных клеток к химиотерапии [39].

Знание индивидуальных изменений профиля экспрессии генов у пациента может помочь в прогнозировании эффективности, степени токсичности терапии и в рациональной персонализации лечения. Фактически гены, связанные с ответом на противоопухолевую терапию, весьма многочисленны. Они влияют на структуру и функцию белков, участвующих в фармакодинамике лекарственных препаратов и в активации метаболизма; кодируют протеины, которые связаны с онкогенезом, супрессией опухолевого роста, процессом передачи сигнала в клетках и восстановлением ДНК, и являются мишенями (рецепторы, ферменты и т.д.) терапевтических средств [15].

Представленная работа отражает результаты фармакогенетических исследований, направленных на выявление ассоциаций между полиморфизмом генов иммунного ответа и эффективностью лечения FCR больных CLL.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической венозной крови 33 больных с CLL (В стадия), у которых в последующем начата терапия по программе FCR. Среди пациентов наблюдались 23 (69,7%) мужчины и 10 (30,3%) женщин с медианой возраста 57 лет (39-77 лет). Оценка ответа на лечение выполнялась в соответствии с критериями, предложенными Международной рабочей группой по CLL (IWCLL) в 2008 г. [21]. Все больные разделены на несколько групп в зави-

симости от сроков ответа на лечение. В первую группу включены три (9,1%) человека, у которых наступление частичной/полной ремиссии заболевания наблюдалось уже после первых двух курсов терапии. Вторую составили 13 (39,4%) пациентов с подтвержденной ремиссией CLL после четырех курсов FCR. Третью – 10 (30,3%) больных с ремиссией после шести курсов лечения и четвертую – 7 (21,2%) обследованных, у которых при использовании режима FCR достичь ремиссии не удалось. Первые три группы были условно объединены в пятую, включавшую в себя 26 (78,8%) человек, получивших эффект от терапии FCR.

Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов в 19 полиморфных участках 14 генов иммунного ответа (Toll-подобных рецепторов (TLR – toll-like receptors) *TLR2* (Arg753Cln), *TLR3* (Phe421Leu), *TLR4* (Thr399Ile), *TLR6* (Ser249Pro), *TLR9* (T-1237C, A2848G), *IL-1β* (T-31C, T-511C, G-1473C, C-3953T), *IL-2* (T-330G), *IL-4* (C-589T), *IL-6* (C-174G), *IL-10* (C-819T, G-1082A), *IL-17A* (G-197A), *CD14* (C-159T), *TNFα* (G-308A), *FCGR2A* (His166Arg)) проводили с использованием комплекта реагентов «SNP-экспресс» методом полимеразной

цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (НПФ «Литех», Москва) на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК технология», Москва) и электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле. Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами применяли критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность. Дополнительно оценивали показатель отношения шансов – odds ratio (OR) – с вычислением границ 95%-го доверительного интервала (95% CI). Значение OR = 1 свидетельствовало об отсутствии ассоциации риска развития события с наблюдаемым генотипом; OR < 1 – об отрицательной ассоциации (фактор пониженного риска развития события); OR > 1 – о положительной ассоциации гаплотипа с риском развития события (фактор повышенного риска). Для анализа результатов использовали пакеты программ MS Office Excel 2003 STATISTICA V.13.2 и онлайн-калькулятор для расчета статистики при генетических исследованиях (http://gen-exp.ru/calculator_or.php). В случаях множественных сравнений применяли

ТАБЛИЦА 1. РАЗЛИЧИЯ В ЧАСТОТЕ ВЫЯВЛЕНИЯ ГАПЛОТИПОВ ГЕНОВ *IL-10-1082*, *IL-1β-3953* И *FCGR2A-166* У БОЛЬНЫХ CLL 1 И 2 ГРУПП

TABLE 1. DIFFERENCES IN HAPLOTYPE FREQUENCY OF *IL-10-1082*, *IL-1β-3953* AND *FCGR2A-166* GENE IN CLL PATIENTS OF THE 1ST AND 2ND GROUPS

Ген, генотип Gene, genotype	1 группа 1 group (n = 3)	2 группа 2 group (n = 13)	χ^2	p	OR values	
					Значение Value	95% CI
<i>IL-10</i> (G-1082A)						
GG	0,333	0,692	10,09	0,006	0,22	0,02-3,22
GA	0,000	0,308			0,30	0,01-7,17
AA	0,667	0,000			45,00	1,40-1451,28
<i>IL-1β</i> (C-3953T)						
CC	0,000	0,727	6,75	0,009	0,06	0,00-1,46
CT	0,667	0,273			5,33	0,34-82,83
TT	0,333	0,000			13,80	0,42-448,24
<i>FCGR2A</i> (His166Arg)						
GG	0,000	0,308	10,09	0,006	0,30	0,01-7,17
GA	0,333	0,692			0,22	0,02-3,22
AA	0,667	0,000			45,00	1,40-1451,28

Примечание. Здесь и далее – результаты представлены в долях единицы; χ^2 – критерий Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность; p – уровень значимости различий; OR (odds ratio) – отношение шансов; 95% CI – доверительный интервал (confidence interval), в котором статистическая значимость различий параметра, полученного на основе исследования, имеет степень вероятности 95%.

Note. Here and below, the results are presented as fractions of total groups taken as 1; χ^2 , Pearson criterion with Yates correction for continuity; p, the significance level for the differences; OR, odds ratio; 95% CI is a confidence interval for 95%-statistical significance of the differences observed.

метод Бонферрони для контроля над групповой вероятностью ошибки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Эффективность лечения оценивалась после проведения 2, 4 и 6 курсов терапии FCR на основании получения частичной или полной ремиссии CLL. Найдено, что 1 группу больных от 2 отличало преобладание мутантных гомозигот AA, AA, TT генов *IL-10* в позиции G-1082A; *IL-1β* в позиции C-3953T и *FCGR2A* в позиции His166Arg, что увеличивало шанс наступления

ремиссии после 2 курсов FCR в 45, в 14 и в 45 раз соответственно (табл. 1).

Пациентов 1 группы с достигнутой ремиссией после двух курсов FCR от больных 3 группы отличало преобладание гомозиготных носителей аллеля «дикого» типа генов *IL-10* в позиции G-1082A и *TLR9* в позиции A2848G, а также наличие гомозиготных и гетерозиготных носителей мутантного аллеля гена *IL-1β* в позиции C-3953T, что повышало шансы развития ремиссии в более ранние сроки в 12, 35 и в 21 раз соответственно (табл. 2).

Между пациентами, достигшими ремиссии после четырех (2 группа) и шести курсов (3 груп-

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГАПЛОТИПОВ ГЕНОВ *IL-10-1082*, *TLR9-2848* И *IL-1β-3953T* У БОЛЬНЫХ CLL 1 И 3 ГРУПП

TABLE 2. DIFFERENCES IN HAPLOTYPE FREQUENCY OF *IL-10-1082*, *IL-1β-3953* AND *TLR9 A2848G* GENE IN CLL PATIENTS FROM THE 1ST AND 3RD GROUPS

Ген, генотип Gene, genotype	1 группа 1 group (n = 3)	3 группа 3 group (n = 10)	χ^2	p	OR values	
					Значение Value	95% CI
<i>IL-10</i> (G-1082A)						
GG	0,333	0,000	6,24	0,04	12,60	0,39-411,13
GA	0,000	0,700			0,07	0,00-1,67
AA	0,667	0,300			4,67	0,30-73,39
<i>TLR9</i> (A2848G)						
AA	1,000	0,125	7,22	0,007	35,00	1,12-1094,80
AG + GG	0,000	0,875			0,03	0,00-0,89
<i>IL-1β</i> (C-3953T)						
CC	0,000	0,778	5,60	0,02	0,05	0,00-1,28
CT + TT	1,000	0,222			21,00	0,78-564,18

ТАБЛИЦА 3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ И ГАПЛОТИПОВ ГЕНОВ *TLR9-2848*, *IL-10-1082A* И *CD14-159T* У БОЛЬНЫХ CLL 2 И 3 ГРУПП

TABLE 3. DIFFERENCES IN HAPLOTYPE FREQUENCY FOR *TLR9-2848*, *IL-10-1082A* AND *CD14-159T* IN CLL PATIENTS FROM THE 2ND AND 3RD GROUPS

Аллель, ген, гаплотип Allele, gene, haplotype	2 группа 2 group (n = 13)	3 группа 3 group (n = 10)	χ^2	p	OR values	
					Значение Value	95% CI
<i>TLR9</i> (A2848G)						
A	0,650	0,313	4,05	0,04	4,09	1,01-16,58
G	0,350	0,688			0,24	0,06-0,99
<i>IL-10</i> (G-1082A)						
GG	0,692	0,000	12,64	0,002	44,33	2,10-936,83
GA	0,308	0,700			0,19	0,03-1,14
AA	0,000	0,300			0,08	0,00-1,75
<i>CD14</i> (C-159T)						
CC + CT	1,000	0,700	4,49	0,03	12,60	0,57-278,23
TT	0,000	0,300			0,08	0,00-1,75

ТАБЛИЦА 4. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГАПЛОТИПОВ ГЕНОВ *TLR6-249*, *IL-10-819* И *TLR4-399ILE* У БОЛЬНЫХ CLL С НАЛИЧИЕМ И ОТСУТСТВИЕМ ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ FCR

TABLE 4. DIFFERENCES IN HAPLOTYPE FREQUENCY FOR *TLR6-249*, *IL-10-819* AND *TLR4-399ILE* GENES IN CLL PATIENTS RESPONDING vs RESISTANT TO FCR THERAPY

Генотипы Genotypes	4 группа 4 group (n = 7)	5 группа 5 group (n = 26)	χ^2	p	OR values	
					Значение Value	95% CI
<i>TLR6</i> (Ser249Pro)						
GG	0,714	0,308	4,06	0,04	5,63	0,89-35,39
GA	0,286	0,500			0,40	0,07-2,45
AA	0,000	0,192			0,26	0,01-5,30
<i>IL-10</i> (C-819T)						
CC	1,000	0,577	4,44	0,04	11,33	0,58-215,34
CT + TT	0,000	0,423			0,09	0,00-1,74
<i>TLR4</i> (Asp399Ile)						
CC + CT	0,750	1,000	5,47	0,02	0,05	0,00-1,62
TT	0,250	0,000			18,43	0,62-549,00

ТАБЛИЦА 5. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГАПЛОТИПОВ ГЕНА *IL-10-1082* В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ CLL, ПОЛУЧАВШИХ ТЕРАПИЮ FCR

TABLE 5. DIFFERENCES IN HAPLOTYPE FREQUENCY FOR *IL-10-1082* GENE IN GROUPS OF CLL PATIENTS TREATED WITH FCR THERAPY

Гаплотипы Haplotypes	1 группа 1 group (n = 3)	2 группа 2 group (n = 13)	3 группа 3 group (n = 10)	4 группа 4 group (n = 7)
GG	0,333	0,692	0,000	0,571
GA	0,000	0,308	0,700	0,429
AA	0,667	0,000	0,300	0,000

па) FCR, также были найдены различия распределения ряда исследованных иммуногенетических маркеров (табл. 3).

Во 2 группе наблюдалось преобладание в гаплотипах гена *TLR9* в позиции A2848G аллеля «дикого» типа А, аллеля «дикого» типа А в гомозиготном состоянии гена *IL-10* в позиции G-1082A и гаплотипов гена *CD14* с аллелем «дикого» типа в гомо- и гетерозиготном состоянии в позиции C-159T, что повышало шанс наступления ремиссии в более ранние сроки в 4, 44 и в 12 раз соответственно.

При сравнении группы больных, резистентных к назначенной терапии (4 группа), и обобщенной группы пациентов, ответивших на лечение FCR (5 группа), найдено, что гомозиготное носительство аллелей «дикого» типа С генов *TLR6* в позиции Ser249Pro и *IL-10* в позиции C-819T повышало шансы развития первично-резистентного к FCR CLL почти в 5 и в 11 раз соответственно, а преобладание носительства мутантного аллеля Т гена *TLR4* в позиции Asp399Ile в гомозиготном состоянии снижало шансы раз-

вития ответа на лечение с использованием программы FCR в 18 раз (табл. 4).

Учитывая множественность сравнений выявленных гаплотипов, проведен анализ достоверности полученных результатов с применением поправки Бонферрони с целью контроля над групповой вероятностью ошибки. В результате найдено, что истинная связь между наблюдаемыми гаплотипами генов иммунного ответа во всех выделенных группах пациентов с CLL, получавших терапию FCR, и со сроками ответа на лечение или отсутствием такового обнаружена для гена *IL-10* в позиции G-1082A ($p < 0,01$; $\chi^2 = 20,082$) (табл. 5).

Найденные в работе статистически значимые различия в частоте гаплотипов генов *IL-1 β* (C-3953T), *IL-10* (C-819T), *FCGR2A* (His166Arg), *TLR4* (Thr399Ile), *TLR6* (Ser249Pro), *TLR9* (A2848G), *CD14* (C-159T) при проверке гипотезы достоверности в результате множественных сравнений не подтвердили свою значимость. Необходимы дальнейшие исследования с увеличением числа наблюдений во всех выделенных группах

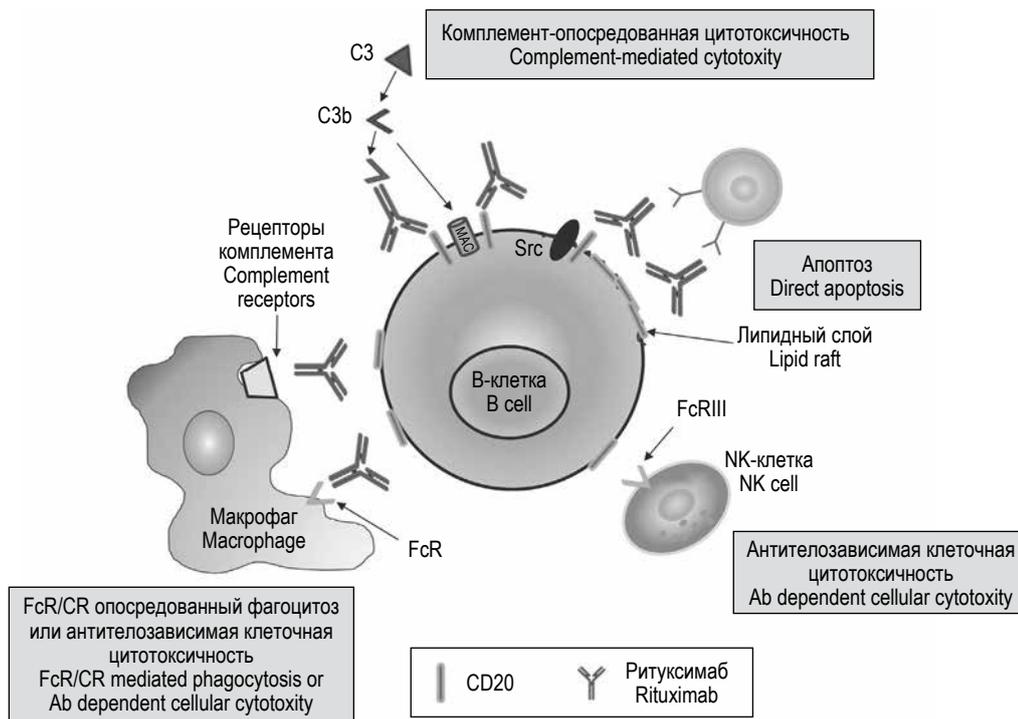


Рисунок 1. Предположительный механизм действия ритуксимаба (модифицировано из [15])

Figure 1. A proposed mechanism of Rituximab action (modified from [15])

пациентов, которые смогут либо установить, либо исключить участие этих генов в реализации ответа на терапию FCR при CLL.

Таким образом, определение мутационного статуса гена *IL-10* (G-1082A) можно рекомендовать для прогнозирования развития ответа с использованием программной терапии FCR у больных CLL до начала лечения, что позволит скорректировать на начальном этапе тактику ведения пациентов с первично-резистентными формами заболевания.

Обсуждение

Ритуксимаб – один из компонентов программы терапии FCR, представляет собой гуманизированное IgG1 моноклональное антитело (mAb), имеющее два домена: фрагмент ab (Fab), связывающий антиген CD20 на В-лимфоцитах, и фрагмент с (Fc) – Fc-гамма-рецептор (FcγR) на эффекторных клетках. Образование комплекса ритуксимаба с CD20⁺ и иммунокомпетентными клетками, экспрессирующими Fc-рецепторы (NKK – естественные киллеры и макрофаги), приводит к запуску антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC – antibody depended cellular cytotoxicity) [15]. Механизмы действия ритуксимаба *in vivo* остаются не до конца понятыми и могут отличаться при различных подтипах В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний [19]. Активность препарата может быть

объяснена и некоторыми другими механизмами, в частности комплементзависимой цитотоксичностью (CDC – complement-depended cytotoxicity), индукцией апоптоза и повышением чувствительности опухолевых клеток к цитотоксическому влиянию химиотерапии (рис. 1) [15, 19].

Поскольку связывание ритуксимаба с CD20 индуцирует лизис и апоптоз всех CD20⁺ экспрессирующих клеток, в том числе неопухолевых В-лимфоцитов, влияние этого препарата на обычные функции иммунной системы, особенно на те, которые осуществляются В-клетками, представляет интерес [33]. В процессе развития В-лимфоцитов CD20 сначала появляется на поздних про-В-клетках и затем конститутивно присутствует на пре-В, незрелых, наивных зрелых В-лимфоцитах и примированных антигеном В-клетках памяти. Экспрессия CD20 непостоянна на промежуточных антителосекретирующих плазмобластах и отсутствует на терминально дифференцированных плазматических клетках [38]. Истощение пула неопухолевых В-лимфоцитов в периферической крови у пациентов, пролеченных ритуксимабом, однако, не сопровождается изменением уровней циркулирующих иммуноглобулинов в течение более 18 недель, что свидетельствует о сохранности субпопуляций плазмобластов и плазматических клеток [2]. Восполнение утраченного в результате терапии числа В-лимфоцитов возможно за счет подтипа регуляторных В-клеток (Bregs),

называемых В10-клетками по их способности продуцировать ИЛ-10 [7, 19, 33]. Предполагается, что ИЛ-10 является цитокином, необходимым для дифференцировки плазмобластов и плазматических клеток, секреция которого может привести к параллельному развитию Вregs [33].

Ритуксимаб и другие таргетные препараты, направленные против CD20, являются весьма эффективными терапевтическими средствами лечения различных видов неходжкинских лимфом (NHL – non-Hodgkin's lymphoma), несмотря на то что опухолевые клетки, так же как и неизменные В-лимфоциты, обычно не экспрессируют антиген CD20 чрезмерно. На трансформированных клетках при NHL наблюдается выраженная экспрессия рецептора ИЛ-10 (ИЛ-10R), связывание с которым предполагает более избирательное влияние на них, чем на обычные В-лимфоциты, таргетных анти-ИЛ-10 лекарственных препаратов. Вregs являются типичной субпопуляцией неизменных В-лимфоцитов с максимальной экспрессией ИЛ-10 и ИЛ-10R, оказывающей иммуносупрессивное действие на функционирование Т-лимфоцитов-хелперов (Th) Th1, Th17 и регуляторных Т-клеток (Tregs). Вregs напоминают клетки врожденного иммунитета – В-1а, которые возникают из В-клеток-предшественников Т2 маргинальной зоны. Взаимодействие клеток-предшественников В10pro с TLR4 и TLR9 приводит к чрезмерной продукции ИЛ-10 и их созреванию в В10-клетки. Передача сигнала через MyD88, который часто мутирует, например при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (DLBCL – diffuse large B-cell lymphoma), и усиливает продукцию ИЛ-10. Предполагается, что применение anti-ИЛ-10R в качестве лекарственного средства может активировать реализацию противоопухолевого иммунного ответа, элиминируя опухолевые клетки, продуцирующие высокие уровни ИЛ-10, тем самым устраняя ИЛ-10-зависимый иммуносупрессивный паракринный эффект. Возможно, с уменьшением количества Вregs будет создаваться более благоприятное микроокружение для развития Tregs и Th1-клеток. Таким образом, таргетные препараты к ИЛ-10R являются многообещающими [7, 19].

Обнаружено, что полиморфизмы в генах, участвующих в фармакодинамике ритуксимаба (CD20, FcγRIIIA, FcγRIIA и C1q), могут частично обуславливать гетерогенность результатов лечения и выступать в качестве прогностических маркеров исходов лечения [15].

Полиморфизм проявляется в изменении последовательности ДНК гена, который встречается в популяции с частотой $\geq 1\%$, что приводит к нарушениям экспрессии, структуры и функции кодируемого геном белка. Однонуклеотид-

ный полиморфизм представляет собой замену только одного нуклеотида и является примером наиболее распространенной мутации, обнаруживаемой в каждой тысяче пар оснований генома человека. SNP обычно присутствуют во фланкирующих областях протеин-кодирующих генов (предназначены для связывания микроРНК и для регуляции экспрессии белка), затрагивая последовательности экзонов, интронов или области, являющиеся границей между экзонами и интронами, а также сайты сплайсинга. Некоторые более сложные полиморфизмы, такие как набор мини/микросателлитных повторов (VNTR – различное число tandemных повторов) или копии гена (CNV – вариации числа копий), играют важную роль в синтезе определенного количества мРНК и продуцируемого белка. При миссенс-мутациях происходит замещение одного аминокислотного остатка другим, что приводит к модификации последовательности протеина. Синонимичные (молчащие) полиморфизмы могут влиять на функцию белка, обуславливая более медленный синтез протеина, несовершенную структуру белка, продукцию протеина с частичными функциями и полностью неактивного белка [15].

В проведенной ранее работе мы идентифицировали полиморфные варианты генов иммунного ответа у больных CLL, ассоциированные с различной скоростью прогрессирования заболевания. Установлен ряд корреляционных связей распределения модификационных профилей генов при доброкачественной и прогрессирующей формах CLL. Так, на доброкачественный характер течения CLL и, следовательно, выживаемость пациентов уже в момент постановки диагноза указывает присутствие мутантных аллелей генов *TNF* (G-308A), *TLR9* (T-1237C) и *TLR2* (Arg753Gln), а также низкая частота выявления аллеля «дикого» типа гена *IL-6* (C-174G). Кроме того, определение комбинации нормальных гомозигот генов *TNF*, *TLR9* и *TLR2* коррелирует с развитием прогрессирующей формы заболевания. В связи с этим мы предположили, что использование генетических прогностических маркеров в клинической практике может способствовать оптимизации выбора терапии [1].

В представленном нами исследовании впервые проведен довольно широкий обзор полиморфизмов генов, участвующих в реализации иммунного ответа у больных CLL, пролеченных по протоколу FCR. Найдена достоверная связь между наблюдаемыми гаплотипами генов иммунного ответа во всех выделенных группах пациентов с CLL, получавших терапию FCR, со сроками ответа на лечение или отсутствием та-

кового с мутационным статусом (rs1800896) гена *IL-10* в позиции G-1082A ($p < 0,01$; $\chi^2 = 20,082$).

Промоторная область гена *IL-10*, расположенного на хромосоме 1 (1q31-1q32), может содержать три типичных SNP: rs1800896, rs1800871 и rs1800872 [6, 25]. Только один из них – rs1800896, вероятнее всего, влияет на уровень кодируемого данным геном цитокина. Наличие аллеля «дикого» типа в гаплотипе гена ассоциируется со сниженным уровнем секреции IL-10, а мутантный аллель – с его более высоким содержанием [6]. Исследования взаимоотношения между полиморфизмом гена *IL-10* с вероятностью возникновения лимфом подтвердили связь вариантов rs1800890, rs1800896, rs1800871 и rs1800872 с повышенным риском развития NHL [25].

Ген *IL-10* кодирует один из противовоспалительных цитокинов – IL-10, который в основном секретируется моноцитами, Th2, Tregs, активированными Т- и В-лимфоцитами [7, 11, 12, 14, 17, 18, 20, 22, 25, 26, 27, 29, 31]. Этот цитокин является фактором роста обычных активированных В-лимфоцитов человека и В-клеточных линий лимфом [30, 36]. Он контролирует баланс между клеточным и гуморальным иммунными ответами, обладает выраженной иммуносупрессивной активностью, стимулирует пролиферацию опухолевых клеток. IL-10 подавляет высвобождение и активность провоспалительных цитокинов, секретируемых Th1 и макрофагами (интерферон [IFN – interferon]- γ , IL-2, IL-3, TNF α), а также экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса [7, 25]. Такой дисбаланс соотношения Th1/Th2, вызываемый в том числе различными генетическими полиморфизмами, может быть одним из компонентов патогенеза различных типов NHL [25].

Передача сигнала IL-10 осуществляется через рецептор IL-10R, который состоит из двух субъединиц: IL-10R α и IL-10R β . Связывание цитокина с рецептором приводит к аутофосфорилированию субъединицы IL-10R α , активации IL-10R α -ассоциированной Янус-киназы 1 (JAK1) или IL-10R α -ассоциированной ТЫК2 киназы. Стимуляция JAK1 и ТЫК2 запускает последующую индукцию белков семейства STAT (преобразователь сигнала и активатор транскрипции). IL-10 в основном передает сигнал через STAT3 и в гораздо меньшей степени – через STAT1, STAT5 и STAT6. После фосфорилирования аминокислотных остатков Tyr705 и Ser737 STAT3 транслоцируется в ядро, где влияет на экспрессию нижележащих генов, содержащих едиобразные гамма-активированные сайты (GAS) мотивов ДНК. Сам промотор гена STAT3 включает в себя мотив GAS, поэтому его активация инициирует цикл самопроизвольной

стимуляции, приводящий к увеличению уровня нефосфорилированного STAT3. Показано, что фосфорилированный STAT3 и его нефосфорилированная форма могут перемещаться в ядро и активировать нижележащие гены [7].

Актуальность изучения IL-10 при различных типах NHL доказана на примере DLBCL. Установлено участие взаимоотношений IL-10-JAK1/2-STAT3 в выживании, пролиферации опухолевых клеток, а также в эффективности лечения больных DLBCL. Отмечено, что высокие уровни сывороточного IL-10 наблюдались у пациентов с более агрессивным характером заболевания, активируя *ex vivo* JAK2 и STAT3. JAK2-специфический ингибитор, который может прерывать аутокринную секрецию IL-10 и активацию комплекса JAK2/STAT3. Стимуляция STAT3 в основном способствует выживанию клеток при ABC типе DLBCL, и использование ингибиторов JAK приводит к апоптозу опухолевых клеток. Так как при DLBCL выявляется выраженная экспрессия IL-10R с последующей индукцией передачи сигнала STAT3, считается, что блокирование IL-10R приводит к прерыванию передачи сигнала IL-10, остановке клеточного цикла и к апоптозу трансформированных клеток. IL-10 является необходимым звеном для передачи сигнала путем NF- κ B, который активируется при различных типах NHL и вносит вклад в процесс самостоятельной стимуляции NF- κ B через STAT3. IL-10 также способствует пролиферации неизмененных В-клеток путем активации BCR или CD40. У больных DLBCL высокая сывороточная концентрация IL-10 является биологическим маркером неблагоприятных результатов лечения [7]. Найдено, что более высокие уровни сывороточного IL-10 связаны с плохим прогнозом заболевания у пациентов с другими видами NHL и лимфомой Ходжкина [9, 27, 28, 37]. IL-10 в гематопозитических клетках и клетках лимфомы регулирует экспрессию bcl-2, члена семейства протеинов Bcl-2, участвующих в апоптозе [41]. Bcl-2 играет ключевую роль в способности опухолевых клеток выживать при воздействии цитотоксических стимулов и обуславливает развитие резистентности к апоптогическим сигналам [13, 35, 40]. Выраженной экспрессией bcl-2 и/или IL-10 у некоторых пациентов объясняется неэффективность, например, терапии СНОР при DLBCL. Однако добавление в схему лечения ритуксимаба изменяет клеточную и молекулярную трансдукцию сигнала, регулируя экспрессию bcl-2, особенно у bcl-2-позитивных пациентов с DLBCL [3, 4, 5, 10, 15].

При CLL показано, что сывороточный уровень IL-10 коррелировал со стадией заболевания, по Rai и соавт. [34], и был максимально высоким

у больных с III-IV стадиями CLL по сравнению с 0-II стадиями. Параллельное увеличение числа Tregs, обладающих иммуносупрессивными свойствами, ингибировало функцию других эффекторных Т-клеток, приводя к прогрессированию заболевания. В свою очередь, IL-10, секретируемый Treg, может ингибировать рост и дифференцировку Th17-клеток, что также негативно отражается на течении и прогнозе заболевания. Найдено, что число Tregs и сывороточное содержание IL-10 значительно снижались у больных CLL в ремиссии заболевания, так как терапия способствует апоптозу Tregs и уменьшению продукции IL-10, вызывая гибель неопластических клеток [32].

Эти наблюдения подчеркивают клиническую значимость фармакогенетических исследований в онкогематологии и предполагают необходимость дополнительных изысканий в целях индивидуализации терапии для ее эффективности и/или уменьшения риска неблагоприятных последствий. Однако следует отметить, что ряд факторов влияет на результаты генетического тестирования. К ним относятся протокол введения лекарственного средства, применение других

видов лечения (лучевая терапия, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, сопроводительное лечение), этническое происхождение пациентов, их возраст (у пожилых больных чаще наблюдаются побочные токсические эффекты терапии, чем у молодых), дизайн исследования с учетом количества пациентов, наличия контрольной группы, используемые конечные точки оценки эффективности, технологии, применяемые для анализа ДНК [15].

Следует иметь в виду, что присутствия одной из генетических особенностей недостаточно, чтобы описать индивидуальные различия, наблюдаемые при применении конкретных лекарственных средств. Это связано с тем, что фармакокинетика препарата весьма сложна и состоит из многих компонентов. Дифференцированный ответ на терапию, как правило, является результатом действия многих генов. Однако прогнозирование на ранних этапах эффективности каждого препарата или комбинации лекарственных средств у каждого пациента позволит достичь успеха в терапии и снизить возможность развития побочных эффектов лечения [15].

Список литературы / References

1. Назарова Е.Л., Шардаков В.И., Демьянова В.Т., Докшина И.А., Зотина Е.Н. Модификации генов иммунного ответа при различных типах течения хронического лимфолейкоза // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 2015. Т. XXII, № 1. С. 21-24. [Nazarova E.L., Shardakov V.I., Demyanova V.T., Dokshina I.A., Zotina E.N. Modification of immune response genes in various types of chronic lymphocytic leukemia. *Uchenye zapiski SPbGMU im. akad. I.P. Pavlova = Record of the I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University*, 2015, Vol. XXII, no. 1, pp. 21-24. (In Russ.)]
2. Aklilu M., Stadler W.M., Markiewicz M., Vogelzang N.J., Mahowald M., Johnson M., Gajewski T.F. Depletion of normal B cells with rituximab as an adjunct to IL-2 therapy for renal cell carcinoma and melanoma. *Ann. Oncol.*, 2004, Vol. 15, no. 7, pp. 1109-1114.
3. Alas S., Bonavida B. Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, 2003, Vol. 9, no. 1, pp. 316-326.
4. Alas S., Bonavida B. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, no. 13, pp. 5137-5144.
5. Alas S., Emmanouilides C., Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, 2001, Vol. 7, no. 3, pp. 709-723.
6. Baran W., Szepietowski J.C., Mazur G., Baran E. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms in psoriasis vulgaris. *Acta Derm. Venereol.*, 2008, Vol. 88, no. 2, pp. 113-116.
7. Béguelin W., Sawh S., Chambwe N., Chan F.C., Jiang Y., Choo J.-W., Scott D.W., Chalmers A., Geng H., Tsikitas L., Tam W., Bhagat W., Gascoyne R.D., Shaknovich R. IL-10 receptor is a novel therapeutic target in DLBCLs. *Leukemia*, 2015, Vol. 29, no. 8, pp. 1-11.
8. Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piguët H., Goasguen J., Vaugier G., Potron G., Colona P., Oberling F., Thomas M., Tchernia G., Jacquillat C., Boivin P., Lesty C., Duault M.T., Monconduit M., Belabbes S., Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 1981, Vol. 48, no. 1, pp. 198-206.
9. Blay J.Y., Burdin N., Rousset F., Lenoir G., Biron P., Philip T., Banchereau J., Favrot M.C. Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. *Blood*, 1993, Vol. 82, no. 7, pp. 2169-2174.
10. Cartron G., Watier H., Golay J., Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*, 2004, Vol. 104, no. 9, pp. 2635-2642.

11. Chen Y., Zheng T., Lan Q., Foss F., Kim C., Chen X., Dai M., Li Y., Holford T., Leaderer B., Boyle P., Chanock S.J., Rothman N., Zhang Y. Cytokine polymorphisms in Th1/Th 2 pathway genes, body mass index, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 2, pp. 585-590.
12. de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., de Vries J.E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.*, 1991, Vol. 174, no. 5, pp. 1209-1220.
13. Domen J., Gandy K.L., Weissman I.L. Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood*, 1998, Vol. 91, no. 7, pp. 2272-2282.
14. Domingo-Domènech E., Benavente Y., González-Barca E., Montalban C., Gumà J., Bosch R., Wang S.S., Lan Q., Whitby D., Fernández de Sevilla A., Rothman N., de Sanjosé S. Impact of interleukin-10 polymorphisms (-1082 and -3575) on the survival of patients with lymphoid neoplasms. *Haematologica*, 2007, Vol. 92, no. 11, pp. 1475-1481.
15. Falduto A., Cimino F., Speciale A., Musolino C., Gangemi S., Saija A., Allegra A. How gene polymorphisms can influence clinical response and toxicity following R-CHOP therapy in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Blood Rev.*, 2017, Vol. 31, no. 4, pp. 235-249.
16. Fayad L., Keating M.J., Reuben J.M., O'Brien S., Lee B.N., Lerner S., Kurzrock R. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 1, pp. 256-263.
17. Fiorentino D.F., Bond M.W., Mosmann T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*, 1989, Vol. 170, no. 6, pp. 2081-2095.
18. Fiorentino D.F., Zlotnik A., Vieira P., Mosmann T.R., Howard M., Moore K.W., O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.*, 1991, Vol. 146, no. 10, pp. 3444-3451.
19. Gagez A.L., Tuaille E., Cezar R., Dartigeas C., Mahé B., Letestu R., Maisonneuve H., Gouilleux-Gruart V., Bollore K., Ferrant E., Aurran T., Feugier P., Leprêtre S., Cartron G. Response to rituximab in B-CLL patients is adversely impacted by frequency of IL-10 competent B cells and FcγRIIIa polymorphism. A study of FCGCLL/WM and GOELAMS groups. *Blood Cancer J.*, 2016, Vol. 6, e389. doi: 10.1038/bcj.2015.115.
20. Habermann T.M., Wang S.S., Maurer M.J., Morton L.M., Lynch C.F., Ansell S.M., Hartge P., Sevenson R.K., Rothman N., Davis S., Geyer S.M., Cozen W., Chanock S.J., Cerhan J.R. Host immune gene polymorphisms in combination with clinical and demographic factors predict late survival in diffuse large B-cell lymphoma patients in the pre-rituximab era. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 7, pp. 2694-2702.
21. Hohaus S., Giachelia M., di Febo A., Martini M., Massini G., Vannata B., D'Alò F., Guidi F., Greco M., Pierconti F., Larocca L.M., Voso M.T., Leone G. Polymorphism in cytokine genes as prognostic markers in Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.*, 2007, Vol. 18, no. 8, pp. 1376-1381.
22. Huang S.J., Lee L.J., Gerrie A.S., Gillan T.L., Bruyere H., Hrynychak M., Smith A.C., Karsan A., Ramadan K.M., Jayasundara K.S., Toze C.L. Characterization of treatment and outcomes in a population-based cohort of patients with chronic lymphocytic leukemia referred for cytogenetic testing in British Columbia, Canada. *Leuk. Res.*, 2017, Vol. 55, pp. 79-90.
23. Jamrozik K., Puła B., Walewski J. Current treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Curr. Treat. Options Oncol.*, 2017, Vol. 18, no. 1, p. 5.
24. Kim M.K., Yoon K.-A., Park E.Y., Joo J., Lee E.Y., Eom H.-S., Kong S.-Y. Interleukin-10 polymorphisms in association with prognosis in patients with B-cell lymphoma treated by R-CHOP. *Genomics Inform.*, 2016, Vol. 14, no. 4, pp. 205-210.
25. Kube D., Hua T.D., von Bonin F., Schoof N., Zeynalova S., Klöss M., Gocht D., Potthoff B., Tzvetkov M., Brockmöller J., Löffler M., Pfreundschuh M., Trümper L. Effect of interleukin-10 gene polymorphisms on clinical outcome of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: an exploratory study. *Clin. Cancer Res.*, 2008, Vol. 14, no. 12, pp. 3777-3784.
26. Lan Q., Zheng T., Rothman N., Zhang Y., Wang S.S., Shen M., Berndt S.I., Zahm S.H., Holford T.R., Leaderer B., Yeager M., Welch R., Boyle P., Zhang B., Zou K., Zhu Y., Chanock S. Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2006, Vol. 107, no. 10, pp. 4101-4108.
27. Lech-Maranda E., Baseggio L., Bienvenu J., Charlot C., Berger F., Rigal D., Warzocha K., Coiffier B., Salles G. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 2004, Vol. 103, no. 9, pp. 3529-3534.
28. Lech-Maranda E., Baseggio L., Charlot C., Rigal D., Berger F., Jamrozik K., Warzocha K., Coiffier B., Salles G. Genetic polymorphisms in the proximal IL-10 promoter and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma*, 2007, Vol. 48, no. 11, pp. 2235-2238.
29. Miyazaki I., Cheung R.K., Dosch H.M. Viral interleukin 10 is critical for the induction of B cell growth transformation by Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.*, 1993, Vol. 178, no. 2, pp. 439-447.
30. O'Garra A., Stapleton G., Dhar V., Pearce M., Schumacher J., Rugo H., Barbis D., Stall A., Cupp J., Moore K., Vieira P., Mosmann T., Whitmore A., Arnold L., Haughton G., Howard M. Production of cytokines by mouse B cell: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int. Immunol.*, 1990, Vol. 2, no. 9, pp. 821-832.

31. Pang N., Zhang R., Li J., Zhang Z., Yuan H., Chen G., Zhao F., Wang L., Cao H., Qu J., Ding J. Increased IL-10/IL-17 ratio is aggravated along with the prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int. Immunopharmacol.*, 2016, Vol. 40, pp. 57-64.
32. Qiu H., Li J., Feng Z., Yuan J., Lu J., Hu X., Gao L., Lv S., Yang J., Chen L. CD19(+) CD20(-) CD27(hi) IL-s10-producing B cells are overrepresented in R-CHOP-treated DLBCL patients in complete remission. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2016, Vol. 43, no. 9, pp. 795-801.
33. Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P., Chanana A.D., Levy R.N., Pasternack B.S. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1975, Vol. 46, no. 2, pp. 219-234.
34. Reed J.C. Bcl-2 family proteins: regulators of chemoresistance in cancer. *Toxicol. Lett.*, 1995, Vol. 82-83, pp. 155-158.
35. Rousset F., Garcia E., Defrance T., Peronne C., Vezzio N., Hsu D.H., Kastelein R., Moore K.W., Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Immunology*, 1992, Vol. 89, no. 5, pp. 1890-1893.
36. Sarris A.H., Kliche K.O., Pethambaram P., Preti A., Tucker S., Jackow C., Messina O., Pugh W., Hagemester F.B., McLaughlin P., Rodriguez M.A., Romaguera J., Fritsche H., Witzig T., Duvic M., Andreeff M., Cabanillas F. Interleukin-10 levels are often elevated in serum of adults with Hodgkin's disease and are associated with inferior failure-free survival. *Ann. Oncol.*, 1999, Vol. 10, no. 4, pp. 433-440.
37. Shapiro-Shelef M., Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, no. 3, pp. 230-242.
38. Tarabar O., Cikota-Aleksić B., Tukić L., Milanović N., Aleksić A., Magić Z. Association of interleukin-10, tumor necrosis factor- α and transforming growth factor- β gene polymorphisms with the outcome of diffuse large B-cell lymphomas. *Int. J. Clin. Oncol.*, 2014, Vol. 19, no. 1, pp. 186-192.
39. Tsujimoto Y. Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 a protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene*, 1989, Vol. 4, no. 11, pp. 1331-1336.
40. Weber-Nordt R.M., Henschler R., Schott E., Wehinger J., Behringer D., Mertelsmann R., Finke J. Interleukin-10 increases Bcl-2 expression and survival in primary human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 1996, Vol. 88, no. 7, pp. 2549-2558.

Авторы:

Назарова Е.Л. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии лейкозов ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Сухорукова Э.Е. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии лейкозов ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Минаева Н.В. — к.м.н., заместитель директора по лечебной работе ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Шардаков В.И. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии лейкозов ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Фокина Е.С. — к.м.н., врач-ординатор клинко-диагностического отделения ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Authors:

Nazarova E.L., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Leukemia Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation

Sukhorukova E.E., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Leukemia Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation

Minaeva N.V., PhD (Medicine), Deputy Director for Clinics, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation

Shardakov V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Leukemia Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation

Fokina E.S., PhD (Medicine), Resident Physician, Department of Clinical Diagnostics, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation

Поступила 02.10.2017

Отправлена на доработку 10.10.2017

Принята к печати 16.10.2017

Received 02.10.2017

Revision received 10.10.2017

Accepted 16.10.2017

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЦИТОКИНОВ ЧЕЛОВЕКА ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА (sci-store.ru) ПРИ ПОЛУЧЕНИИ МОНОЦИТАРНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

Талаев В.Ю., Талаева М.В., Воронина Е.В., Заиченко И.Е.

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени акад.
И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. Дендритные клетки – это специализированные антигенпрезентирующие клетки, критически необходимые для вовлечения наивных Т-лимфоцитов в процесс иммунного ответа. Дендритные клетки используются в многочисленных научных исследованиях, а также нашли практическое применение как основной компонент дендритноклеточных вакцин. Широко применяемым способом получения дендритных клеток является индукция их созревания из моноцитов под действием цитокинов в условиях *in vitro*. В данной работе незрелые и зрелые дендритные клетки получали из моноцитов взрослых здоровых доноров с использованием рекомбинантных цитокинов различных производителей, а затем сравнивали фенотип полученных клеток. Показано, что рекомбинантные белки человека интерлейкин-4 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор производства sci-store.ru эффективно стимулируют дифференцировку моноцитов человека в незрелые моноцитарные дендритные клетки в условиях *in vitro*. Полученные незрелые дендритные клетки демонстрируют типичную морфологию и фенотип, характеризующийся отсутствием моноцитарного маркера CD14 и экспрессией HLA-DR и костимулирующей молекулы CD80. Часть клеток экспрессирует костимулирующую молекулу CD86. Рекомбинантный белок человека интерлейкин-6 производства sci-store.ru в составе смеси медиаторов воспаления, состоящей из интерлейкина-6, интерлейкина-1 β , фактора некроза опухоли- α и простагландина E2, эффективно стимулирует терминальную дифференцировку незрелых дендритных клеток в зрелые дендритные клетки с характерной морфологией и фенотипом. Практически все дендритные клетки, полученные с использованием этого реагента, были лишены CD14 и экспрессировали HLA-DR, CD80, CD83 и CD86 с высокими показателями интенсивности флуоресценции.

Ключевые слова: дендритные клетки, моноциты, цитокины, созревание, мембранные молекулы

Адрес для переписки:

Талаев Владимир Юрьевич
ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии имени акад.
И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора
603950, Россия, г. Нижний Новгород, ул. М. Ямская, 71.
Тел.: 8 (831) 469-79-48.
E-mail: talaev@inbox.ru

Address for correspondence:

Talayev Vladimir Yu.
Nizhny Novgorod Research I.N. Blokhin Institute of
Epidemiology and Microbiology
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,
M. Yamskaya str., 71.
Phone: 7 (831) 469-79-48.
E-mail: talaev@inbox.ru

Образец цитирования:

В.Ю. Талаев, М.В. Талаева, Е.В. Воронина, И.Е. Заиченко
«Оценка эффективности рекомбинантных цитокинов
человека отечественного производства (sci-store.ru) при
получении моноцитарных дендритных клеток»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 535-542.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-535-542

© Талаев В.Ю. и соавт., 2018

For citation:

V.Yu. Talayev, M.V. Talayeva, E.V. Voronina, I.E. Zaichenko
“Efficiency evaluation of the home-produced recombinant human
cytokines from the sci-store.ru for generation of monocyte-derived
dendritic cells”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 535-542.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-535-542

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-535-542

EFFICIENCY EVALUATION OF THE HOME-PRODUCED RECOMBINANT HUMAN CYTOKINES FROM the *sci-store.ru* FOR GENERATION OF MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS

Talayev V. Yu., Talayeva M. V., Voronina E. V., Zaichenko I. E.

Nizhny Novgorod Research I. N. Blokhin Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Dendritic cells are specialized antigen-presenting cells which are required to involve naive T-lymphocytes into immune response. Dendritic cells are used in numerous research studies, and have also found practical application as a main component of dendritic cell vaccines. *In vitro* induction of their maturation from monocytes using cytokines is the most widely used method to obtain these cells. In present study, we compared phenotypes of both immature and mature dendritic cells induced from monocytes of adult healthy donors by means of recombinant cytokines provided by different manufacturers. It is shown that recombinant human IL-4 and GM-CSF supplied by *sci-store.ru* could effectively stimulate *in vitro* differentiation of human monocytes to immature monocytic dendritic cells. The resulting immature dendritic cells exhibited a typical morphology and phenotype characterized by the absence of CD14 monocyte marker as well as HLA-DR and CD80 costimulatory molecule expression. A fraction of these cells expressed the CD86 costimulatory molecule. The recombinant human IL-6 from *sci-store.ru*, when used in a mixture of inflammatory mediators (IL-6, IL-1 β , TNF α and PGE2), has induced effective terminal differentiation of immature dendritic cells to mature dendritic cells exhibiting typical morphology and phenotype. Virtually all dendritic cells obtained with this reagent were devoid of CD14, and expressed HLA-DR, CD80, CD83 and CD86 at high fluorescence intensity.

Keywords: dendritic cells, monocytes, cytokines, maturation, membrane molecules

Введение

Дендритные клетки (ДК) – это специализированные антигенпрезентирующие клетки миелоидного ряда кроветворения [10, 11, 13]. Они разделены на 2 основные группы – плазмоцитоподобные ДК и классические, или «обычные» (conventional) ДК, ранее называвшиеся миелоидными. Классические ДК являются наиболее активными антигенпрезентирующими клетками нашего организма, тогда как основной функцией плазмоцитоподобных ДК является продукция интерферонов 1 типа [2, 8, 14, 15]. Наиболее многочисленная субпопуляция классических ДК (у человека – CD1c⁺ ДК) созревает из циркулирующих в крови коммитированных предшественников [10, 11] и из моноцитов, причем в условиях воспаления моноциты становятся основным источником созревания ДК [4]. Классические ДК являются объектом многочисленных научных исследований, а также нашли практическое применение как основной компонент дендритноклеточных вакцин против патогенов и опухолевых клеток. Традиционным способом

получения ДК для клинического использования является индукция их созревания из моноцитов крови *in vitro* [9]. Для фундаментальных научных исследований в настоящее время все шире используют ДК, созревшие в организме и выделенные с помощью иммуномагнитной сепарации и клеточных сортеров [8]. Однако выделение этих клеток из крови или тканей является трудоемким и дорогостоящим процессом и часто не позволяет получить значительного количества клеток, необходимого для экспериментов, особенно если объектом исследования являются ДК человека. Поэтому ДК, полученные из моноцитов *in vitro*, остаются самым распространенным объектом исследований иммуностимулирующих или толерогенных функций ДК [3, 5], процессов их созревания и апоптоза [1], а также внутриклеточного сигналинга в ДК [7]. Моноцитарные ДК также используются в работах по фармакологии, направленных на поиск иммуностимулирующих препаратов и совершенствование вакцин [6].

До сих пор наиболее надежным методом получения моноцитарных ДК [5] является двухэтап-

ный способ стимуляции моноцитов, предложенный в 1994 г. Sallusto и Lanzavecchia [12]. На первом этапе этого метода из моноцитов получают незрелые ДК с помощью культивирования с интерлейкином-4 (IL-4) и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF). Полученные незрелые ДК обладают высокой способностью к захвату антигенов, но ограниченной способностью к их презентации. Незрелые ДК можно нагрузить антигенами и затем индуцировать их терминальное созревание, инкубируя с молекулярными паттернами патогенов или с провоспалительными цитокинами. Зрелые ДК утрачивают способность к фагоцитозу новых антигенов, но приобретают выраженную способность к презентации фагоцитированного ранее материала и стимуляции наивных Т-лимфоцитов к пролиферации и дифференцировке в зрелые Т-клетки эффекторы. Для выполнения этой функции дендритные клетки используют молекулы главного комплекса гистосовместимости и костимулирующие молекулы, которые в лабораторной практике применяются как маркеры зрелости ДК.

В данной работе незрелые и зрелые ДК получали из моноцитов крови взрослых здоровых доноров с использованием рекомбинантных цитокинов человека различных производителей, а затем сравнивали фенотип ДК, полученных с использованием этих реагентов.

Материалы и методы

ДК получали из моноцитов крови взрослых здоровых доноров. Для этого традиционным способом выделяли мононуклеарные клетки периферической крови и засеивали их в концентрации 4×10^6 клеток/мл в 24-луночные планшеты (Costar, США) в среде RPMI-1640 (Gibco, США) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА, Австрия). Через 2 ч лимфоциты тщательно смывали средой, контролируя чистоту удаления неприлипающих клеток с помощью микроскопии, а адгезировавшиеся клетки (моноциты) инкубировали в среде того же состава с добавлением цитокинов. Для индукции дифференцировки моноцитов в незрелые ДК в культуры добавляли рекомбинантные человеческие цитокины IL-4 и GM-CSF производства sci-store.ru или те же цитокины производства известного лидирующего американского производителя (компетитор). Референсные цитокины производства компетитора были выбраны нами ранее среди аналогичных продуктов нескольких зарубежных

производителей, как наиболее эффективные для получения ДК *in vitro*. Цитокины в культуры добавлялись дважды – при засеивании и на 3 сутки культивирования. Оба раза цитокины добавлялись в концентрациях: IL-4 – по 20 нг/мл, GM-CSF – по 100 нг/мл. Кроме того, в отдельном эксперименте мы получали незрелые ДК с использованием IL-4 и GM-CSF производства sci-store.ru в указанных выше концентрациях и в концентрациях, увеличенных в 1,5 раза. После 7 суток культивирования незрелые ДК собирали и оценивали экспрессию маркеров с помощью проточной лазерной цитометрии. Для иммунофлуоресцентной окраски использовали антитела к молекулам HLA-DR, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (Сорбент, Россия) и к молекулам CD14 (Сорбент, Россия), CD80, CD83 и CD86 (eBioscience, США), меченные фикоэритрином. Анализ проводили на лазерном проточном цитофлуориметре FacsCalibur (BD Biosciences, США). ДК гейтировали по параметрам прямого и бокового светорассеяния (FSC и SSC соответственно). При анализе результатов оценивали процент клеток, несущих соответствующий маркер, и геометрическую среднюю интенсивности их флуоресценции (GMFI) – параметр, зависящий от количества маркера на каждой клетке.

В других экспериментах для оценки действия рекомбинантного человеческого IL-6 (sci-store.ru) получали незрелые ДК описанным выше способом, а затем стимулировали их терминальное созревание смесями медиаторов воспаления следующего состава:

– смесь 1: 25 нг/мл IL-6 (sci-store.ru, Россия), 25 нг/мл IL-1 (R&D, США), 50 нг/мл фактора некроза опухоли- α (R&D, США) и 1 мкг/мл простагландина E2 (Sigma-Aldrich, США);

– смесь 2 аналогичного состава, но с использованием IL-6 производства компетитора.

После 2 суток инкубирования зрелые ДК собирали и оценивали фенотип описанным выше способом. Данные цитометрии обрабатывали с помощью программы CellQuest (BD Biosciences, США). Статистический анализ проводили с использованием t-теста Стьюдента. Данные в таблицах представлены как $M \pm m$.

Результаты

Оценка действия IL-4 и GM-CSF производства sci-store.ru, Россия

Инкубирование моноцитов с IL-4 и GM-CSF обоих производителей вызывало сходные морфологические изменения, типичные для созревания

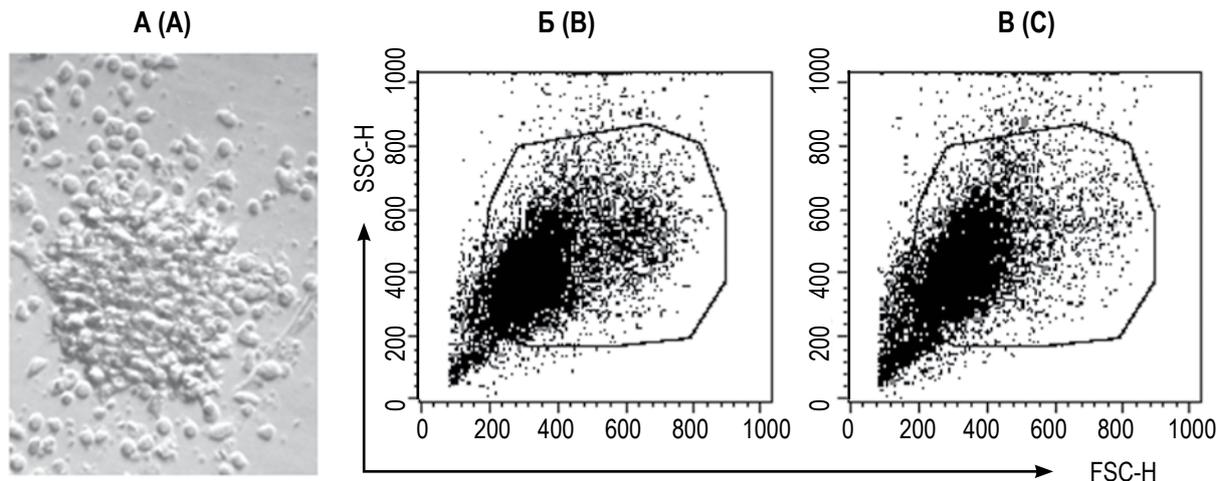


Рисунок 1. Вид культуры незрелых ДК, полученных с использованием IL-4 и GM-CSF производства sci-store.ru (А); прямое и боковое светорассеяние незрелых моноцитарных ДК, полученных с использованием IL-4 и GM-CSF производства sci-store.ru (Б) и компетитора (В)

Примечание. А – микроскопия с модуляционным контрастом Хоффмана; увеличение $\times 200$. Б и В – ДК выделены в гейт.

Figure 1. Culture of immature DCs obtained using IL-4 and GM-CSF from sci-store.ru (A). Forward and side light scattering of immature monocytic DCs obtained using IL-4 and GM-CSF from sci-store.ru (B) and a competitor (C)

Note. A, microscopy with Hoffmann modulation contrast; Increase $\times 200$. B and C, DCs are gated.

ДК. Клетки увеличивались в размерах и снижали свою адгезивность. В результате они приобретали округлую форму и собирались в крупные кластеры (рис. 1А). К концу культивирования (7 суток) все культуры обладали высокой жизнеспособностью ($> 95\%$). Выход клеток не различался. Распределение клеток по параметрам FSC/SSC при цитометрии также существенно не различалось, что свидетельствует о сходстве размеров и структуры клеток, полученных с использованием цитокинов разных производителей (рис. 1Б).

Оценка фенотипа ДК не выявила существенных различий между цитокинами разных производителей. Клетки, полученные с использованием цитокинов производства sci-store.ru и цитокинов производства компетитора, демон-

стрировали типичный фенотип незрелых ДК. Они экспрессировали молекулу главного комплекса гистосовместимости HLA-DR со средним уровнем интенсивности флуоресценции, были лишены моноцитарного маркера CD14, экспрессировали костимулирующую молекулу CD80. Часть клеток экспрессировала костимулирующую молекулу CD86. Экспрессия маркера зрелых ДК – молекулы CD83 – оставалась на низком уровне. Средние показатели экспрессии маркеров, полученные в 3 независимых экспериментах, приведены в таблице 1, гистограммы, отражающие экспрессию молекул на ДК, стимулированных различными цитокинами в репрезентативном эксперименте, – на рисунке 2.

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ МЕМБРАННЫХ МОЛЕКУЛ (%) НА НЕЗРЕЛЫХ ДК, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИТОКИНОВ РАЗЛИЧНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

TABLE 1. MEMBRANE MOLECULE EXPRESSION (%) ON IMMATURE DC OBTAINED WITH CYTOKINES OF DIFFERENT MANUFACTURERS

Производитель цитокинов Cytokine manufacturer	HLA-DR	CD14	CD80	CD83	CD86
sci-store.ru	96,9 \pm 3,49	1,35 \pm 0,18	81,52 \pm 12,83	9,87 \pm 2,88	46,89 \pm 12,82
компетитор competitor	97,8 \pm 0,59	0,95 \pm 0,10	84,0 \pm 9,05	10,27 \pm 0,85	41,98 \pm 10,32

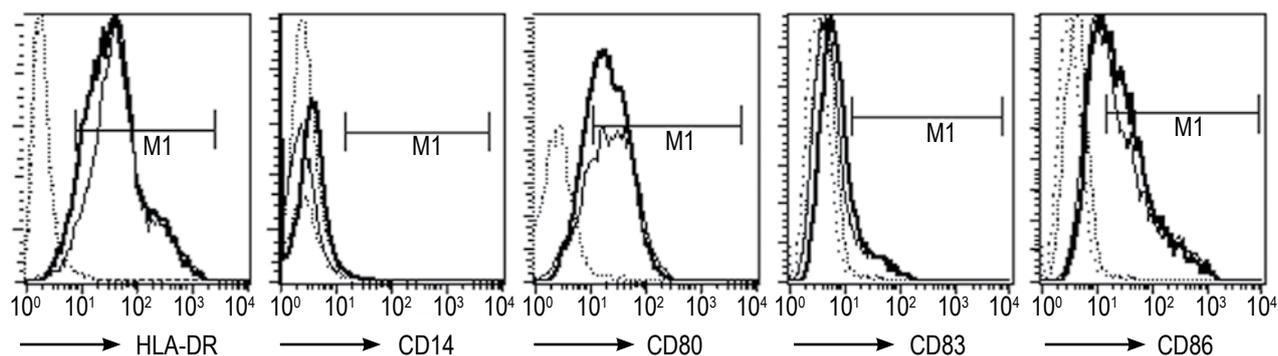


Рисунок 2. Сравнение экспрессии мембранных молекул на незрелых ДК, полученных с использованием IL-4 и GM-CSF производства sci-store.ru (толстые сплошные линии) и конкурента (тонкие линии)

Примечание. Пунктирные линии – негативные контроли окрашивания. Названия маркеров указаны под гистограммами.

Figure 2. Comparison of membrane molecule expression on immature DCs obtained using IL-4 and GM-CSF from sci-store.ru (thick solid lines) and a competitor (thin lines)

Note. Dotted lines, negative control of staining. The markers are indicated under the histograms.

Таким образом, цитокины двух производителей в равной степени эффективно стимулируют дифференцировку моноцитов в незрелые ДК с высокой жизнеспособностью, типичной морфологией и набором экспрессируемых мембранных молекул.

Увеличение концентрации цитокинов производства sci-store.ru в полтора раза не привело к существенному дополнительному приросту экспрессии исследуемых маркеров. Концентрации цитокинов 20 и 30 нг/мл для IL-4 и 100 и 150 нг/мл – для GM-CSF индуцируют практически полную утрату моноцитарного маркера CD14 и одинаково высокий уровень экспрессии типичных для ДК маркеров HLA-DR, CD80 и CD86 как по доле несущих маркер клеток, так и по интенсивности флуоресценции клеток (табл. 2). Следовательно, эти concentra-

ции лежат на «плато» дозовой зависимости, и для получения незрелых ДК можно рекомендовать традиционно используемые концентрации цитокинов производства sci-store.ru: 20 нг/мл для IL-4 и 100 нг/мл – для GM-CSF.

Оценка действия рекомбинантного IL-6 человека производства sci-store.ru

Инкубирование незрелых ДК со смесями провоспалительных медиаторов, содержащих IL-6 двух производителей, вызывало сходные морфологические изменения, типичные для терминального созревания ДК: дополнительное увеличение размера клеток и приобретение характерной отростчатой морфологии. Все культуры обладали высокой жизнеспособностью (> 95%). Распределение клеток по параметрам FSC/SSC при цитометрии существенно не различалось, что свидетельствует о сходстве размеров и структуры

ТАБЛИЦА 2. ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕЗРЕЛЫХ ДК, ПОЛУЧЕННЫХ СО СТАНДАРТНОЙ И ПОВЫШЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ IL-4 И GM-CSF ПРОИЗВОДСТВА sci-store.ru

TABLE 2. PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF IMMATURE DCs OBTAINED WITH STANDARD AND INCREASED CONCENTRATIONS OF IL-4 AND GM-CSF FROM sci-store.ru

Концентрация цитокинов Cytokine concentration	HLA-DR		CD14	CD80		CD83		CD86	
	%	GMFI	%	%	GMFI	%	GMFI	%	GMFI
Стандартная Standard	99,9	145	1,2	98,4	74,9	12,8	36,2	60,2	44,2
Повышенная Increased	98,3	132,7	1,1	98,6	85,0	13,2	27,0	62,4	46,2

ТАБЛИЦА 3. ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗРЕЛЫХ ДК, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ IL-6 ПРОИЗВОДСТВА sci-store.ru

TABLE 3. PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF MATURE DCs OBTAINED USING IL-6 FROM sci-store.ru

Производитель IL-6 Manufacturer of IL-6	HLA-DR		CD14	CD80		CD83		CD86	
	%	GMFI	%	%	GMFI	%	GMFI	%	GMFI
sci-store.ru	99,85 ±0,05	430,3 ±33,3	1,0	99,22 ±0,25	189,0 ±10,3	92,45 ±1,53	50,4 ±2,4	98,52 ±0,05	838,2 ±54,0
компетитор competitor	99,71 ±0,12	375,2 ±12,6	0,7	98,9 ±0,63	210,9 ±11,8	90,33 ±1,79	49,3 ±1,7	99,33 ±0,05	905,1 ±48,5

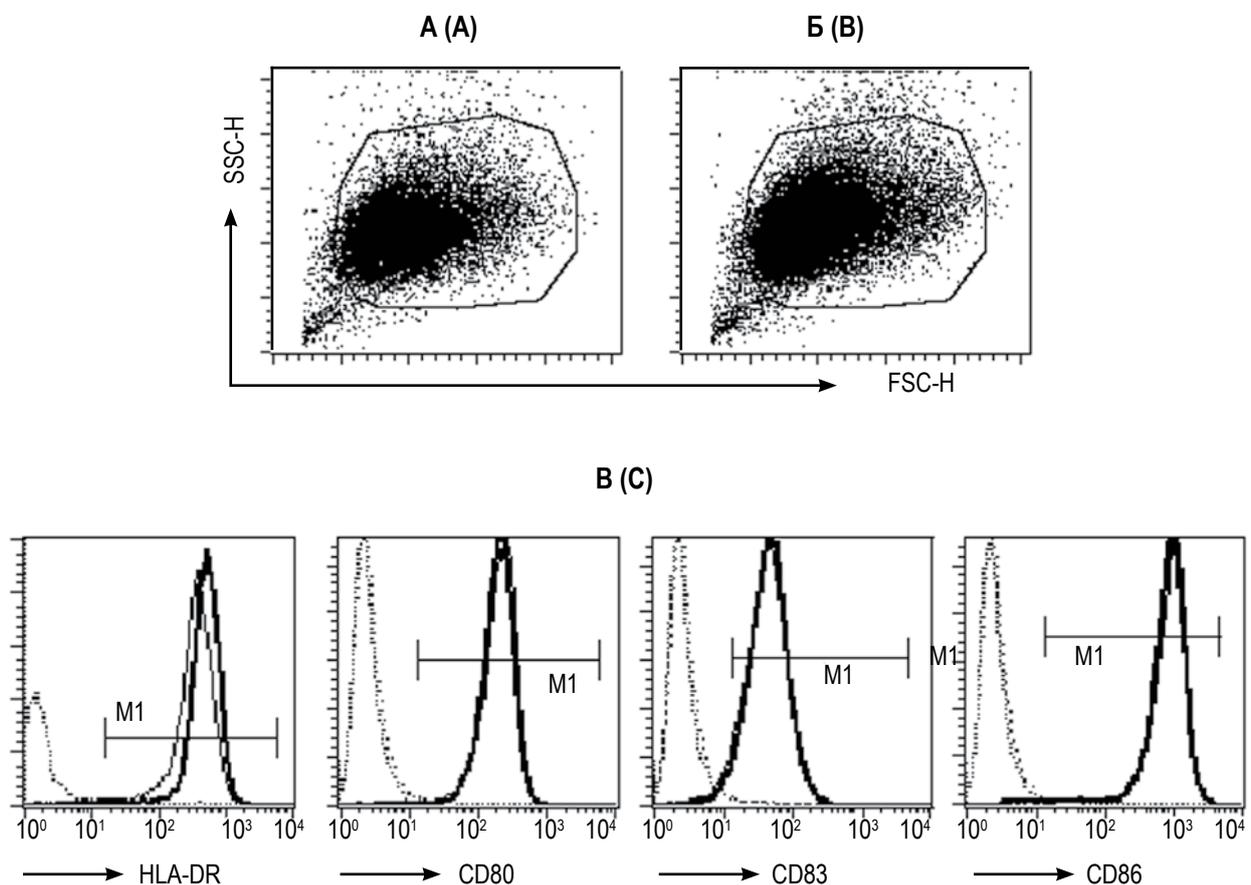


Рисунок 3. Характеристика зрелых ДК, полученных с использованием цитокинов различных производителей
Примечание. Прямое и боковое светорассеяние зрелых ДК, полученных с использованием смеси провоспалительных медиаторов с IL-6 производства sci-store.ru (А) и конкурента (Б). ДК выделены в гейт. В – фенотип зрелых ДК, полученных с использованием IL-6 производства sci-store.ru (толстые сплошные линии) и конкурента (тонкие линии) в составе смеси провоспалительных медиаторов. Пунктирные линии – негативные контроли. Названия маркеров указаны под гистограммами.

Figure 3. Characteristics of mature DCs obtained using cytokines from different manufacturers
Note. Forward and side light scattering of mature DCs obtained using a mixture of proinflammatory mediators with IL-6 manufactured by sci-store.ru (A) and a competitor (B). DCs are gated. C, The phenotype of mature DCs obtained using IL-6 from sci-store.ru (thick solid lines) and competitor (thin lines) in a mixture of proinflammatory mediators. Dotted lines, negative control. The markers are indicated under the histograms.

клеток, полученных с использованием цитокинов разных производителей (рис. 3).

Анализ экспрессии маркеров ДК также не выявил различий между культурами, полученными с использованием IL-6 различных производителей. Все клетки демонстрировали типичный фенотип зрелых ДК, характеризующийся отсутствием моноцитарного маркера CD14, наличием молекул HLA-DR, CD80, CD83 и CD86 практически на всех клетках, а также большими значениями GMFI для этих молекул, что свидетельствует о высокой плотности их экспрессии (табл. 3). На рисунке 3 представлен пример фенотипа зрелых ДК и сравнение действия смесей провоспалительных медиаторов с IL-6 производства sci-store.ru и компетитора. Отмечается практически полное совпадение профиля флуоресценции окрашенных молекул CD80, CD83 и CD86 на сравниваемых ДК и незначительное повышение показателя GMFI окрашенной мо-

лекулы HLA-DR на ДК, полученных с использованием IL-6 sci-store.ru, по сравнению с IL-6 компетитора.

Заключение

Рекомбинантные белки человека IL-4 и GM-CSF производства sci-store.ru эффективно стимулируют дифференцировку моноцитов человека в незрелые моноцитарные дендритные клетки в условиях *in vitro*. Полученные незрелые дендритные клетки демонстрируют типичную морфологию и фенотип. Рекомбинантный белок человека IL-6 производства sci-store.ru в составе смеси медиаторов воспаления, состоящей из IL-6, IL-1 β , фактора некроза опухоли- α и простагландина E2, эффективно стимулирует терминальную дифференцировку незрелых дендритных клеток в зрелые дендритные клетки с характерной морфологией и фенотипом.

Список литературы / References

1. Талаев В.Ю., Заиченко И.Е., Матвейчев А.В., Талаева М.В., Воронина Е.В. Регуляция апоптоза в процессе созревания дендритных клеток – приглашение на казнь // Иммунология, 2016. Т. 37, № 5. С. 281-291. [Talayev V.Yu., Zaichenko I.E., Matveichev A.V., Talayeva M.V., Voronina E.V. Regulation of apoptosis during dendritic cell maturation – invitation to an execution. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 5, pp. 281-291. (In Russ.)]
2. Colonna M., Trinchirelli G., Liu Y.J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.*, 2004, Vol. 5, no. 12, pp. 1219-1226.
3. Guermontprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Thery C., Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 20, pp. 621-667.
4. Ingersoll M.A., Platt A.M., Potteaux S., Randolph G.J. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.*, 2011, Vol. 32, no. 10, pp. 470-477.
5. Kalantari T., Kamali-Sarvestani E., Ciric B., Karimi M.H., Kalantari M., Faridar A., Xu H., Rostami A. Generation of immunogenic and tolerogenic clinical-grade dendritic cells. *Immunol. Res.*, 2011, Vol. 51, no. 2-3, pp. 153-160.
6. Kamgang R.K., Ramos I., Duarte L.R., Ghielmetti M., Freudenberg M., Dahinden C., Padovan E. Using distinct molecular signatures of human monocytes and dendritic cells to predict adjuvant activity and pyrogenicity of TLR agonists. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2008, Vol. 197, pp. 369-379.
7. Kawai T., Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2008, Vol. 1143, pp. 1-20.
8. Merad M., Sathe P., Helft J., Miller J., Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 563-604.
9. Naik S.H. Dendritic cell protocols. New York: Humana Press, 2010, p. 446.
10. Naik S.H., Sathe P., Park H.Y., Metcalf D., Proietto A.I., Dakic A., Carotta S., O'Keeffe M., Bahlo M., Papenfuss A., Kwak J.Y., Wu L., Shortman K. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 11, pp. 1217-1226.
11. Onai N., Obata-Onai A., Schmid M.A., Ohteki T., Jarrossay D., Manz M.G. Identification of clonogenic common Flt3⁺M-CSFR⁺ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 11, pp. 1207-1216.
12. Sallusto F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.*, 1994, Vol. 179, no. 4, pp. 1109-1118.

13. Steinman R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, Vol. 9, pp. 271-296.
14. Wu L., Dakic A. Development of dendritic cell system. *Cell. Mol. Immunol.*, 2004, Vol. 1, no. 2, pp. 112-118.
15. Wu L., Liu Y-J. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*, 2007, Vol. 26, pp. 741-750.

Авторы:

Талаев В.Ю. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточной иммунологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Талаева М.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Воронина Е.В. — младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Заиченко И.Е. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Authors:

Talayev V. Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Cellular Immunology, Nizhny Novgorod Research I.N. Blokhin Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Talayeva M. V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology, Nizhny Novgorod Research I.N. Blokhin Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Voronina E. V., Junior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology, Nizhny Novgorod Research I.N. Blokhin Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Zaichenko I. E., PhD (Biology), Leading Research Associate Laboratory of Cellular Immunology, Nizhny Novgorod Research I.N. Blokhin Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Поступила 17.08.2017
Отправлена на доработку 25.09.2017
Принята к печати 30.11.2017

Received 17.08.2017
Revision received 25.09.2017
Accepted 30.11.2017

РАЗРАБОТКА ПОРЯДКА АТТЕСТАЦИИ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА МЕТИОНИОВОЙ ФОРМЫ ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2b ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ МЕТОДОМ ПЕПТИДНОГО КАРТИРОВАНИЯ

**Устинникова О.Б., Голощапова Е.О., Рунова О.Б., Коротков М.Г.,
Волкова Р.А.**

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

Резюме. Оценка подлинности белков, полученных с помощью технологии рекомбинантной ДНК, является важным этапом подтверждения эффективности и безопасности препаратов, созданных на их основе. Один из основных способов оценки подлинности заключается в сравнении структур молекул испытуемого и стандартного образца с помощью метода пептидного картирования с хроматографическим разделением продуктов ферментализации. В получении достоверных результатов существенную роль играет выбор стандартного образца сравнения. Для субстанции интерферона альфа-2b, содержащей N-концевой метионин, использование образца Interferon CRS (Chemical Reference Substances), рекомендованного Европейским управлением по качеству лекарственных средств, не корректно, поскольку данная субстанция является безметиониновой.

В данной работе представлены результаты разработки порядка аттестации отраслевого стандартного образца (ОСО) метиониновой формы интерферона альфа-2b. Область применения данного ОСО – подтверждение подлинности метиониновой формы субстанции интерферона альфа-2b методом пептидного картирования с обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией.

На начальном этапе аттестации, в связи с изменением области применения субстанции-кандидата ОСО, была изменена форма ее выпуска и проведена оценка качества по всем показателям, предусмотренным спецификацией производителя. Далее в условиях воспроизводимости по валидированной методике ВЭЖХ (с предварительным трипсинолизом белка) было получено 30 пептидных карт кандидата в ОСО.

Было показано, что условия гидролиза, а именно выбор трипсина, существенно влияют на профиль пептидной карты. Таким образом, в описании условий применения ОСО должно быть приведено указание на конкретного производителя и номер по каталогу данного реагента.

На основании анализа пептидных карт и результатов масс-спектрометрии высокого разрешения было приведено обоснование выбора 8-ми реперных пиков (пиков сравнения). В качестве основного пика с установленным абсолютным временем удерживания был выбран пик с максимально стабильным выходом и интенсивностью. В качестве обязательных для оценки пиков с относительными временами удерживания были выбраны 2 пика: пик, содержащий N-концевой метионин, и пик наи-

Адрес для переписки:

*Устинникова Ольга Борисовна
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств
медицинского применения» Министерства
здравоохранения РФ
127051, Россия, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2
Тел.: 8 (499) 241-70-69.
E-mail: ustinnikova@expmed.ru*

Address for correspondence:

*Ustinnikova O.B.
Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological
Products
127051, Russian Federation, Moscow, Petrovsky blvrd, 8,
bldg 2.
Phone: 7 (499) 241-70-69.
E-mail: ustinnikova@expmed.ru*

Образец цитирования:

*О.Б. Устинникова, Е.О. Голощапова, О.Б. Рунова,
М.Г. Коротков, Р.А. Волкова «Разработка порядка
аттестации стандартного образца метиониновой формы
интерферона альфа-2b для подтверждения подлинности
методом пептидного картирования» // Медицинская
иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 543-550.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-543-550*

© Устинникова О.Б. и соавт., 2018

For citation:

*O.B. Ustinnikova, E.O. Goloshchapova, O.B. Runova,
M.G. Korotkov, R.A. Volkova "Development of a qualification
procedure for methionine form of interferon alfa-2b standard to
confirm its authenticity by means of a peptide mapping method",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2018, Vol. 20, no. 4, pp. 543-550.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-543-550*

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-543-550

большей молекулярной массы с установленной аминокислотной последовательностью, составляющей около 11% покрытия молекулы интерферона.

Установлены аттестованные характеристики ОСО в виде диапазонов абсолютного (для 1-го реперного пика) и относительных (для остальных реперных пиков) времен удерживания.

Возможность использования разработанного ОСО для оценки подлинности метиониновых интерферонов альфа-2b была подтверждена методом пептидного картирования в сравнении со стандартом CRS: изученные пики совпали, за исключением пика, соответствующего пептиду, содержащему N-концевой метионин, выявленный в результате масс-спектрометрии высокого разрешения.

Ключевые слова: субстанция, интерферон альфа-2b, подлинность, пептидное картирование, стандартный образец

DEVELOPMENT OF A QUALIFICATION PROCEDURE FOR METHIONINE FORM OF INTERFERON ALFA-2b STANDARD TO CONFIRM ITS AUTHENTICITY BY MEANS OF A PEPTIDE MAPPING METHOD

Ustinnikova O.B., Goloshchapova E.O., Runova O.B., Korotkov M.G., Volkova R.A.

Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products, Moscow, Russian Federation

Abstract. Authenticity evaluation of proteins obtained with recombinant DNA technology is an important step in confirming efficacy and safety of the drugs based on them. One of the main ways to assess the authenticity is to compare molecular structure of the test and standard samples using the peptide mapping method with chromatographic separation of the products obtained by enzymatic degradation. Proper selection of a standard reference sample is essential in order to achieve reliable results. A standard sample of Interferon (CRS, Chemical Reference Substances) recommended by the European Agency for the Quality of Medicines for interferon alpha-2b substances containing N-terminal methionine is inappropriate, since the Interferon CRS sample doesn't contain methionine. We present the results of development of qualification procedure for methionine form of Interferon alfa-2b industrial standard sample (ISS). The range of use for this ISS is authenticity confirmation for the methionine form of interferon alpha-2b substance using peptide mapping method with reverse-phase high-performance liquid chromatography (reverse-phase HPLC). The quality assessment was performed for all the parameters specified by the manufacturer of this candidate substance at the initial stage of qualification procedure, due to changed application area, and changed package size. Further, 30 peptide cards of the ISS candidate substance were obtained after pre-trypsinolysis of the protein followed by validated HPLC method with proven repeatability.

It was shown that the hydrolysis conditions, i.e., the choice of trypsin preparations, may significantly affect the peptide map profile. Therefore, a reference to specific manufacturer and the catalog number of the product should be provided in description of application conditions for the ISS proposed.

A set of eight reference peaks (peaks of comparison) has been justified, as based on evaluation of peptide maps and results of high-resolution mass spectrometry. The peak with maximally stable yield and intensity was selected as the main peak with an established absolute retention time. Two peaks with relative retention times were chosen as essential peaks for evaluation, i.e., the 1st peak containing N-terminal methionine, and the 2nd peak of highest molecular weight with an established amino acid sequence covering 11% of the studied interferon molecule.

We have also qualified ISS parameters expressed as absolute (minimum for one reference peak), and relative (for the remaining reference peaks) retention time periods. Authenticity of the ISS candidate was further confirmed by the peptide mapping method, as compared with interferon CRS reference standard. Their peak patterns proved to be near-similar, except of a peak with eluted peptide containing N-terminal methionine as revealed by high-resolution mass spectrometry.

Keywords: substance, interferon alfa-2b, authenticity, peptide mapping, standard sample

Введение

Интерфероны (IFN) – белки, относящиеся к группе цитокинов. Основные биологические свойства интерферонов проявляются в их противовирусном, иммуномодулирующем и противоопухолевом действии [3].

Противовирусный эффект интерферонов заключается в подавлении синтеза вирусной РНК и белков оболочки вируса, иммуномодулирующий эффект – в способности регулировать взаимодействие клеток, участвующих в иммунном ответе, противоопухолевый эффект связан со способностью замедлять или подавлять рост культуры клеток и активировать противоопухолевые механизмы иммунной системы [5, 9].

Наиболее широкое применение получили препараты рекомбинантного интерферона альфа-2b – негликозилированного белка с молекулярной массой около 19240 кДа. Молекула интерферона альфа-2b состоит из 165 аминокислот, N-концевым аминокислотным остатком является цистеин, связанный дисульфидной связью с 98 цистеином (рис. 1) [10].

Поскольку синтез белка рибосомой бактериальной клетки инициируется АТГ-кодоном и N-конец бактериального белка представлен формилметионином, а эффективная экспрессия рекомбинантного белка в системах прокариот приводит к накоплению в клетках большого количества белка, в результате чего отщепление формилметионина идет неэффективно, рекомбинантный белок может содержать дополнительный метионин на N-конце молекулы [8, 12].

Таким образом, в зависимости от технологии и условий производства возможно получение как безметиониновой формы интерферона альфа-2b (идентичной эндогенному), так и его метиониновой формы, где N-концевым аминокислотным остатком является метионин. В настоящее время в Российской Федерации зарегистрированы семь субстанций рекомбинантного интерферона альфа-2b: четыре метиониновые и три безметиониновые формы.

Согласно Европейской фармакопее физико-химические показатели качества, подтверждающие подлинность и чистоту субстанции IFN α -2b оценивают в сравнении с безметиониновой субстанцией интерферона альфа-2b – Interferon CRS (Chemical Reference Substances), рекомендованной Европейским управлением по качеству лекарственных средств (the European Directorate for the Quality of Medicines) (EDQM) [10].

Одним из основных методов подтверждения подлинности структуры белка, полученного в результате воспроизведения технологии рекомбинантной ДНК, является метод пептидного картирования (ВЭЖХ) [4]. Условием признания подлинности анализируемой субстанции является принципиальное совпадение пептидных карт испытуемого и стандартного образцов, полученных в ходе одного хроматографического цикла, а также наличие на хроматограмме испытуемого образца характеристических (реперных) пиков, установленных для стандартного образца.

В связи со структурными различиями метиониновой и безметиониновой форм IFN использование при анализе метиониновой субстанции в качестве образца сравнения IFN CRS не корректно, а разработка и аттестация отраслевого стандартного образца для оценки качества метиониновой формы рекомбинантного интерферона альфа-2b методом пептидного картирования представляется актуальной задачей [4].

На основании результатов теоретического анализа нормативной документации на отечественные метиониновые субстанции интерферона альфа-2b в качестве кандидата в СОС была выбрана субстанция с наиболее полной оценкой качества [6].

Материалы и методы

Методы

1. Метод пептидного картирования с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ): хроматографическая колонка YMC размером 100 × 4,6 мм, заполненная октадецилсилил (C18) модифицированным силикагелем, диаметр ча-

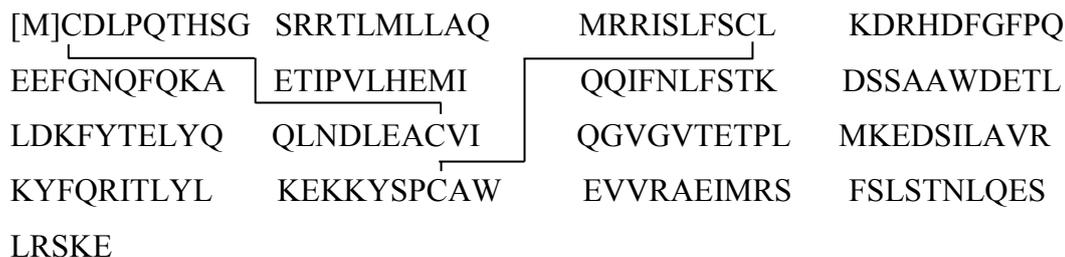


Рисунок 1. Аминокислотная последовательность интерферона альфа-2b

Figure 1. Formula of interferon alfa-2b

стиц 5 мкм, размер пор 300А (температура колонки 30 °С); спектрофотометрический детектор (длина волны 214 нм); градиентный режим с использованием двух подвижных фаз. Фаза 1: 0,1% трифторуксусная кислота в воде. Фаза 2: 0,1% трифторуксусная кислота в ацетонитриле-воде, 9:1. Скорость потока 1 мл/мин.

2. Метод масс-спектрометрии высокого разрешения: нанопоточный хроматограф с обращенно-фазовой колонкой на основе С18 с электроспреемным эмитером; tandemный масс-спектрометр LTQ FT Ultra в 2-стадийном режиме автоматического измерения спектров. На первой стадии в ИЦР ячейке масс-спектрометра измерялись точные массы пептидов в диапазоне m/z 300–1600 с разрешением $R = 50\,000$ для m/z 400 (число ионов в ячейке ИЦР 5×10^6). На второй стадии в линейной ионной ловушке детектировали ионы фрагментов образующихся при столкновительно-индуцированной фрагментации (CID) пяти пиков с максимальной интенсивностью. Контроль результатов ВЭЖХ-МС проводили с помощью программы QualBrowser. С помощью программы Raw2msm из масс-хроматограмм были получены списки точных масс пептидов и масс их фрагментов и использованы для поиска и идентификации белков по базе данных при помощи программы Mascot.

III. При расчете результатов использовали статистические методы анализа:

среднее арифметическое вычисляли по формуле

$$X_{\text{ср}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i \quad [1]$$

стандартное отклонение S определяли по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - X_{\text{ср}})^2} \quad [2]$$

Материалы

1. Исследуемый образец – кандидат в СО: субстанция интерферона альфа-2b (метиониновая форма) производства ООО «Фармапарк».

2. Стандартный образец предприятия интерферона альфа-2b производства ООО «Фармапарк» (метиониновая форма), серия 220915.

3. Международный стандарт интерферона альфа-2b CRS от EDQM, кат № I0320301, серия 6.0.

4. Трипсин-1. Производитель Sigma-Aldrich, кат № 8658, серия SLBB2403V (активность 8868 ЕД/мг).

5. Трипсин-2. Производитель Sigma-Aldrich, кат № 8658, серия SLBL8393V (активность 9146 ЕД/мг).

6. Трипсин-3. Производитель ПанЭко, кат №П052, серия 3094С216 (активность 3203 ЕД/мг)

7. Трипсин-4. Производитель Sigma-Aldrich, кат № 1426, серия SLB F1700V (активность 13165 ЕД/мг).

8. Образцы для МС. 8 фракций объемом 100–200 мкл, полученные в результате трипсинолиза и последующего хроматографического разделения кандидата в СО. Состав фракции: 0,5–1 мкг пептида в элюэнте (4,5% об. до 45% об. ацетонитрила в воде с добавлением трифторуксусной кислоты с содержанием 0,06% об.)

Результаты и обсуждение

В качестве начального этапа разработки СО метиониновой формы интерферона альфа-2b был проведен анализ всех показателей качества кандидата в СО в соответствии со спецификацией. Анализ подтвердил соответствие данной субстанции установленным требованиям [7, 10].

Кроме того, для удобства применения была изменена форма выпуска субстанции: вместо флаконов вместимостью от 2 до 250 мл или стерильных контейнеров вместимостью от 5 до 125 мл из полиэтилентерефталатгликоля, предусмотренных нормативной документацией, были выбраны стерильные полипропиленовые криобирки вместимостью 1 мл, соответствующие требованиям USP VI. Объем розлива составил 0,5 мл.

Для аттестации СО, применяемого при контроле качества биологических лекарственных препаратов, как правило, используется та же методика, для которой предназначен СО. Таким образом, характеристика СО, по сути, это комплекс образца и методики [1].

Аттестация СО для определения подлинности рекомбинантного интерферона методом пептидного картирования (ВЭЖХ) не является исключением и предполагает использование вышеуказанного метода. Основным фактором, влияющим на стабильность получаемых результатов, является стадия ферментативного гидролиза (трипсинолиза). Для выявления возможного влияния различных производителей и серий трипсина на хроматографический профиль пептидной карты был проведен ряд анализов с использованием 4-х различных трипсинов. При воспроизведении единой для всех схемы эксперимента были задействованы 4 оператора и 4 хроматографа из двух лабораторий. В результате были получены 30 хроматограмм: 8 хроматограмм с трипсином-1; 9 хроматограмм с трипсином-2; 8 хроматограмм с трипсином-2; 8 хроматограмм с трипсином-3 и 5 хроматограмм с трипсином-4 (рис. 2–5).

Как следует из представленных рисунков, для пептидных карт с трипсинами 1 и 2 характерен стабильный профиль, позволяющий выделить 8 характеристических, хорошо разрешенных пиков (пик 1 – время удерживания

около 22,5 мин, пик 2 – время удерживания около 26,9 мин, пик 3 – время удерживания около 32,7 мин, пик 4 – время удерживания около 35,4 мин, пик 5 – время удерживания около 36,3 мин, пик 6 – время удерживания около 36,7 мин, пик 7 – время удерживания около 49,6 мин, пик 8 – время удерживания около 54,8 мин).

При использовании трипсина-3 и -4 профили пептидных карт были менее стабильны, полученные пики имели кластерную форму (трипсин-3), смещены, более интенсивны и хуже разрешены в диапазоне времен удерживания 33,817–38,236 (трипсин-4).

Кластерная форма пиков, характерная для трипсина-3, предположительно обусловлена недостаточной степенью гидролиза белка, связанной с низкой исходной активностью данного фермента (3203 ЕД/мг). Интенсивность и смещение центральных пиков на пептидной карте трипсина-4 по сравнению с трипсинами-1 и -2, напротив, могут быть вызваны более глубокой степенью гидролиза (активность трипсина-4 –

13165 ЕД/мг). Поскольку основное требование к пептидной карте – это ее информативность (наличие характерных пептидов), слишком большое количество фрагментов и более глубокое расщепление могут привести к потере специфичности. Таким образом, специфичность пептидной карты, полученной с применением трипсина-4, требует дополнительного исследования.

Таким образом, порядок аттестации СО, а также инструкция к его применению должны содержать информацию не только о производителе трипсина, но и указание конкретного каталожного номера данного реагента.

Процедура применения СО интерферона для пептидного картирования, в качестве подтверждения стабильности хроматографической системы, предполагает наличие установленных реперных (характеристических) пиков, 1 из которых должен быть охарактеризован по абсолютному времени удерживания, а минимум 4 пика охарактеризованы по относительному времени удерживания. Выбор данных пиков должен быть

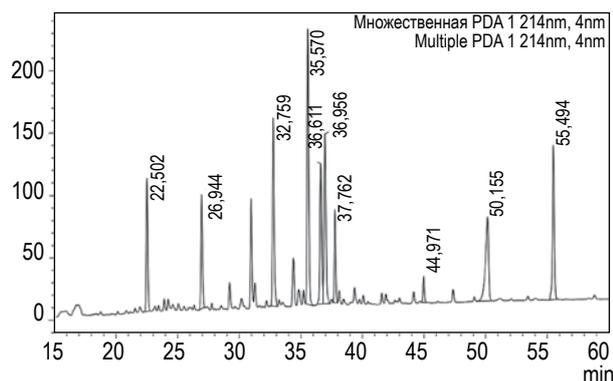


Рисунок 2. Типичная хроматограмма, получаемая с трипсином-1

Figure 2. A typical chromatogram obtained with the trypsin-1

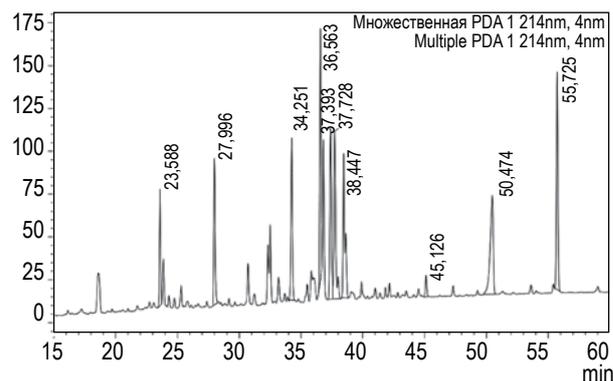


Рисунок 3. Типичная хроматограмма, получаемая с трипсином-2

Figure 3. A typical chromatogram obtained with the trypsin-2

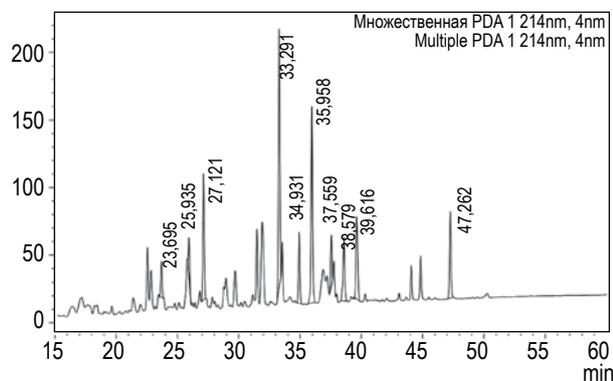


Рисунок 4. Типичная хроматограмма, получаемая с трипсином-3

Figure 4. A typical chromatogram obtained with the trypsin-3

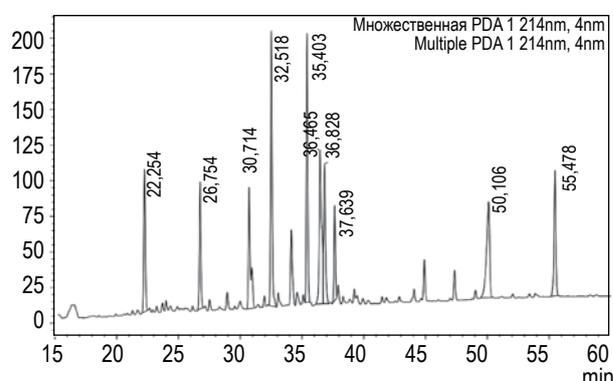


Рисунок 5. Типичная хроматограмма, получаемая с трипсином-4

Figure 5. A typical chromatogram obtained with the trypsin-4

ТАБЛИЦА 1. АБСОЛЮТНОЕ И ОТНОСИТЕЛЬНОЕ ВРЕМЯ УДЕРЖИВАНИЯ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИХ ПИКОВ

TABLE 1. ABSOLUTE AND RELATIVE RETENTION TIMES OF THE CHARACTERISTIC PEAKS

Пик Peak	Абсолютное время удерживания, мин Absolute retention time, min	Относительное время удерживания Relative retention time
1	–	0,61-0,66
2	–	0,74-0,78
3	–	0,90-0,95
4	33,8-37,0	–
5	–	1,02-1,03
6	–	1,03-1,04
7	–	1,37-1,43
8	–	1,51-1,59

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПИКОВ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

TABLE 2. THE RESULTS OF THE STUDY THE AMINO ACID SEQUENCE OF PEAKS BY MASS SPECTROMETRY

Пик Peak	Фрагмент последовательности Fragment of the sequence	Аминокислотная последовательность пептида Amino acid sequence of the peptide
1	146-150	AEIMR
2	1-8	MCDLPQTH
3	136-141	YSPCAW
4	72-84	DSSAAWDETLDDK
5	33-50	DRHDFGFPQEEFGNQFQK
6	35-50	HDFGFPQEEFGNQFQK
7	51-65	AETIPVLHEMIQQIF
8	85-113	FYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMK

обоснован, а времена удерживания в данном случае можно рассматривать как аттестуемые характеристики стандартного образца.

Поскольку наиболее информативными являются хроматограммы, полученные с трипсином-1 и -2, полученные результаты были объединены в одну выборку и проанализированы с помощью статистических расчетов: стандартное отклонение для абсолютных времен удерживания 8-ми характеристических пиков при $n = 17$ составило 0,87; 0,78; 1,05; 0,79; 0,77; 0,77; 0,80 и 0,85 соответственно. Таким образом, наиболее стабильными являются пики 2, 4, 5 и 6, из которых пик 4 обладает наибольшей интенсивностью и может рассматриваться в качестве основного пика, охарактеризованного по абсолютному времени удерживания.

Характеристики реперных пиков были рассчитаны как среднее арифметическое абсолютного и относительного времен удерживания (при

$n = 17$) + 2 СКО и представлены в виде диапазона минимума и максимума (табл. 1).

Для обоснования выбора реперных пиков, помимо стабильности выхода, интенсивности и удовлетворительного разрешения, необходима характеристика отдельных пептидов [11]. Наиболее информативным исследованием в данном случае является определение аминокислотной последовательности пептидов методом масс-спектрометрии высокого разрешения с последующим покрытием известной последовательности белка (табл. 2).

В результате анализа с помощью масс-спектрометрии получаемых в процессе гидролиза пептидов было подтверждено 56% аминокислотной последовательности кандидата в СО. При этом второй пик характеризует N-концевую последовательность метионинового белка, а 8 пик характеризует наибольший участок молекулы (29 АК).

ТАБЛИЦА 3. ВРЕМЕНА УДЕРЖИВАНИЯ ОСНОВНЫХ ПИКОВ НА ХРОМАТОГРАММАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ДЛЯ МЕЖДУНАРОДНОГО СТАНДАРТА CRS И КАНДИДАТА В ОСО

TABLE 3. RETENTION TIMES OF THE MAJOR PEAKS OBTAINED FOR INTERNATIONAL STANDARD CRS AND CANDIDATE TO INDUSTRY STANDARD

Пик Peak	Стандарт CRS, время удерживания (мин) International standard CRS Retention times (min)	Кандидат в ОСО, время удерживания (мин) Candidate to industry standard Retention times (min)
1	21,696	21,723
2	22,500	26,008
3	30,224	30,220
4	31,895	31,896
5	34,482	34,472
6	35,451	35,448
7	35,776	35,769
8	36,519	36,513
9	48,672	48,664
10	53,904	53,892

Также в ходе работы был проведен сравнительный анализ пептидных карт кандидата в СО и международного стандарта интерферона альфа-2b CRS. Результаты представлены в таблице 3.

На полученных хроматограммах время удерживания первого пика и времена удерживания основных пиков кандидата в СО в диапазоне 30-55 минут практически совпадают с временами удерживания основных пиков стандарта CRS, а профиль минорных пиков не содержит принципиальных расхождений. При этом наблюдается различие времен удерживания второго пика в диапазоне 22-27 мин, обусловленное N-концевым метионином.

Полученные результаты позволяют сделать вывод об идентичности молекул кандидата в СО и стандарта CRS за исключением области N-конца интерферона альфа-2b и возможности его использования для оценки подлинности метиониновых интерферонов альфа-2b.

Заключение

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод о том, что разработанный порядок аттестации ОСО метионинового интерферона альфа-2b должен состоять из следующих этапов:

1. Выбор формы выпуска ОСО.
2. Оценка качества кандидата в ОСО по всем показателям качества в соответствии с нормативной документацией.
3. Получение не менее 15-ти пептидных карт кандидата в СО в условиях воспроизводимости [2] по валидированной методике ВЭЖХ,

с предварительным гидролизом белка трипсином Sigma-Aldrich, кат № 8658.

4. Выбор реперных пиков на основании анализа пептидных карт и результатов масс-спектрометрического исследования.

5. Установление аттестованной характеристики СО в виде абсолютного (минимум для 1-го реперного пика) и относительных (для остальных реперных пиков) времен удерживания.

6. Подтверждение подлинности кандидата в СО методом пептидного картирования в сравнении со стандартом CRS.

7. В инструкции по применению ОСО должны быть указаны производитель и каталожный номер трипсина, с которым проводилась аттестация, а также 4 пика для оценки пригодности хроматографической системы.

Проведенные исследования позволили аттестовать 8 реперных пиков. Из них в качестве обязательных пиков могут быть указаны пик 4 (основной), а также пик 2, характеризующий N-концевой метионин, и пик 8, как пик с наибольшей молекулярной массой, составляющей около 11% покрытия молекулы интерферона. Четвертым пиком может быть любой из оставшихся аттестованных пиков, выбор которого может быть сделан производителями субстанций метионинового интерферона альфа-2b.

Авторы выражают благодарность фармацевтической компании ООО «Фармапарк» за методическую поддержку при проведении экспериментов и участие в обсуждении результатов.

Список литературы / References

1. Бондарев В.П., Борисевич И.В., Волкова Р.А., Фадейкина О.В. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов // Вестник научного центра экспертизы средств медицинского применения, 2013. Т. 2. С. 28-32. [Bondarev V.P., Borisevich I.V., Volkova R.A., Fadeykina O.V. The problems of certification of industry standard samples for quality control of immunobiological medicinal products. *Vedomosti nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical Applications*, 2013, Vol. 2, pp. 28-32. (In Russ.)]
2. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 [GOST R ISO 5725-1-2002].
3. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. 356 с. [Ershov F.I., Kiselev O.I. Interferons and their inducers (from molecules to drugs)]. Moscow: GEOTAR-Media, 2005. 356 p.
4. Климов В.И., Саканян Е.И., Волкова Р.А., Фадейкина О.В., Мовсесянц А.А., Лебединская Е.В., Шестакова А.П. Анализ потребностей в стандартных образцах, предназначенных для оценки качества биологических лекарственных средств // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2017. Т. 17, № 2. С. 87-92. [Klimov V.I., Sakanyan E.I., Volkova R.A., Fadeykina O.V., Movsesyants A.A., Lebedinskaya E.V., Shestakova A.P. Analysis of requirements for standard samples intended to assess the quality of biological medicinal products. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2017, Vol. 17, no. 2, pp. 87-92. (In Russ.)]
5. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. Интерфероны в теории и практике медицины. М.: Медицина, 1981. 400 с. [Soloviev V.D., Bektemirov T.A. Interferons in theory and practice of medicine]. Moscow: Medicine, 1981. 400 p.
6. Устинникова О.Б., Рунова О.Б., Голощапова Е.О., Корсун Л.В. Теоретическое обоснование выбора субстанции интерферона альфа-2b для аттестации в качестве стандартного образца для оценки подлинности методом пептидного картирования // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2016. Т. 16, № 3. С. 161-165. [Ustinnikova O.B., Runova O.B., Goloshchapova E.O., Korsun L.V. The theoretical substantiation of the choice of interferon alfa-2b substance for certification as a standard for authenticating peptide mapping. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2016, Vol. 16, no. 3, pp. 161-165. (In Russ.)]
7. Фармакопейная статья предприятия PN 003726/01-180515 [Pharmacopoeia article of the company PN 003726/01-180515].
8. Ben-Bassat A. Amino-terminal processing of proteins. *Nature*, 1987, pp. 315-326.
9. Dianzani F. Biological basis for the clinical use of interferon. *Gut*, 1993, Vol. 34, p. 76.
10. European Pharmacopoeia 9.0, 07/2015:1110 "Interferon alfa-2 concentrated solution".
11. European Pharmacopoeia 9.0, 01/2010:20255 "Peptide mapping".
12. Kamionka M. Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2011, Vol. 12, pp. 268-274.

Авторы:

Устинникова О.Б. — к.б.н., начальник лаборатории биохимии МИБП ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Голощапова Е.О. — эксперт 2 категории лаборатории биохимии МИБП ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Рунова О.Б. — к.х.н., главный эксперт лаборатории биохимии МИБП ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Коротков М.Г. — к.б.н., ведущий эксперт лаборатории биохимии МИБП ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Волкова Р.А. — д.б.н., начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Поступила 05.10.2017

Отправлена на доработку 10.10.2017

Принята к печати 25.10.2017

Authors:

Ustinnikova O.B., PhD (Biology), Head, Laboratory of MIBP Biochemistry, Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products, Moscow, Russian Federation

Goloshchapova E.O., Licensed Expert, Laboratory of MIBP Biochemistry, Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products, Moscow, Russian Federation

Rounova O.B., PhD (Chemistry), Main Licensed Expert, Laboratory of MIBP Biochemistry, Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products, Moscow, Russian Federation

Korotkov M.G., PhD (Biology), Leading Expert, Laboratory of MIBP Biochemistry, Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products, Moscow, Russian Federation

Volkova R.A., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Biology and Genetic Testing, Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products, Moscow, Russian Federation

Received 05.10.2017

Revision received 10.10.2017

Accepted 25.10.2017

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И СОСТОЯНИЕ ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ДЕСТРУКТИВНЫМ ПАНКРЕАТИТОМ

**Савченко А.А.^{1,2}, Борисов А.Г.^{1,2}, Здзитовецкий Д.Э.²,
Кудрявцев И.В.^{3,4}, Медведев А.Ю.⁵, Гвоздев И.И.¹, Мошев А.В.¹**

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

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

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

⁴ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵ КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение взаимосвязи между показателями функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов и гемостаза у больных острым деструктивным панкреатитом (ОДП). Обследовано 33 больных ОДП. В качестве контроля обследовано 35 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Уровень фагоцитоза нейтрофилов определяли методом проточной цитометрии с помощью FITC-меченого стафилококкового белка А. Подсчитывали процент флуоресцирующих нейтрофилов (определяли как фагоцитарный индекс) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число). Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа. У всех обследованных также исследовали состояние коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. Обнаружено, что у больных ОДП при понижении количества фагоцитирующих нейтрофилов в крови наблюдается снижение интенсивности респираторного взрыва в клетках. Причем спонтанный и индуцированный синтез первичных активных форм кислорода (АФК) в нейтрофилах при ОДП реализуется быстрее, чем у здоровых людей, но интенсивность его значительно ниже. Максимум уровня спонтанного и индуцированного синтеза вторичных АФК в нейтрофилах больных значительно выше, чем у здоровых людей, но быстрый его спад в целом характеризует недостаточность респираторного взрыва в клетках. Снижение фагоцитарной активности нейтрофилов и особенности кинетики синтеза первичных и вторичных АФК может определяться действием поступивших в кровоток ферментов поджелудочной железы и, соответственно, нарушением функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов. Со стороны гемостаза у больных ОДП обнаружены нарушения только в коагуляционном звене, которые определяются повышением содержания фибриногена, растворимых фибрин-моно-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-68.
Факс: 8 (812) 234-94-89.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-68-68.
Fax: 7 (812) 234-94-89.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Савченко, А.Г. Борисов, Д.Э. Здзитовецкий,
И.В. Кудрявцев, А.Ю. Медведев, И.И. Гвоздев,
А.В. Мошев «Функциональная активность нейтрофильных
гранулоцитов и состояние гемостаза у больных острым
деструктивным панкреатитом» // Медицинская
иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 551-560.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-551-560

For citation:

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, D.E. Zdzitovetskiy,
I.V. Kudryavtsev, A. Yu. Medvedev, I.I. Gvozdev, A.V. Moshev
“Functional activity of neutrophils and hemostasis pattern in patients
with acute destructive pancreatitis”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 551-560.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-551-560

мерных комплексов и Д-димера в плазме крови при снижении уровня антитромбина III. Подобное изменение содержания показателей коагуляционного звена гемостаза характерно для воспалительных процессов и свидетельствует об активации коагуляционного каскада и о риске возникновения септических осложнений. У больных ОДП значительно увеличивается количество корреляционных связей между показателями функциональной активности нейтрофилов и параметрами гемостаза. Выявленные взаимосвязи при ОДП отражают сонаправленность изменений функциональной активности нейтрофилов (по показателям фагоцитоза и респираторного взрыва) и свертывающей системы крови (по показателям коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного звена). Изменение функциональной активности нейтрофилов и состояния гемостаза при ОДП, а также особенности взаимосвязи их показателей между собой характеризуют патогенез заболевания и определяют механизмы развития осложнений.

Ключевые слова: острый панкреатит, нейтрофилы, гемостаз, функциональная активность, фагоцитоз, респираторный взрыв

FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND HEMOSTASIS PATTERN IN PATIENTS WITH ACUTE DESTRUCTIVE PANCREATITIS

Savchenko A.A.^{a, b}, Borisov A.G.^{a, b}, Zdzitovetskiy D.E.^b,
Kudryavtsev I.V.^{c, d}, Medvedev A.Yu.^e, Gvozdev I.I.^a, Moshev A.V.^a

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

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

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

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

^e Krasnoyarsk Inter-District N.S. Karpovich Clinical Hospital for Emergent Medical Care, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The aim of present study was to investigate relationships between indicators of functional activity of neutrophilic granulocytes, and hemostasis parameters in patients with acute destructive pancreatitis (ADP). The study included thirty-three patients with ADP. 35 healthy persons were examined as a control group. The phagocytosis level in neutrophils was determined by flow cytometry using FITC-labeled staphylococcal protein A. We have calculated the percentage of fluorescent neutrophils as phagocytic index, and average cell fluorescence assumed phagocytic number. The intensity of respiratory burst observed in neutrophil samples was evaluated using chemiluminescence assay. All the persons under study were also tested for blood coagulation and vascular-platelet hemostasis. It was found that the ADP patients with decreased number of phagocytic neutrophils in the blood showed a decrease in respiratory burst intensity in the neutrophils. Moreover, spontaneous and induced synthesis of the primary reactive oxygen species (ROS) in neutrophils of ADP patients proceeded faster than in healthy people, but its intensity was much lower. The maximal level of spontaneous and induced synthesis of secondary ROS in neutrophils of patients was significantly higher than in healthy individuals, but its rapid may be generally characterized by insufficient respiratory burst in these patients. A reduced neutrophil phagocytic activity and kinetic characteristics of primary and secondary ROS synthesis may be attributed to the effects produced by pancreatic enzymes entering blood flow which may alter functional activity of the blood neutrophils. Concerning hemostasis in patients with ADP, some disturbances were found only in the coagulation link which seem to depend on increase in fibrinogen, soluble fibrin monomer complexes and D-dimer in blood plasma, along with reduced antithrombin III levels. Such a change in blood coagulation indexes is typical to inflammatory processes and presumes activation of the coagulation cascade and higher risk of septic complications. In patients with ADP, we have found a significantly increased number of correlations between indicators of functional activity of neutrophils and hemostasis parameters. This analysis revealed a relationship by the patients with ADP reflect some unidirectional changes in functional activity of neutrophils (as phagocytosis and respiratory burst), and blood coagulation parameters (as blood clotting and vascular/platelet links). The changes in functional activity of neutrophils and the state of hemostasis in the ADP

patients, as well as correlations between their alterations are involved into the pathogenesis of this disorder, and determine potential mechanisms for evolving complications.

Keywords: acute pancreatitis, neutrophils, hemostasis, functional activity, phagocytosis, respiratory burst

Исследование выполнено при финансовой поддержке Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

Введение

Острый деструктивный панкреатит (ОДП) в настоящее время остается одной из проблемных областей неотложной абдоминальной хирургии. Несмотря на применение в лечении ОДП современных детоксикационных технологий, разработку новых методов хирургических вмешательств, совершенствование медикаментозной терапии, данная патология характеризуется высокой летальностью: от 15 до 40% при стерильном панкреонекрозе и до 80% при инфицированном панкреонекрозе с гнойно-септическими осложнениями [2, 8, 21].

Согласно ферментативной теории развития острого панкреатита, некротические процессы, эндотоксикоз, полиорганную недостаточность связывают с резкой нефизиологической активацией пищеварительных ферментов в поджелудочной железе с последующим поражением ее тканей этими ферментами и их поступлением в кровотоки [15, 17]. Системное повреждение сосудистого эндотелия при ОДП ведет к активации свертывающей системы, что в свою очередь требует запуска механизмов распознавания поврежденных клеток и удаления активированных факторов свертывания из кровотока, в которых ключевую роль играют клетки врожденного иммунитета. Нарушения в системе гемостаза и иммунной системе, находясь в прямой зависимости от глубины патоморфологических изменений в поджелудочной железе, взаимно отягощают друг друга и являют пример срыва межсистемной регуляции [14, 21]. Однако особенности функционирования нейтрофильных гранулоцитов как основных клеток врожденного иммунитета при ОДП до сих пор не изучены.

В связи с этим **целью исследования** явилось изучение взаимосвязи между показателями функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов и гемостаза у больных ОДП.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 33 больных ОДП (19 мужчин и 14 женщин) средней и тяжелой степени тяжести, проходивших лечение в отделениях хирургии и отделении реанимации

и интенсивной терапии КБУЗ «КМКБСМП имени Н.С. Карповича» г. Красноярск. Средний возраст больных составил $46,8 \pm 6,4$ года. Из исследования были исключены больные с ОДП легкой степени и те, у которых ОДП явился осложнением травмы брюшной полости, в том числе и послеоперационный. Исходную степень тяжести состояния больных определяли по шкале SAPS II [13]. Для оценки тяжести ОДП и прогноза развития заболевания применяли шкалу критериев первичной экспресс-оценки тяжести острого панкреатита Санкт-Петербургского НИИ скорой помощи имени И.И. Джанелидзе [1]. Наличие и степень выраженности полиорганной недостаточности исходно и в динамике определяли по шкале SOFA [20]. При оценке степени тяжести синдрома системной воспалительной реакции придерживались критериев АССР/SCCM [7]. В качестве контроля обследовано 35 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Уровень фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов определяли методом проточной цитометрии с помощью FITC-меченого (fluorescein isothiocyanate) стафилококкового белка А [3]. Конъюгацию выполняли следующим образом: к стафилококковому белку А (разведен в бикарбонатном буфере, pH = 9,0) добавляли FITC (предварительно растворяли в ДМСО до концентрации 1 мкг/мл), инкубировали в темноте в течение 1 часа, трижды отмывали и по стандарту мутности доводили концентрацию белка до 1 млн/мл. К 100 мкл гепаринизированной крови добавляли 10 мкл FITC-меченого белка А и инкубировали 30 минут при температуре 37 °С. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Для гашения адгезированного на поверхности нейтрофилов FITC-меченого белка А к суспензии клеток добавляли раствор трипанового синего (0,2 мг/мл). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 50000 нейтрофилов. Подсчитывали процент флуоресцирующих нейтрофилов (определяли как фагоцитарный индекс – ФИ) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число – ФЧ).

Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа [5]. В качестве индикаторов хемилюминесценции использовали

люминол и люцигенин. Оценка спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «БЛМ-3607» (Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение интенсивности (I_{max}), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции (Синд.) к площади спонтанной (Спонт.) и определяли как индекс активации (Синд./Спонт.).

У всех обследованных на анализаторе STA-COMPACT (Швейцария) исследовались следующие показатели коагуляционного гемостаза: протромбиновый индекс (ПТИ), содержание фибриногена, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), уровень Д-димера, растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), антитромбина III (АТ III). На агрегометре LA230-2 БИОЛА (Россия) изучались показатели сосудисто-тромбоцитарного гемостаза: спонтанная агрегация тромбоцитов (САТ) и индуцированная, с применением в качестве индукторов аденозин-дифосфата (АДФ) в дозах 0,1 мкМ и 5 мкМ и адреналина в дозе 10 мкг/мл.

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

Результаты

Исследование функциональной активности нейтрофилов позволило установить, что у больных ОДП снижен ФИ нейтрофилов относительно контрольных значений (табл. 1). При исследовании интенсивности люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов обнаружено, что у пациентов с ОДП снижено время выхода

на максимум и площадь под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции. При исследовании интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции выявлено, что у больных ОДП повышается максимум интенсивности и снижается площадь под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции.

Изучение состояния коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза позволило установить, что у больных ОДП снижена величина ПТИ и концентрация антитромбина III, но при повышении содержания фибриногена, РФМК и Д-димера, а также при увеличении ТВ (табл. 2).

С помощью корреляционного анализа обнаружено, что у лиц контрольной группы время выхода на максимум спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов положительно взаимосвязан с АЧТВ ($r = 0,66$, $p = 0,039$), тогда как время выхода на максимум индуцированной люминесценции данного типа уже отрицательно коррелирует с уровнем адреналин-индуцированной агрегацией тромбоцитов ($r = -0,64$, $p = 0,044$). Взаимосвязь между индексом активации люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов и содержанием РФМК у лиц данной группы также является отрицательной ($r = -0,72$, $p = 0,019$).

У больных ОДП ФИ нейтрофилов отрицательно взаимосвязан с уровнем Д-димера в сыворотке крови ($r = -0,54$, $p = 0,033$). У данных пациентов площадь под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов положительно коррелирует с уровнем фибриногена ($r = 0,54$, $p = 0,030$ и $r = 0,52$, $p = 0,040$ соответственно), РФМК ($r = 0,54$, $p = 0,030$ и $r = 0,59$, $p = 0,016$ соответственно) и Д-димера ($r = 0,68$, $p = 0,005$ и $r = 0,67$, $p = 0,006$ соответственно). Взаимосвязь между максимумом интенсивности индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов и уровнем адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов также является положительной ($r = 0,70$, $p = 0,003$). Максимум интенсивности зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов положительно взаимосвязан с уровнями АДФ- (при 5 мкМ) и адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов ($r = 0,52$, $p = 0,033$ и $r = 0,57$, $p = 0,022$ соответственно). Площадь под кривой индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у больных ОДП отрицательно коррелирует с уровнем антитромбина III ($r = -0,48$, $p = 0,045$) и положительно – с содержанием РФМК ($r = 0,51$, $p = 0,033$).

ТАБЛИЦА 1. ФАГОЦИТОЗ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ ОДП, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. PHAGOCYTOTIC ACTIVITY AND LUCIGENIN-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE (LDCL) OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS (Ne) FROM PATIENTS WITH ACUTE DESTRUCTIVE PANCREATITIS (ADP), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Контроль Healthy control n = 35	ОДП Patients with ADP n = 33	p
Фагоцитоз Phagocytic activity of neutrophils			
ФИ нейтрофилов, % Ne index of phagocytosis, %	54,6 (21,9-89,8)	23,7 (14,9-32,1)	< 0,001
ФЧ нейтрофилов Ne phagocytic number	57,5 (23,8-114,0)	51,4 (45,1-55,5)	
Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Spontaneous LDCL activity of neutrophils			
Tmax, сек. Tmax, sec	2093 (1425-2881)	1537 (1123-2297)	0,048
Imax, о.е. × 10 ³	7,74 (2,61-16,54)	5,35 (3,61-9,11)	
S, о.е. × сек. × 10⁵ S, о.е. × sec × 10 ⁵	15,16 (3,95-41,11)	0,44 (0,34-0,86)	< 0,001
Зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced LDCL activity of neutrophils			
Tmax, сек. Tmax, sec	1738 (1389-2331)	1311 (1031-1431)	0,006
Imax, о.е. × 10 ³	14,14 (7,59-28,96)	12,69 (9,11-26,19)	
S, о.е. × сек. × 10⁵ S, о.е. × sec. × 10 ⁵	25,16 (10,70-64,61)	1,02 (0,75-1,32)	< 0,001
Синд./Спонт. S _{ind} /S _{sp}	1,77 (1,17-3,11)	2,38 (1,74-4,08)	
Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция Spontaneous LDCL activity of neutrophils			
Tmax, сек. Tmax, sec	969 (567-1559)	1344 (733-2315)	
Imax, о.е. × 10 ³	10,83 (4,06-30,88)	51,99 (30,22-104,28)	< 0,001
S, о.е. × сек. × 10⁵ S, о.е. × sec. × 10 ⁵	14,91 (4,49-50,94)	4,99 (1,62-9,22)	< 0,001
Зимозан-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced LDCL activity of neutrophils			
Tmax, сек. Tmax, sec	1072 (796-1459)	964 (766-1619)	
Imax, о.е. × 10 ³	21,25 (7,55-62,59)	132,05 (96,59-143,14)	< 0,001
S, о.е. × сек. × 10⁵ S, о.е. × sec. × 10 ⁵	24,34 (9,21-84,16)	11,20 (6,61-21,10)	0,007
Синд./Спонт. S _{ind} /S _{sp}	1,89 (1,34-2,87)	2,50 (1,52-5,20)	

Примечание. Tmax – время выхода на максимум; Imax – максимальное увеличение интенсивности; S – площадь под кривой люминесценции; Синд./ Спонт. – соотношение между индуцированной зимозаном и спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции.

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

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ КОАГУЛЯЦИОННОГО И СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ ОДП, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. INDICATORS OF COAGULATION AND VASCULAR-PLATELET HEMOSTASIS FROM PATIENTS WITH ACUTE DESTRUCTIVE PANCREATITIS (ADP), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Контроль Healthy control n = 57	ОДП Patients with ADP n = 33	p
ПТИ, % Prothrombin index, %	101 (94-113)	89 (82-96)	< 0,001
Фибриноген, г/л Fibrinogen, g/L	2,81 (2,36-3,31)	3,84 (2,97-5,03)	< 0,001
РФМК, мг % SFMC, mg %	7 (5-9)	22 (10-26)	< 0,001
Антитромбин III, % Anti-thrombin III, %	98 (89-103)	88 (73-102)	0,021
ТВ, сек. TT, sec	15,3 (14,2-16,6)	21,6 (19,8-24,1)	< 0,001
АЧТВ, сек. APTT, sec	33,5 (29,4-35,8)	30,4 (27,9-33,9)	
Д-димер, нг/мл D-dimer level, ng/ml	220 (168-220)	936 (566-1420)	< 0,001
Тромбоциты, 10 ⁹ /л Platelets, 10 ⁹ /L	217,5 (187,0-242,1)	201,5 (152,5-285,0)	
АТ с АДФ 5 мкМ, % SPA + ADP 5 μM, %	42,2 (27,6-52,8)	44,2 (31,8-57,7)	
АТ с АДФ 0,1 мкМ, усл. ед. SPA + ADP 0,1 μM, o.e.	1,7 (1,5-2,3)	2,1 (1,6-2,5)	
АТ с адреналином 10 мкг/мл, % SPA + Adrenaline 10 mkg/mL, %	36,9 (21,2-47,9)	44,2 (22,5-62,1)	

Примечание. ПТИ – протромбиновый индекс; РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы; ТВ – тромбиновое время; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; АТ – агрегация тромбоцитов; АДФ – аденозиндифосфат.

Note. SFMC, soluble fibrin monomer complex; TT, thrombin time; APTT, activated partial thromboplastin time; SPA, spontaneous platelet aggregation; ADP, adenosine diphosphate.

Обсуждение

Иммунопатогенез ОДП на сегодняшний день во многом рассматривается с позиций системного воспалительного ответа, важную роль в котором осуществляют нейтрофильные гранулоциты [16, 19, 23]. Однако воздействие активированных ферментов поджелудочной железы, поступивших в кровоток, должно модулировать функциональную активность нейтрофилов. Нами обнаружено, что у больных ОДП в 2,3 раза снижен процент фагоцитирующих нейтрофилов периферической крови в сравнении с выявленным у здоровых людей.

Респираторный взрыв, опосредуя процессы фагоцитоза и киллинга, является важным механизмом, лежащим в основе реактивности фагоцитирующих клеток [4, 9, 12]. Уровень синтеза

первичных и вторичных форм кислорода при респираторном взрыве нейтрофилов мы исследовали с помощью двух хемилюминесцентных индикаторов: люцигенина и люминола. Люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная активная форма кислорода (АФК) и синтезируется в системе NADPH-оксидазы [4, 5]. Люцигенин не проходит через мембрану клеток и связывается с супероксид-радикалом только во внеклеточном пространстве. Соответственно, исследование люцигенин-зависимой хемилюминесценции клеток позволяет охарактеризовать состояние активности NADPH-оксидазы и уровень выделения супероксид-радикала для реализации механизма внешнего киллинга у больных ОДП. Обнаружено, что при ОДП при снижении

спонтанного и индуцированного уровней синтеза супероксид-радикала уменьшается время выхода на максимум. Время выхода на максимум характеризует скорость развития респираторного взрыва в случае регуляторного (спонтанной хемилюминесценции) или антигенного воздействия (при зимозан-индуцированной хемилюминесценции) на клетку [4, 5]. Снижение времени выхода на максимум спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции при РП характеризует высокую чувствительность нейтрофилов к воздействию.

Цитотоксическая активность нейтрофильных гранулоцитов определяется уровнем продукции как первичных, так и вторичных АФК (гидроксильный радикал, перекись водорода и др.). В формировании пула вторичных форм кислорода в нейтрофилах принимают участие такие ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза, миелопероксидаза и др. [4, 5, 18]. Люминол способен вступать в хемилюминесцентную реакцию и с первичными, и с вторичными АФК, проникать внутрь клеток и вступать в реакцию в фаголизосомах. Установлено, что у больных ОДП значительно повышается максимум интенсивности спонтанного и зимозан-индуцированного синтеза вторичных АФК, но при снижении площади под кривыми хемилюминесценции. Подобная кинетика синтеза вторичных АФК является оригинальной и определяется быстрым спадом хемилюминесцентной реакции после достижения максимума. Необходимо отметить, что при высокой интенсивности респираторного взрыва в нейтрофилах повышается и максимум интенсивности и площадь под кривой хемилюминесцентной реакции [4]. Особенность кинетики синтеза вторичных АФК в нейтрофильных гранулоцитах больных ОДП, возможно, связана с быстрым расходом метаболитических ресурсов, когда способность клеток к генерации респираторного взрыва высокой интенсивности приводит к истощению метаболитических резервов и, соответственно, быстрому спаду хемилюминесцентной кривой.

При исследовании гемостаза у больных ОДП обнаружены изменения только в коагуляционном звене. У обследованных пациентов обнаружено повышение содержания фибриногена, характерное для воспалительных заболеваний [6, 10]. Повышение количества РФМК и Д-димера при снижении величины ПТИ характеризует активацию коагуляционного каскада у больных ОДП. При этом понижение уровня антитромбина III в плазме крови свидетельствует о риске возникновения тромбоза и развития ассоциированного с ДВС-синдромом сепсиса [11, 22].

Проанализирована корреляционная зависимость между показателями функциональной активности нейтрофилов и параметрами коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у здоровых людей и больных ОДП. Установлено, что у здоровых людей с показателями гемостаза взаимосвязаны только параметры синтеза вторичных АФК нейтрофилами (люминол-зависимая хемилюминесценция). При этом выявляется положительная корреляционная связь между временем выхода на максимум спонтанного синтеза АФК и АЧТВ – показателя, характеризующего эффективность «внутреннего» и общего пути свертывания, тогда как с индексом активации нейтрофилов и временем выхода на максимум индуцированного синтеза вторичных АФК отрицательно взаимосвязаны, соответственно, количество РФМК в плазме и уровень адреналин-индуцированной агрегации.

У больных ОДП обнаружены взаимосвязи показателей гемостаза с параметрами фагоцитоза, а также уровнями синтеза и первичных и вторичных АФК нейтрофилами. Так, между ФИ нейтрофилов обследованных пациентов и содержанием Д-димера выявляется отрицательная взаимосвязь, характеризующая ингибирование фагоцитарной активности при активации процессов фибринолиза. Кинетические показатели активности NADPH-оксидазы нейтрофильных гранулоцитов у больных ОДП только положительно взаимосвязаны с уровнями содержания фибриногена, РФМК, Д-димера и адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов. Кинетические показатели синтеза вторичных АФК отрицательно взаимосвязаны с количеством антитромбина III и положительно – с уровнями РФМК и АДФ- и адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов. Данная система корреляционных связей характеризует сопоставленность процессов дыхательного взрыва нейтрофилов (по уровню синтеза первичных и вторичных АФК) и изменение активности свертывающей системы крови (по показателям коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного звена).

Таким образом, у больных ОДП при понижении количества фагоцитирующих нейтрофилов в крови наблюдается снижение интенсивности респираторного взрыва в клетках. Причем спонтанный и индуцированный синтез первичных АФК в нейтрофилах при ОДП реализуется быстрее, чем у здоровых людей, но интенсивность его значительно ниже. Максимум уровня спонтанного и индуцированного синтеза вторичных АФК в нейтрофилах больных значительно выше, чем у здоровых людей, но быстрый его спад в целом характеризует недостаточность респираторного взрыва в клетках. Снижение фагоци-

тарной активности нейтрофилов и особенности кинетики синтеза первичных и вторичных АФК может определяться действием поступивших в кровотоки ферментов поджелудочной железы и, соответственно, нарушением функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов. Со стороны гемостаза у больных ОДП обнаружены нарушения только в коагуляционном звене, которые определяются повышением содержания фибриногена, РФМК и Д-димера в плазме крови при снижении уровня антитромбина III. Подобное изменение содержания показателей коагуляционного звена гемостаза характерно для воспалительных процессов и свидетельствует об активации коагуляционного каскада и о риске возникновения септических осложнений. У боль-

ных ОДП значительно увеличивается количество корреляционных связей между показателями функциональной активности нейтрофилов и параметрами гемостаза. Выявленные взаимосвязи при ОДП отражают сонаправленность изменений функциональной активности нейтрофилов (по показателям фагоцитоза и респираторного взрыва) и свертывающей системы крови (по показателям коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного звена). Изменение функциональной активности нейтрофилов и состояния гемостаза при ОДП, а также особенности взаимосвязи их показателей между собой характеризуют патогенез заболевания и определяют механизмы развития осложнений.

Список литературы / References

1. Багненко С.Ф., Толстой А.Д., Краснорогов В.Б., Курьгин А.А., Гринев М.В., Лапшин В.Н., Гольцов В.Р. Острый панкреатит (Протоколы диагностики и лечение) // *Анналы хирургической гепатологии*, 2006. Т. 11, № 1. С. 60-66. [Bagnenko S.F., Tolstoy A.D., Krasnorogov V.B., Kurygin A.A., Grinev M.V., Lapshin V.N., Goltsov V.R. Acute pancreatitis (diagnostic protocols and treatment). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of Surgical Hepatology*, 2006, Vol. 11, no. 1, pp. 60-66. (In Russ.)]
2. Дарвин В.В., Онищенко С.В., Краснов Е.А., Васильев В.В., Лысак М.М., Климова Н.В. Острый деструктивный панкреатит: современное хирургическое лечение // *Анналы хирургической гепатологии*, 2014. Т. 19, № 4. С. 76-82. [Darvin V.V., Onishhenko S.V., Krasnov E.A., Vasilyev V.V., Lysak M.M., Klimova N.V. Acute destructive pancreatitis: current surgical treatment. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of Surgical Hepatology*, 2014, Vol. 19, no. 4, pp. 76-82. (In Russ.)]
3. Мазуров Д.В., Пинегин Б.В. Применение проточной цитометрии для оценки поглотительной и бактерицидной функций гранулоцитов и моноцитов периферической крови // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*, 1999. № 9. С. 154-156. [Mazurov D.V., Pinegin B.V. Application of flow cytometry for evaluating the absorbency and the antibacterial functions of granulocytes and monocytes of peripheral blood. *Allergiya, astma i klinicheskaya immunologiya = Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 1999, no. 9, pp. 154-156. (In Russ.)]
4. Савченко А.А., Здитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов и уровни концентрации цитокинов у больных распространенным гнойным перитонитом // *Цитокины и воспаление*, 2013. Т. 12, № 1-2. С. 115-119. [Savchenko A.A., Zdzitovetskiy D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Neutrophil chemiluminescent activity and cytokine concentration levels in patients with extensive purulent peritonitis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, Vol. 12, no. 1-2, pp. 115-119. (In Russ.)]
5. Шкапова Е.А., Куртасова Л.М., Савченко А.А. Показатели люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у больных раком почки // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2010. Т. 149, № 2. С. 201-203. [Shkapova E.A., Kurtasova L.M., Savchenko A.A. The indicators of the lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence of blood neutrophils by the patients with kidney cancer. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol. 149, no. 2, pp. 201-203. (In Russ.)]
6. Andreassen S.M., Berg L.C., Nielsen S.S., Kristensen A.T., Jacobsen S. mRNA expression of genes involved in inflammation and haemostasis in equine fibroblast-like synoviocytes following exposure to lipopolysaccharide, fibrinogen and thrombin. *BMC Vet. Res.*, 2015, Vol. 11, p. 141.
7. Bone R.S., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J. American college of Chest Physicians. Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guide lines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.*, 1992, Vol. 20, no. 6, pp. 864-874.
8. Dick J.F. 3rd, Gardner T.B., Merrens E.J. Acute pancreatitis: New developments and strategies for the hospitalist. *J. Hosp. Med.*, 2016, Vol. 11, no. 10, pp. 724-729.
9. El-Benna J., Hurtado-Nedelec M., Marzaioli V., Marie J.C., Gougerot-Pocidallo M.A., Dang P.M. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.*, 2016, Vol. 273, no. 1, pp. 180-193.
10. Hoppe B. Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 112, no. 4, pp. 649-658.

11. Iba T., Gando S., Saitoh D., Wada H., Di Nisio M., Thachil J. Antithrombin supplementation and risk of bleeding in patients with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.*, 2016, Vol. 145, pp. 46-50.
12. Kovács I., Horváth M., Kovács T., Somogyi K., Tretter L., Geiszt M., Petheő G.L. Comparison of proton channel, phagocyte oxidase, and respiratory burst levels between human eosinophil and neutrophil granulocytes. *Free Radic. Res.*, 2014, Vol. 48, no. 10, pp. 1190-1199.
13. le Gall J.-R., Lemeshow S., Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*, 1993, Vol. 270, pp. 2957-2963.
14. Lisman T., Porte R.J. Activation and regulation of hemostasis in acute liver failure and acute pancreatitis. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2010, Vol. 36, no. 4, pp. 437-443.
15. Maheshwari R., Subramanian R.M. Severe acute pancreatitis and necrotizing pancreatitis. *Crit. Care Clin.*, 2016, Vol. 32, no. 2, pp. 279-290.
16. Okamura D., Starr M.E., Lee E.Y., Stromberg A.J., Evers B.M., Saito H. Age-dependent vulnerability to experimental acute pancreatitis is associated with increased systemic inflammation and thrombosis. *Aging Cell*, 2012, Vol. 11, no. 5, pp. 760-769.
17. Singh P., Garg P.K. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding. *Indian J. Gastroenterol.*, 2016, Vol. 35, no. 3, pp. 153-166.
18. Trujillo M. Analysis of the immunity-related oxidative bursts by a luminol-based assay. *Methods Mol. Biol.*, 2016, Vol. 1398, pp. 323-329.
19. van Bijnen S.T., Wouters D., van Mierlo G.J., Muus P., Zeerleder S. Neutrophil activation and nucleosomes as markers of systemic inflammation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: effects of eculizumab. *J. Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 13, no. 11, pp. 2004-2011.
20. Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonca A., Bruining H., Reinhart C.K., Suter P.M., Thijs L.G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.*, 1996, Vol. 22, no. 7, pp. 707-710.
21. Vinokurov M.M., Saveliev V.V., Gogolev N.M., Yalynskya T.V. Immunomodulation and treatment of acute destructive pancreatitis in a multidisciplinary surgical hospital. *Wiad. Lek.*, 2015, Vol. 68, no. 4, pp. 582-586.
22. Yasuda N., Goto K., Ohchi Y., Abe T., Koga H., Kitano T. The efficacy and safety of antithrombin and recombinant human thrombomodulin combination therapy in patients with severe sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J. Crit. Care.*, 2016, Vol. 36, pp. 29-34.
23. Zonneveld R., Molema G., Plötz F.B. Measurement of functional and morphodynamic neutrophil phenotypes in systemic inflammation and sepsis. *Crit. Care.*, 2016, Vol. 20, p. 235.

Авторы:

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

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

Authors:

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

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

Здзитовецкий Д.Э. — д.м.н., заведующий кафедрой хирургических болезней им. проф. Ю.М. Лубенского 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 ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, кафедра иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

Медведев А.Ю. — врач КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

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

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

Zdzitovetskiy D.E., PhD, MD (Medicine), Head, Yu.M. Lubensky Department of Surgical Diseases, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Medvedev A.Yu., Doctor Clin. Med., Krasnoyarsk Inter-District N.S. Karpovich Clinical Hospital for Emergent Medical Care, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

Поступила 15.11.2017
Принята к печати 28.11.2017

Received 15.11.2017
Accepted 28.11.2017

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО БРОНХОЛЕГОЧНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Козлова Я.И., Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.Е.,
Аак О.В., Соловьева Г.И., Клишко Н.Н.

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Изучение роли различных иммунологических медиаторов в формировании хронического аллергического воспаления у больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (АБЛА) необходимо для выявления возможных мишеней, для терапевтического вмешательства и своевременной диагностики заболевания.

Цель — определить особенности регуляции иммунного ответа и выявить диагностические маркеры развития АБЛА у больных бронхиальной астмой, оценить клинко-иммунологическую эффективность антимикотической терапии.

Проведено обследование 13 больных АБЛА, 14 больных бронхиальной астмой с микогенной сенсибилизацией (БАМС), 17 больных бронхиальной астмой (БА) и 12 условно здоровых лиц. Содержание тимического стромального лимфопоэтина (Thymic stromal lymphopoietin; TSLP), тимус-ассоциированного регуляторного хемокина (Thymus and activation-regulated chemokine; TARC), IL-8, количество эозинофилов, уровни общего IgE и специфических IgE к *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) определяли в сыворотке крови иммуноферментным методом. Проведен мониторинг иммунологических маркеров на фоне антимикотической терапии.

У больных АБЛА установлены достоверно более высокие значения числа эозинофилов, уровней общего IgE и sIgE к *A. fumigatus*, а также TARC и IL-8 в сыворотке крови по сравнению с больными БА. Не установлено различий в содержании TSLP между обследованными группами пациентов. Положительная корреляционная связь уровня sIgE к *A. fumigatus* с содержанием TARC и IL-8, числом эозинофилов, а также уровнем общего IgE подтверждает важное диагностическое значение показателей провоспалительных цитокинов у больных АБЛА. На фоне применения итраконазола выявлена положительная клинко-иммунологическая динамика у больных АБЛА. После 12 недель терапии установлено достоверное повышение показателей АСТ, ОФВ1 и индекса Тиффно, снижение числа эозинофилов, уровней общего IgE и тенденция к уменьшению содержания TARC и IL-8. Это указывает на эффективность антифунгальных препаратов в лечении хронического аллергического воспаления у больных АБЛА.

Использование современных иммунологических биомаркеров, наряду с традиционными показателями, позволит дифференцированно подходить к оценке вероятности развития АБЛА у больных бронхиальной астмой, доказательно выделять ранние стадии заболевания и судить об эффективности проводимой терапии.

Ключевые слова: *Aspergillus spp.*, *Aspergillus fumigatus*, аллергический бронхолегочный аспергиллез, бронхиальная астма, хемокины, цитокины, итраконазол

Адрес для переписки:

Козлова Яна Игоревна
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный
медицинский университет»
194291, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28.
Тел.: 8 (812) 303-51-40.
Факс: 8 (812) 510-62-77.
E-mail: kozlova510@mail.ru

Address for correspondence:

Kozlova Yana I.
North-Western State I.I. Mechnikov Medical University
194291, Russian Federation, St. Petersburg,
St. Jago de Cuba str., 1/28.
Phone: 7 (812) 303-51-40.
Fax: 7 (812) 510-62-77.
E-mail: kozlova510@mail.ru

Образец цитирования:

Я.И. Козлова, Е.В. Фролова, Л.В. Филиппова,
А.Е. Учеваткина, О.В. Аак, Г.И. Соловьева, Н.Н. Клишко
«Диагностические маркеры аллергического бронхолегочного
аспергиллеза у больных бронхиальной астмой»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 561-570.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-561-570

© Козлова Я.И. и соавт., 2018

For citation:

Ya.I. Kozlova, E.V. Frolova, L.V. Filippova, A.E. Uchevatkina,
O.V. Aak, G.I. Solovyeva, N.N. Klimko "Diagnostic markers of
allergic bronchopulmonary aspergilles in patients with bronchial
asthma", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 561-570.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-561-570

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-561-570

DIAGNOSTIC MARKERS OF ALLERGIC BRONCHOPULMONARY ASPERGILLOSIS IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

Kozlova Ya.I., Frolova E.V., Filippova L.V., Uchevatkina A.E., Aak O.V., Solovyeva G.I., Klimko N.N.

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

Abstract. Studies of probable significance of different immunological mediators for the development of chronic allergic inflammation in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) are necessary in order to specify potential targets for therapeutic intervention and timely diagnosis of the disease. The purpose of present study was to determine the features of immune response regulation, and to identify diagnostic markers associated with development of ABPA in patients with bronchial asthma, and to evaluate clinical and immunological efficacy of specific antimycotic therapy.

The study involved 13 patients with ABPA, 14 patients with bronchial asthma with fungal sensitization (BAFS), 17 patients with bronchial asthma (BA) and 12 apparently healthy individuals. Levels of thymic stromal lymphopoietin (TSLP), thymus and activation-regulated chemokine (TARC), IL-8, as well as levels of total IgE and specific IgE to *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) were measured in blood serum by enzyme immunoassay; blood eosinophil counts were also made. Monitoring of these immunological markers in the course of antimycotic therapy was carried out.

Significantly higher numbers of eosinophils, increased levels of total IgE and sIgE for *A. fumigatus*, as well as TARC and IL-8 in serum were revealed in patients with ABPA when compared to the patients with BA. No significant differences in TSLP content were found between the examined groups of patients. A positive correlation between the levels of sIgE to *A. fumigatus* and contents of TARC and IL-8, numbers of eosinophils, and total IgE levels confirms the important diagnostic value of proinflammatory cytokines in ABPA patients. In the course of itraconazole medication, a positive clinical and immunological dynamics in ABPA patients was revealed. After 12 weeks of therapy, a significant increase in AST, FEV1 and Tiffno respiratory indexes, along with decreased number of eosinophils, total IgE levels, and a trend towards a decrease in TARC and IL-8 levels were documented. This dynamics confirms clinical efficiency of antifungal drugs when treating chronic allergic inflammation in ABPA patients.

Implementation of modern immunological biomarkers, alongside with traditional indicators, will allow to differentially evaluate a probability for ABLA development in patients with bronchial asthma, to present additional evidence for discerning early stages of the disease, and to conclude about the efficiency of the therapy applied

Keywords: *Aspergillus spp.*, *A. fumigatus*, allergic bronchopulmonary aspergillosis, asthma, chemokines, cytokines, itraconazole

Введение

Микроскопические грибы (микросмицеты) – представители отдельного царства живых существ. Благодаря огромному разнообразию и исключительной способности к выживанию в разных климатических условиях грибы распространены повсеместно. Грибы способны сенсibilизировать макроорганизм и индуцировать развитие всех типов аллергических реакций. Отличительной особенностью строения грибковых спор является то, что ингаляционные частицы микросмицетов состоят из живых клеток и способны к росту и секреции аллергенов *in vivo*. *Aspergillus spp.* – один из основных источников аллергенов как в окружающей среде, так и внутри жилых и производственных помещений.

Исследования последних лет установили связь грибковой сенсibilизации с тяжелым течением БА, о чем свидетельствуют ухудшение функции легких и увеличение числа госпитализаций больных в связи с обострением заболевания [12, 18]. Клинические проявления гиперчувствительности к *Aspergillus spp.* у больных с атопией могут варьировать от обострения бронхиальной астмы до развития тяжелой бронхиальной астмы с микогенной сенсibilизацией и АБЛА [1, 3, 10, 22].

Для АБЛА характерны разнообразные клинические и рентгенологические проявления, которые обычно сопровождаются неконтролируемой БА, рецидивирующими легочными инфильтратами, бронхоэктазами и прогрессирующей дыхательной недостаточностью [2, 14]. В основе

патогенеза заболевания лежит хроническое аллергическое воспаление, в регуляции которого важную роль отводят растворимым медиаторам, осуществляющим все взаимодействия между клетками иммунной системы. Своевременное выявление АБЛА необходимо для назначения адекватной противовоспалительной и антимикотической терапии. Лечение наиболее эффективно, если начато до развития бронхоэктазов и необратимого ухудшения функции дыхания. Следовательно, для врачей в клинической практике большой интерес представляет использование новых иммунологических биомаркеров для ранней диагностики АБЛА. Кроме того, количество исследований эффективности применения азолов в лечении АБЛА ограничено, а влияние антимикотической терапии на иммунологические показатели пациентов и функциональную активность лимфоцитов требует дальнейшего изучения [15, 24].

Цель исследования – определить особенности регуляции иммунного ответа и выявить диагностические маркеры развития АБЛА у больных бронхиальной астмой, оценить клинико-иммунологическую эффективность антимикотической терапии.

Материалы и методы

В микологической клинике СЗГМУ им. И.И. Мечникова в Санкт-Петербурге проведено проспективное исследование 44 больных (медиана возраста – 43 года, мужчин – 9, женщин – 35) тяжелой БА. Контрольную группу составили 12 условно здоровых людей, сопоставимых по возрасту и полу, без аллергических заболеваний в анамнезе. Медиана возраста добровольцев составила 33 года (мужчин – 3, женщин – 9).

Обследование больных включало сбор анамнестических данных (первые симптомы заболевания и время их появления, динамика развития, возможный контакт с плесневыми грибами дома или на работе, наличие аллергических реакций, наследственность по атопии, предшествующая терапия и ее эффективность и т.д.), а также оценку результатов общеклинических, лабораторных, инструментальных методов диагностики. Уровень контроля симптомов и степень тяжести БА определяли в соответствии с критериями «Глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы» (GINA, 2016).

При оценке контроля над симптомами БА ориентировались на жалобы, клинические проявления, данные спирометрии с проведением теста на обратимость. Также использовали опросник АСТ (Asthma Control Test), который является краткой и доступной анкетой, содержит 5 вопросов с 5-балльной оценкой ответов. Сумма 25 бал-

лов означают полный контроль БА, 20–24 – неполный контроль, 19 баллов и меньше указывает на отсутствие контроля. С помощью АСТ оценивали уровень контроля БА за последние 4 недели.

Микологическое исследование включало микроскопию и культуральное исследование образцов респираторных биосубстратов: мокрота, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ). Материал для культурального исследования засеивали на среду Сабуро, посевы инкубировали при 37 °С в течение 10 дней. Полученные культуры *Aspergillus* идентифицировали по морфологическим признакам.

Больным проводили кожное тестирование с 6 грибковыми аллергенами: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Candida* (Allergopharma, Германия, разрешение этического комитета СЗГМУ им. И.И. Мечникова от 24.06.2014). Методом иммуноферментного анализа определяли уровень общего IgE (ООО «Полигност», Россия) и специфических IgE (sIgE) к грибковым (панель биотинилированных аллергенов «Алкор Био», Россия) в сыворотке крови. Определение концентрации TARC (R&D Systems, США), TSLP (R&D Systems, США), IL-8 (АО «Вектор-Бест», Россия) в сыворотке крови осуществляли с помощью иммуноферментных тест-систем в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Концентрации аналитов были рассчитаны по стандартным кривым и выражены в пг/мл.

Для изучения функции внешнего дыхания использовали спирометрию методом выполнения петли «объем-поток» с компьютерной обработкой результатов исследования. Учитывали следующие показатели: объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), индекс Тиффно. По показаниям выполняли компьютерную томографию (КТ) легких в режиме высокого разрешения.

Для выявления микогенной сенсibilизации использовали критерий, предложенный международными экспертами ISHAM: положительный кожный прик-тест (≥ 3 мм) и/или выявление в сыворотке крови уровня специфического IgE к грибковому аллергену, соответствующего классу I и выше ($\geq 0,35$ Ед/мл) [10]. Диагноз аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА) устанавливали на основании критериев Agarwal R. и соавт. [4].

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA 10. Данные представляли в виде медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го процентилей, $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$). Для оценки различий между независимыми выборка-

ми применяли непараметрический критерий Манна–Уитни, между зависимыми выборками использовали критерий Вилкоксона. Корреляции были проверены с помощью теста Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В ходе исследования больные БА были разделены на следующие группы. Положительные результаты кожного тестирования и уровни sIgE к грибковым аллергенам выше диагностического значения (0,35 МЕ/мл) позволили выявить 14

больных тяжелой бронхиальной астмой с микогенной сенсibilизацией (БАМС). У 17 больных была определена тяжелая бронхиальная астма без микогенной сенсibilизации (БА). Согласно критериям Agarwal R. и соавт., у 13 больных установлен АБЛА.

У больных АБЛА абсолютное количество эозинофилов было $0,72 (0,47-0,96) \times 10^9/\text{л}$, а уровни общего IgE и sIgE к *A. fumigatus* составили 1830 (867-2950) МЕ/мл и 4,14 (1,15-6,97) МЕ/мл соответственно. Эти показатели были достоверно выше по сравнению с показателями групп сравнения ($p < 0,05$) (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ, Ме ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

TABLE 1. IMMUNOLOGICAL INDICATORS OF PATIENTS WITH ASTHMA, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Группы обследованных лиц Studied group				Достоверно значимые различия Significant differences, p
	Контроль, группа 1 Control, group 1 n = 12	БА, группа 2 BA, group 2 n = 17	БАМС, группа 3 BAFS, group 3 n = 14	АБЛА, группа 4 ABFA, group 4 n = 13	
Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$ Leukocytes, $\times 10^9/\text{L}$	6,2 (5,15-6,6)	6,6 (5,1-7,9)	6,9 (5,6-7,3)	6,6 (6,1-8,1)	$p_{1-3} = 0,057$
Эозинофилы, % Eosinophils, %	2,0 (1,0-3,0)	3,0 (2,0-5,0)	4,5 (4,0-10,0)	10,0 (6,0-14,0)	$p_{1-3} = 0,003$ $p_{1-4} = 0,000$ $p_{2-4} = 0,001$ $p_{3-4} = 0,048$
Эозинофилы, $\times 10^9/\text{л}$ Eosinophils, $\times 10^9/\text{L}$	0,12 (0,05-0,18)	0,19 (0,12-0,35)	0,37 (0,22-0,62)	0,72 (0,47-0,96)	$p_{1-3} = 0,001$ $p_{1-4} = 0,000$ $p_{2-4} = 0,002$ $p_{3-4} = 0,048$
IgE общий, МЕ/мл IgE total, U/mL	31,0 (20,5-61,0)	262,0 (90-856)	729,5 (232-785)	1830,0 (867-2950)	$p_{1-3} = 0,000$ $p_{1-4} = 0,000$ $p_{2-4} = 0,000$ $p_{3-4} = 0,002$
sIgE <i>Aspergillus</i> , МЕ/мл sIgE <i>Aspergillus</i> , U/mL	нд	0,02 (0,02-0,05)	0,03 (0,01-0,04)	4,14 (1,15-6,97)	$p_{2-4} = 0,000$ $p_{3-4} = 0,000$
TARC, пг/мл TARC, pg/mL	202,5 (195,9-256,0)	429,1 (218-571)	510,0 (432-750)	733,5 (540-812)	$p_{1-3} = 0,000$ $p_{1-4} = 0,000$ $p_{2-4} = 0,018$
TSLP, пг/мл TSLP, pg/mL	13,15 (9,05-22,13)	22,8 (14,6-31,8)	16,8 (9,7-27,7)	12,0 (8,8-24,7)	$p_{2-4} = 0,069$
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	4,79 (4,08-10,04)	14,35 (11,7-21,0)	15,30 (12,3-29,1)	39,75 (28,4-54,0)	$p_{1-3} = 0,002$ $p_{1-4} = 0,000$ $p_{2-4} = 0,001$ $p_{3-4} = 0,049$

Повышение данных показателей подтверждает наличие персистирующего аллергического воспаления за счет активации Th2-типа иммунного ответа при развитии АБЛА. В ходе микологического исследования респираторных биосубстратов (мокроты и/или БАЛ) выявили рост плесневых микромицетов рода *Aspergillus*: у 9 больных (69%) – *A. fumigatus*, у 4 (31%) – *A. niger*. Анализ результатов субъективных и объективных методов оценки контроля бронхиальной астмы выявил, что в группе больных АБЛА низкий балл при заполнении анкеты АСТ и худшие показатели функции внешнего дыхания ФЖЕЛ и ОФВ1 (табл. 2).

У больных БАМС течение астмы было неконтролируемое. По данным анкеты АСТ, в этой группе зарегистрировано самое меньшее количество баллов (11,5 (9,0-20,0)). Значения АСТ достоверно отличались от показателей больных БА ($p = 0,01$).

Клинико-иммунологические данные больных БАМС занимали промежуточное положение между больными БА и АБЛА (табл. 1, 2). Показатель функции внешнего дыхания индекс Тиффно у больных БАМС были статистически значимо ниже, чем в группе больных БА ($p = 0,034$), что позволяет говорить о более тяжелом течении заболевания. Уровень общего IgE больных БАМС составил 729,5 (232,0-785,0) МЕ/мл, количество эозинофилов периферической крови – $0,37 (0,22-0,62) \times 10^9/л$. Данные показатели не достигали значений больных АБЛА, но были в 1,9 и 2,8 раза выше, чем у больных тяжелой БА.

На следующем этапе мы провели исследование иммунологических медиаторов, участвующих в поддержании аллергического воспаления, и определили их связь со степенью выраженно-

сти микогенной сенсibilизации и клиническими проявлениями тяжести течения заболевания.

Концентрация TSLP в сыворотке крови больных АБЛА составила 12,0 (8,80-24,70) пг/мл, что сопоставимо с группами больных БАМС и БА. Анализ содержания TSLP в сыворотке крови не выявил статически значимых различий как в показателях между больными, так и по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Получены данные по существенному повышению концентрации TARC. Наиболее значимые различия содержания этого хемокина установлены у больных АБЛА (733,5 (540,0-812,0) пг/мл) в сравнении с группой БА (429,1 (218,0-571,3) пг/мл) и контролем (202,5 (195,9-256,0) пг/мл). Кроме того, в ходе работы выявлена отрицательная корреляционная связь между уровнями TARC в сыворотке крови и ухудшением показателей функции внешнего дыхания (снижение ФЖЕЛ ($r = -0,47$; $p < 0,05$) и ОФВ1 ($r = -0,41$; $p < 0,05$)), что предполагает патогенетическую роль TARC в формировании Th2-ответа у пациентов АБЛА. При этом у больных БАМС и БА содержание TARC не различалось, но было достоверно выше по отношению к группе контроля ($p = 0,00$; $p = 0,02$).

В нашем исследовании установлено, что степень продукции IL-8 у больных АБЛА (39,75 (28,35-54,0) пг/мл) достоверно выше, чем у пациентов обеих групп и у практически здоровых лиц контрольной группы (табл. 1). Содержание IL-8 у больных БАМС (15,3 (12,30-29,05) пг/мл) занимало пограничное положение между показателями больных БА и АБЛА, но не достигало статистически значимых различий.

Согласно полученным нами данным, важное значение TARC и IL-8 в развитии аллергического воспаления у больных с микогенной сенсibilизи-

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Группы обследованных лиц Studied group			Достоверно значимые различия, p Significant differences, p
	БА, группа 2 BA, group 2 n = 17	БАМС, группа 3 BAFS, group 3 n = 14	АБЛА, группа 4 ABPA, group 4 n = 13	
АСТ, баллы ACT, points	20,0 (15,0-23,0)	11,5 (9,0-20,0)	17,0 (12,0-17,0)	$p_{2-3} = 0,010$ $p_{2-4} = 0,012$
ФЖЕЛ, % FVC, %	98,0 (94,0-101,0)	95,0 (85,0-98,0)	84,0 (83,0-90,0)	$p_{2-4} = 0,002$ $p_{3-4} = 0,049$
ОФВ1, % FEV1, %	76,0 (67,0-79,0)	66,0 (58,0-72,0)	58,0 (47,0-75,0)	$p_{2-4} = 0,028$
Индекс Тиффно, % FEV1/FVC, %	76,0 (71,0-81,0)	70,5 (61,0-74,0)	65,0 (58,0-78,0)	$p_{2-3} = 0,034$

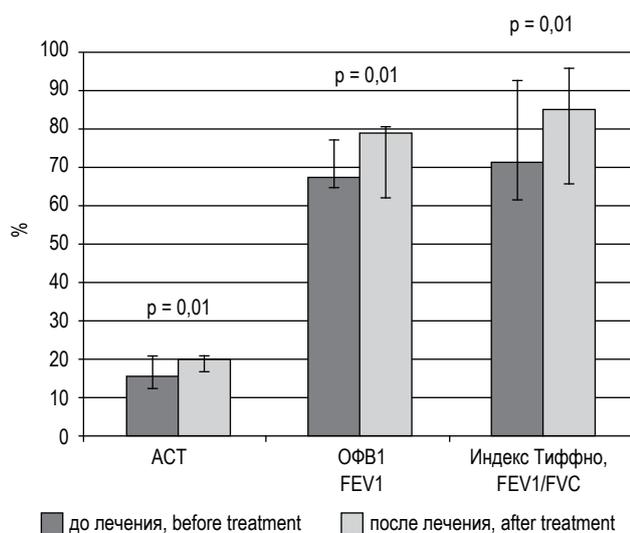


Рисунок 1. Характеристика больных бронхиальной астмой до и после лечения итраконазолом

Figure 1. Characteristics of patients with asthma before and after itraconazole treatment

зацией подтверждено положительной корреляционной связью уровня sIgE к *A. fumigatus* с процентным и абсолютным числом эозинофилов ($r = 0,46$, $r = 0,45$, $p < 0,05$), уровнем общего IgE ($r = 0,38$, $p < 0,05$), содержанием TARC ($r = 0,48$, $p < 0,05$) и IL-8 ($r = 0,55$, $p < 0,05$).

В ходе исследования 10 больным АБЛА проведено лечение итраконазолом в дозе 400 мг в сутки. У всех больных после 12 недель терапии отмечен выраженный клинический эффект: уменьше-

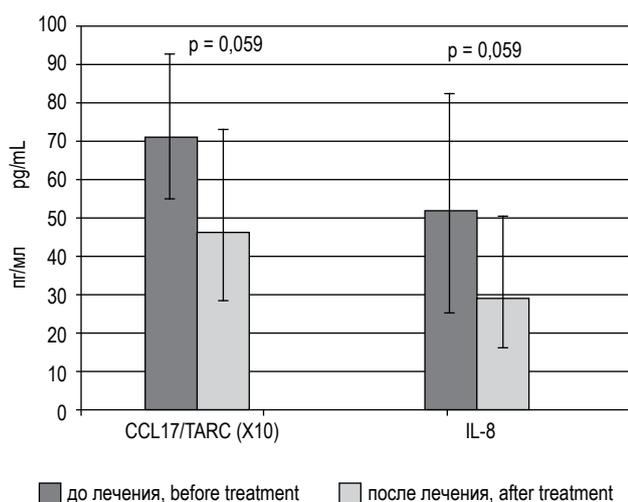


Рисунок 3. Показатели TARC и IL-8 в сыворотке крови у больных АБЛА до и после лечения итраконазолом

Figure 3. TARC and IL-8 serum levels in ABLA patients before and after itraconazole treatment

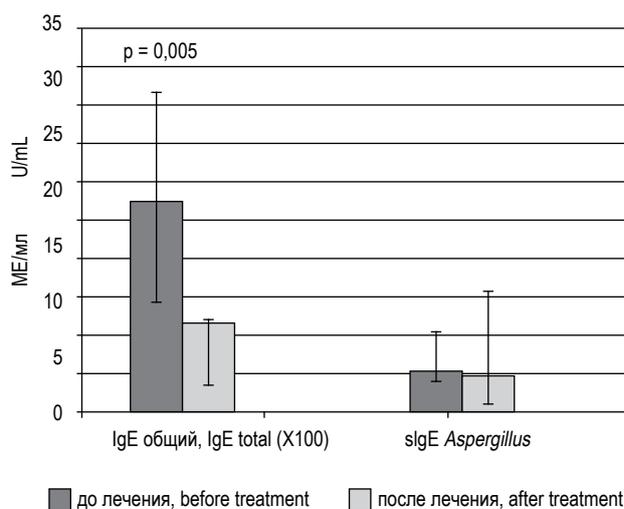


Рисунок 2. Уровень общего и специфического IgE у больных АБЛА до и после лечения итраконазолом

Figure 2. The level of total and specific IgE in patients with ABLA before and after itraconazole treatment

ние одышки и кашля, положительная динамика на КТ органов грудной клетки. Субъективные признаки улучшения общего состояния больных нашли отражение в достоверном повышении показателей АСТ-теста и согласуются с улучшением показателей функции внешнего дыхания: достоверное увеличение ОФВ1 и индекса Тиффно (рис. 1).

Все больные переносили препарат хорошо, нежелательных явлений не было. При повторном обследовании после антимикотической терапии у всех больных в нашей работе отмечено статистически значимое снижение относительного (10,0 (8,0-15,0) vs 3,0 (3,0-6,0) %, $p = 0,0125$) и абсолютного числа эозинофилов (0,69 (0,48-0,96) vs 0,20 (0,18-0,34) $\times 10^9$ /л, $p = 0,0125$) и уровня общего IgE ($p = 0,005$) (рис. 2).

На фоне проведения терапии отмечена тенденция к снижению концентрации TARC ($p = 0,059$) и IL-8 ($p = 0,059$) в сыворотке крови (рис. 3).

Обсуждение

Важным предрасполагающим фактором патогенеза БАМС и АБЛА является нарушение клиренса конидий грибов в дыхательных путях больных БА или муковисцидозом. Грибковые споры достигают альвеол и при неэффективном действии альвеолярных макрофагов прорастают в гифы. Эпителиальные клетки дыхательных путей и миелоидные клетки распознают клетки грибов посредством Toll-подобных рецепторов (TLRs) и Dectin-1. В результате этого взаимо-

действия секретируются хемокины и цитокины, участвующие в инициации и поддержании аллергического воспаления [6, 17]. Известно, что гифы грибов рода *Aspergillus* секретируют протеазы и токсины, которые нарушают плотные соединительные контакты между эпителиальными клетками дыхательных путей и получают доступ к легочным дендритным клеткам (DCs). Грибковые протеазы являются мощными аллергенами. Они связываются с рецепторами, активируемые протеиназами (PARs), присутствующими на эпителиальных клетках дыхательных путей, иницируя аллергические реакции в легочной ткани [21]. Следствием взаимодействия рецепторов эпителиальных клеток с аллергенами является синтез TSLP, IL-33 и IL-25, участвующих в подготовке благоприятного фона для аллергического (Th2-зависимого) ответа. Важную роль в инициации аллергических реакций отводят TSLP. TSLP активирует незрелые DCs к продукции Th2-аттрактирующего хемокина TARC и IL-8. TSLP стимулирует тучные клетки к секреции IL-5, IL-13 и IL-6. Дендритные клетки под действием TSLP мигрируют в дренирующие лимфатические узлы и экспрессируют рецептор OX40L, что определяет дифференцировку наивных CD4⁺Т-клеток в воспалительные Th2 [23]. В дальнейшем Th2-опосредованное аллергическое воспаление поддерживается за счет продукции IL-4, IL-5, IL-13 и TNF α . Происходит усиление секреции В-лимфоцитами специфических IgE к *Aspergillus fumigatus* и увеличение миграции эозинофилов из кровотока в легочную ткань [8]. Известно, что протеазы, секретируемые *A. fumigatus*, активируют PARs и вызывают высвобождение IL-8 из эпителиальных клеток дыхательных путей. IL-8 способствует притоку и активации нейтрофилов, вызывает продукцию матриксной металлопротеиназы-9 (Matrix metalloproteinase 9; MMP-9) из различных клеток, что приводит к последующему повреждению тканей легких [6]. Кроме того, высвобождение основного белка эозинофилов может индуцировать дегрануляцию нейтрофилов и усиливать продукцию IL-8. У таких пациентов в патогенезе аллергического воспаления участвуют Th17, поэтому больные плохо отвечают на лечение биологической терапией (моноклональные антитела анти-IL-4/IL-13) и терапию кортикостероидами [5]. Таким образом, как эозинофилы, так и нейтрофилы могут играть определенную роль в развитии повреждения легких и приводить к деградации внеклеточного матрикса легочной ткани у больных АБЛА.

Признано, что во время обострения АБЛА уровень общего IgE может достигать чрезвычайно высоких значений, отражая продолжитель-

ную аллергенную стимуляцию гуморального иммунного ответа [22]. В нашем исследовании выраженную активность Th2 у больных АБЛА подтвердили достоверным повышением числа циркулирующих эозинофилов, уровней общего IgE и sIgE к *A. fumigatus* по сравнению с показателями больных групп сравнения.

TSLP входит в семейство IL-7 цитокинов и является одним из наиболее важных медиаторов межклеточного взаимодействия при развитии аллергического воспаления [23]. В нашем исследовании анализ содержания TSLP в сыворотке крови не выявил статически значимых различий как в показателях между больными, так и по сравнению с контрольной группой. Полученные данные согласуются с результатами других исследований, в которых не установлено статически значимых различий содержания TSLP среди больных БА, БАМС и лиц без аллергических заболеваний [7, 18]. Напротив, Chauhan A. и соавт. показали, что высокие уровни TSLP в сыворотке крови отрицательно коррелировали с показателями АСТ и количеством Treg у детей с БА [9]. Авторы предложили использовать TSLP в качестве биомаркера для оценки тяжести воспалительного процесса дыхательных путей в педиатрической когорте больных БА. Противоречия полученных результатов могут быть связаны с тем, что основным источником TSLP при аллергическом воспалении являются эпителиальные клетки дыхательных путей. Ying S. и соавт. установили связь между выраженностью экспрессии TSLP в эпителиальных клетках дыхательных путей, степенью обструкции и результатами АСТ, что указывало на важную роль TSLP в течении БА [25]. Следовательно, не всегда можно уловить изменение концентрации данного иммунологического медиатора в сыворотке крови. Для уточнения роли TSLP в формировании гиперчувствительности к грибам рода *Aspergillus* необходимо в дальнейшем использовать такие биологические субстраты, как индуцированная мокрота и БАЛ.

TARC является уникальным хемокином, который рекрутирует Th2-клетки посредством связывания с CC-хемокиновым рецептором 4 (CCR4) в очаг воспаления [5]. При моделировании АБЛА экспериментальные животные, лишённые Т-лимфоцитов CCR4⁺, показали ослабление гиперчувствительности дыхательных путей и быстрое удаление конидий *A. fumigatus* по сравнению с контрольными мышами, что указывает на важную роль TARC в иммунном ответе к *A. fumigatus* [17]. Из данных таблицы 1 видно, что концентрация TARC более значимо возросла у больных АБЛА по сравнению с пациентами с БА. Содержание TARC достоверно выше у боль-

ных БА и БАМС по отношению к контрольным показателям, но не различалось между собой. Повышенные уровни TARC обнаружены другими исследователями у больных муковисцидозом и АБЛА по сравнению с показателями в группах больных муковисцидозом с микогенной сенсibilизацией или колонизацией *A. fumigatus*. Длительное наблюдение за пациентами позволило авторам высказать предположение, что увеличение концентрации TARC в сыворотке крови может предшествовать развитию АБЛА среди больных муковисцидозом [13, 16].

Наши данные о повышении продукции IL-8 согласуются с результатами авторов, которые обнаружили у больных АБЛА в другом биосубстрате (мокроте) высокое содержание эозинофилов, нейтрофилов, повышенные уровни IL-8 и MMP-9 [11]. В дальнейшем было высказано предположение, что IL-8 способствует притоку и активации нейтрофилов, вызывает высвобождение MMP-9 из различных клеток, что приводит к последующему повреждению тканей легких [19]. Таким образом, повышенное содержание и функциональная активность эозинофилов и нейтрофилов приводит к деградации внеклеточного матрикса легочной ткани у больных АБЛА. Полученные в настоящем исследовании данные указывают на значимость TARC и IL-8 в развитии аллергического воспаления у больных с микогенной сенсibilизацией.

Современные стратегии лечения АБЛА заключаются в совместном использовании кортикостероидов, системных противогрибковых средств, а в некоторых случаях моноклональных антител против IgE — омализумаба. Необходимость использования антимикотиков связана с тем, что кортикостероиды ингибируют Th17, которые необходимы для эффективного противогрибкового иммунного ответа. Кроме того, *A. fumigatus* обладают способностью подавлять секрецию IL-17 за счет ингибирования метаболизма триптофана, тем самым предотвращая опосредованный Th17-воспалительный ответ против микромицетов [17, 20].

Существует ограниченное количество исследований о влиянии антимикотической терапии на иммунологические показатели больных с микогенной сенсibilизацией. Wark P.A. и соавт. продемонстрировали, что лечение итраконазолом больных АБЛА приводило к снижению содержания катионного эозинофильного белка в мокроте, общего уровня IgE в сыворотке по сравнению с группой плацебо [24]. При исследовании *in vitro* установлено, что итраконазол не влиял на способность наивных Т-клеток здоровых субъектов дифференцироваться в Th1 или Th2. Это указывало на то, что итраконазол не действовал как иммуномодулятор наивных Т-клеток. Вероятно, обнаруженные эффекты итраконазола в улучшении течения Th2-опосредованных заболеваний были обусловлены изменением активности эффекторных Т-клеток [15].

В настоящем исследовании на фоне применения итраконазола у больных АБЛА выявлена положительная клинико-иммунологическая динамика. После 12 недель терапии установлено достоверное повышение показателей АСТ, ОФВ1 и индекса Тиффно, снижение числа эозинофилов, уровней общего IgE и тенденция к уменьшению содержания TARC и IL-8, что указывает на эффективность антифунгальных препаратов в лечении хронического аллергического воспаления у больных АБЛА.

Своевременная диагностика и лечение АБЛА предотвращают прогрессирование аллергического воспаления и формирование тяжелого фиброза легких. Выявленное в ходе исследования повышение содержания TARC и IL-8 у больных АБЛА и их связь со степенью выраженности микогенной сенсibilизации и клиническими проявлениями заболевания позволяет рассматривать эти показатели в качестве биомаркеров активной воспалительной реакции. Кроме того, изменения концентрации TARC и IL-8 могут характеризовать степень контроля над течением заболевания и выступать критерием эффективности проводимой терапии.

Список литературы / References

1. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н., Шадринова О.В., Борзова Ю.В., Васильева Н.В. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE program // Проблемы медицинской микологии, 2014. № 1. С. 3-8. [Klimko N.N., Kozlova Ya.I., Khostelidi S.N., Shadrivova O.V., Borzova Yu.V., Vasilyeva N.V. The prevalence of serious and chronic fungal diseases in Russian Federation on LIFE program model. *Problemy meditsinskoy mikologii = Problems in Medical Mycology*, 2014, no. 1, pp. 3-8. (In Russ.)]
2. Козлова Я.И., Соболев А.В., Фролова Е.В., Аак О.В., Бурьгина Е.В., Климко Н.Н. Аллергический бронхолегочный аспергиллез у больных бронхиальной астмой // Российский аллергологический журнал, 2015. № 2. С. 37-46. [Kozlova Ya.I., Sobolev A.V., Frolova E.V., Aak O.V., Burygina E.V., Klimko N.N. Allergic

bronchopulmonar aspergillosis in asthmatic patients. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergy Journal*, 2015, no. 2, pp. 37-46. (In Russ.).

3. Agarwal R. Severe asthma with fungal sensitization. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2011, Vol. 11, no. 5, pp. 403-413.

4. Agarwal R.A., Chakrabarti A., Shah D., Gupta D., Meis J.F., Guleria R., Moss R., Denning D.W. For the ABPA complicating asthma ISHAM working group 2013. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clinical and Experimental Allergy*, 2013, Vol. 43, no. 8, pp. 850-873.

5. Becerra-Díaz M., Wills-Karp M., Heller N.M. New perspectives on the regulation of type II inflammation in asthma. *F1000Res*, 2017, Vol. 6, p. 1014.

6. Carsin A., Romain T., Ranque S., Reynaud-Gaubert M., Dubus J.-C., Mège J.-L., Vitte J. Aspergillus fumigatus in cystic fibrosis: An update on immune interactions and molecular diagnostics in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy*, 2017, Vol. 72, no. 11, pp. 1632-1642.

7. Chai R., Liu B., Qi F. IL-31, IL-33, and TSLP expression and relation to severity of asthma and rhinitis in Chinese allergic patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2017, Vol. 10, no. 2, pp. 1774-1782.

8. Chaudhary N., Marr K.A. Impact of Aspergillus fumigatus in allergic airway diseases. *Clin. Transl. Allergy*, 2011, Vol. 1, no. 1, p. 4.

9. Chauhan A., Singh M., Agarwal A., Paul N. Correlation of TSLP, IL-33, and CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T regulatory in pediatric asthma. *J. Asthma*, 2015, Vol. 52, no. 9, pp. 868-872.

10. Denning D.W., Pashley C., Hartl D., Wardlaw A., Godet C., Del Giacco S., Delhaes L., Sergejeva S. Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs. *Clin. Transl. Allergy*, 2014, Vol. 15, no. 4, p. 14.

11. Gibson P.G., Wark P.A., Simpson J.L., Meldrum C., Meldrum S., Saltos N., Boyle M. Induced sputum IL-8 gene expression, neutrophil influx and MMP-9 in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Eur. Respir. J.*, 2003, Vol. 21, pp. 582-588.

12. Goh K.J., Yii A.C.A., Lapperre T.S., Chan A.K., Chew F.T., Chotirmall S.H., Koh M.S. Sensitization to Aspergillus species is associated with frequent exacerbations in severe asthma. *J. Asthma Allergy*, 2017, Vol. 21, no. 10, pp. 131-140.

13. Hartl D., Latzin P., Zissel G., Krane M., Krauss-Etschmann S., Griese M. Chemokines indicate allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006, Vol. 173, no. 12, pp. 1370-1376.

14. Hogan C., Denning D.W. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and related allergic syndromes. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 2011, Vol. 32, no. 6, pp. 682-692.

15. Kennedy J.L., Steinke J.W., Liu L., Negri J., Borish L., Payne S.C. Failure of itraconazole to prevent T-helper type 2 cell immune deviation: Implications for chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2016, Vol. 30, no. 6, pp. 379-384.

16. Latzin P., Hartl D., Regamey N., Frey U., Schoeni M.H., Casaulta C. Comparison of serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.*, 2008, Vol. 31, pp. 36-42.

17. Margalit A., Kavanagh K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2015, Vol. 39, no. 5, pp. 670-687.

18. Masaki K., Fukunaga K., Matsusaka M., Kabata H., Tanosaki T., Mochimaru T., Kamatani T., Ohtsuka K., Baba R., Ueda S., Suzuki Y., Sakamaki F., Oyamada Y., Inoue T., Oguma T., Sayama K., Koh H., Nakamura M., Umeda A., Kamei K., Izuhara K., Asano K., Betsuyaku T. Characteristics of severe asthma with fungal sensitization. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 2017, Vol. 119, no. 3, pp. 253-257.

19. McAllister F., Henry A., Kreindler J.L., Dubin P.J., Ulrich L., Steele C., Finder J.D., Pilewski J.M., Carreno B.M., Goldman S.J., Pirhonen J., Kolls J.K. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 1, pp. 404-412.

20. Murdock B.J., Shreiner A.B., McDonald R.A., Osterholzer J.J., White E.S., Toews G.B., Huffnagle G.B. Coevolution of Th1, Th 2, and Th 17 responses during repeated pulmonary exposure to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.*, 2011, Vol. 79, no. 1, pp. 125-135.

21. Porter P., Susarla S.C., Polikepahad S., Qian Y., Hampton J., Kiss A., Vaidya S., Sur S., Ongeri V., Yang T., Delclos G.L., Abramson S., Kheradmand F., Corry D.B. Link between allergic asthma and airway mucosal infection suggested by proteinase-secreting household fungi. *Mucosal Immunol.*, 2009, Vol. 2, no. 6, pp. 504-517.

22. Shah A., Paniabi C. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a perplexing clinical entity. *Allergy Asthma Immunology Res.*, 2016, Vol. 8, no. 4, pp. 282-297.

23. Wang Y.H., Liu Y.J. Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses. *Clin. Exp. Allergy*, 2009, Vol. 39, no. 6, pp. 798-806.

24. Wark P.A., Hensley M.J., Saltos N., Boyle M.J., Toneguzzi R.C., Epid G.D., Simpson J.L., McElduff P., Gibson P.G. Anti-inflammatory effect of itraconazole in stable allergic bronchopulmonary aspergillosis: A randomized controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, Vol. 111, no. 5, pp. 952-257.

25. Ying S., O'Connor B., Ratoff J., Meng Q., Fang C., Cousins D., Zhang G., Gu S., Gao Z., Shamji B., Edwards M.J., Lee T.H., Corrigan C.J. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 4, pp. 2790-2798.

Авторы:

Козлова Я.И. — к.м.н., доцент кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

Фролова Е.В. — к.м.н., заведующая НИЛ иммунологии и аллергологии, Научно-исследовательский институт медицинской микологии имени П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

Филиппова Л.В. — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии, Научно-исследовательский институт медицинской микологии имени П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

Учеваткина А.Е. — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии, Научно-исследовательский институт медицинской микологии имени П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

Аак О.В. — к.х.н., ведущий научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии, Научно-исследовательский институт медицинской микологии имени П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

Соловьева Г.И. — к.х.н., ведущий научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии, Научно-исследовательский институт медицинской микологии имени П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

Климко Н.Н. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kozlova Ya.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology, North-Western State I.I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Frolova E.V., PhD (Medicine), Head, Research Laboratory of Immunology and Allergology, Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State I.I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Filippova L.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Immunology and Allergology, Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State I.I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Uchevatkina A.E., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Immunology and Allergology, Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State I.I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Aak O.V., PhD (Chemistry), Leading Research Associate, Research Laboratory of Immunology and Allergology, Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State I.I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Solovyeva G.I., PhD (Chemistry), Leading Research Associate, Research Laboratory of Immunology and Allergology, Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State I.I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Klimko N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology, North-Western State I.I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 09.11.2017

Отправлена на доработку 27.11.2017

Принята к печати 05.12.2017

Received 09.11.2017

Revision received 27.11.2017

Accepted 05.12.2017

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИОРГАННОГО СОСУДИСТОГО РУСЛА ТИМУСА В СРАВНИТЕЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОМ РЯДУ ПОЗВОНОЧНЫХ (CHORDATA, VERTEBRATA)

Юрчинский В.Я.

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

Резюме. К настоящему моменту, по причине дефицита сравнительно-морфологических работ, малоизученным оказывается вопрос возрастной изменчивости морфологических показателей сосудистого русла тимуса у представителей различных классов наземных позвоночных животных. Поэтому основная цель нашей работы заключалась в выявлении подобных зависимостей. Материалом для исследования послужил тимус позвоночных животных, относящихся к четырем классам: класс Земноводные (*Amphibia*), класс Пресмыкающиеся (*Reptilia*), класс Птицы (*Aves*), класс Млекопитающие (*Mammalia*), включая человека. Впервые с использованием методов световой микроскопии осуществлено сравнительно-морфологическое исследование возрастных изменений относительных показателей количества и площади сосудов микроциркуляторного русла коркового и мозгового вещества тимуса позвоночных животных и человека. Установлено, что количество и площадь сосудов микроциркуляторного русла коры и мозгового вещества тимуса зависит от возраста, таксономической принадлежности животного, а также условий окружающей среды. Выявлены также отличия возрастных изменений общей площади интраорганного кровеносного русла тимуса, включая крупные артериальные и венозные сосуды. Определены отличительные особенности возрастных изменений кровеносного русла тимуса человека. На основе проведенного исследования делаются выводы о роли возрастных изменений кровеносного русла тимуса в поддержании иммунологического статуса позвоночных. Полученные результаты имеют большое значение для фундаментальной и прикладной биологии и медицины и могут быть интересны широкому кругу исследователей, особенно в области иммунологии.

Ключевые слова: тимус, микроциркуляторное русло, позвоночные животные, возрастные изменения, сравнительная морфология

AGE-RELATED CHANGES OF VASCULAR BED WITHIN THYMUS GLAND IN MORPHOLOGICAL COMPARATIVE RANGE OF VERTEBRATE ANIMALS (CHORDATA, VERTEBRATA)

Yurchinskiy V.Ya.

Smolensk State University, Smolensk, Russian Federation

Abstract. At present time, the issue of age-dependence of morphological parameters of the thymus blood vessels in members of various terrestrial vertebrates classes has been poorly studied, due to the lack of comparative morphological approaches. Therefore, the main goal of our work was to specify this kind of dependences. We studied samples of thymus glands from vertebrate animals belonging to four classes: Amphibians, Reptilian, Aves, and Mammals, including humans. For the first time, using methods of light microscopy, we performed comparative morphological studies of thymic blood microvessels in animals and humans, looking for age

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

В.Я. Юрчинский «Возрастные изменения внутриорганного сосудистого русла тимуса в сравнительно-морфологическом ряду позвоночных (Chordata, Vertebrata)» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 571-576. doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-571-576

© Юрчинский В.Я., 2018

For citation:

V.Ya. Yurchinskiy "Age-related changes of vascular bed within thymus gland in morphological comparative range of vertebrate animals (Chordata, Vertebrata)", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 571-576. doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-571-576

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-571-576

dependence of these differences. It was found the number and area of microcirculatory bed in thymic cortex and medullary substance depends on age, taxonomic class of the animal as well as on the environmental conditions. We have also revealed age-related differences of the intra-organ vasculature in thymus, including large arteries and venous vessels. Some specific age-related changes were found for human thymic vascular bed. On the basis of our studies, we can make conclusions about functional role of age-related changes of thymic blood vessels in immunity. The results of this study are important for basic and applied biology and medicine, being of interest to researches, especially in immunology.

Keywords: thymus, vertebrate animals, correlation analysis, age-related changes, comparative morphology

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-97530 р-центр-а.

Введение

Кровеносные сосуды являются надежным индикатором любых морфологических и функциональных изменений в тимусе, в том числе происходящих в процессе старения [8, 10]. Причина подобной взаимозависимости заключена в том, что кровеносное русло является агентом, при непосредственном участии которого в тканях органа осуществляется целый ряд важнейших процессов [11]. Система кровоснабжения занимает центральное место в эндокринной регуляции иммуногенеза [3, 5]. Отмечена зависимость обмена веществ и гомеостатических механизмов от характеристик микроциркуляции в тканях [7, 9]. Определена центральная роль кровеносной системы в формировании гемато-тимусного барьера [8] и транспорта различных форм лимфоидных клеток [10]. Эти и многие другие аспекты определяют как темпы старения тимуса, так и динамику разнонаправленных изменений его функциональной активности. Несомненно, изучение проблемы возрастных трансформаций сосудистого русла тимуса для иммунологии и морфологии представляет большой теоретический и практический интерес. Вопросы, касающиеся возрастных преобразований сосудистого русла тимуса позвоночных, изучены недостаточно, что создает основу для формирования противоречивых выводов. В складывающейся ситуации сравнительно-морфологическое изучение возрастных изменений сосудистого русла тимуса различных представителей типа хордовые, может внести весомый вклад в решение целого ряда научных проблем.

Цель работы заключалась в изучении изменений количества и площади различных групп сосудов мозгового и коркового вещества тимуса в сравнительно-морфологическом ряду позвоночных с учетом возраста.

Материалы и методы

Исследование тимуса проводили на примере 14-ти видов позвоночных, относящихся к четырем классам. Класс Земноводные (*Amphibia*), Лягушка прудовая, n 36 (*Rana esculenta*), Лягушка травяная, n 28 (*R. temporaria*), вид Лягушка остро-мордая, n 36 (*R. terrestris*). Класс Пресмыкающи-

еся (*Reptilia*), вид Ящерица прыткая, n 36 (*Lacerta agilis*), Гадюка обыкновенная, n 24 (*Vipera berus*), Уж обыкновенный, n 36 (*Natrix natrix*). Класс Птицы (*Aves*), Голубь сизый, n 36 (*Columba livia*), Галка обыкновенная, n 12 (*Corvus monedula*), Мухоловка серая, n 16 (*Muscicapa striata*). Класс Млекопитающие (*Mammalia*), Бурозубка обыкновенная, n 36 (*Sorex araneus*), Бурозубка средняя, n 24 (*S. caecutiens*), Рыжая полевка, n 46 (*Clethrionomys glareolus*), Мышь лесная, n 32 (*Apodemus uralensis*), Человек разумный, n 65 (*Homo sapiens*).

Исследование проводили на примере неполовозрелых особей и особей II периода зрелого возраста. Рамки соответствующего возраста человека определялись согласно классификации, принятой на 7-й Всесоюзной конференции по возрастной морфологии, физиологии и биохимии в 1965 году. Возраст животных определялся по общепринятым методикам [1, 12]. Исследовали неполовозрелых животных следующих возрастов: земноводные, пресмыкающиеся и птицы – 1-2 года, насекомоядные млекопитающие – 2-6 месяцев, грызуны – 1-2 месяца. На стадии второй зрелости исследовали животных следующих возрастов: земноводные, пресмыкающиеся и птицы – 5-6 лет, насекомоядные млекопитающие – 1-1,5 года, грызуны – 1 год. Отлов животных осуществляли на территории Смоленской области, в экосистемах, не нарушенных антропогенным воздействием. У человека изучали тимус новорожденных, погибших вследствие родовой травмы и насильственных причин. Тимус половозрелого человека изымали у трупов людей в возрасте от 35 до 60 лет. Для исследования тимуса человека использовали материал, набранный на базе отделения клинической патологии при Смоленском областном институте патологии. Весь секционный материал тщательно отбирали по анамнезу с целью исключения причин смерти, которые могли бы повлиять или резко изменить структуру тимуса. Всего изучено 249 препаратов неполовозрелых и 258 препаратов половозрелых позвоночных. Эвтаназию животных осуществляли передозировкой эфирным наркозом (ЗАО «Вектон») в соответствии с правилами утвержденными распоряжением Президиума АН СССР от 2 апреля 1980 № 12000-496, а также «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в научных целях» (Страсбург, 1986). Доли тимуса, изъятые сразу после эвтаназии, фиксировали 10% нейтральным формалином, обезво-

живали и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы (5 мкм) выполняли в сагиттальной и горизонтальной плоскостях, окрашивали гематоксилин-эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, альдегид-фуксином и смесью Halmi по Габу–Дыбану. Съемку препаратов проводили с использованием системы визуализации Sony Tour Cam 5.1. (Tourtek, Китай), установленной на микроскопе Микромед 3 Professional («Микромед», Китай). Морфометрические исследования препаратов тимуса проводили с помощью компьютерной программы на базе цифровой камеры Tourcam 5.0. Измеряли общую площадь гистологического препарата (окуляр × 5, объектив × 4). В процессе тотального изучения всей площади препарата измеряли общую площадь сосудистого русла тимуса, которую затем выражали в %, по отношению к площади среза (окуляр × 7, объектив × 20). С целью изучения отличий кровоснабжения мозгового и коркового вещества тимуса на условной единице площади (0,5 мм²)

подсчитывали количество и площадь сосудов (мкм²) микроциркуляторного русла (МЦР). Участки среза для подсчета сосудов выбирали в случайном порядке. На каждом препарате осуществляли подсчет на десяти таких участках. При идентификации звеньев микрососудистого русла за основу взяты общепринятые классификации [2]. Измеряли диаметры просвета (мкм) капилляров пре- и посткапиллярных сосудов, а также венул и артериол (окуляр × 15, объектив × 20; × 40). Значимость различий между сравниваемыми группами оценивали методами параметрической и непараметрической статистики.

Результаты

У позвоночных животных с возрастом происходит увеличение относительной площади сосудистого русла тимуса, хотя значимыми ($p \leq 0,05$) эти возрастные отличия оказываются только у ящериц, птиц и насекомоядных млекопитающих (табл. 1). Во всех изученных возрастах наиболее развитым кровеносным руслом тимуса

ТАБЛИЦА 1. НЕКОТОРЫЕ ПЛАНИМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КРОВЕНОСНОГО РУСЛА ТИМУСА ПОЗВОНОЧНЫХ (%)

TABLE 1. SOME PLANIMETRIC CHARACTERISTICS OF THE BLOOD VESSELS OF THE THYMUS OF VERTEBRATES (%)

	Неполовозрелые Immature			Половозрелые Adult		
	Относительная S сосудистого русла (%) Relative area of vascular bed (%)	Диаметр артериолл (мкм ²) Diameter of arterioles (μm ²)	Диаметр венул (мкм ²) Diameter of venules (μm ²)	Относительная S сосудистого русла (%) Relative area of vascular bed (%)	Диаметр артериолл (мкм ²) Diameter of arterioles (μm ²)	Диаметр венул (мкм ²) Diameter of venules (μm ²)
Земноводные Amphibians	0,80±0,22 c, d, e, f, g, h	25,54±3,25 h	38,80±4,27 d, e, h	1,023±0,24 d, e, f, g, h	21,50±2,76 c, d, h	35,02±4,31 h
Ящерицы Lizards	0,71±0,14* c, d, e, f, g, h	24,61±3,49 h	35,62±3,89 d, e, h	1,033±0,30* d, e, f, g, h	25,25±3,96 d, h	35,54±3,72 h
Змеи Snakes	1,04±0,18 d, e, f, g, h	24,25±4,21	35,41±4,51 d, e, h	1,205±0,23 d, e, f, h	28,04±3,25 a, d, h	38,94±4,74 h
Голубеобразные Dovey	2,12±0,31* a, b, c, g, h	24,89±2,98 *, h	56,71±4,68 *, a, b, c, f, g, h	2,810±0,52* a, b, c, g, h	36,66±4,11* a, b, c, e, f, g, h	36,33±4,63 *, h
Воробьеобразные Passerines	1,88±0,25* a, b, c, g, h	29,10±4,32	61,85±7,83 *, a, b, c, f, g, h	2,490±0,37* a, b, c, g, h	24,91±3,48 d, h	40,39±4,27 *, h
Насекомоядные млекопитающие Insectivorous mammals	2,05±0,33* a, b, c, g, h	26,25±3,51 h	33,62±2,69 d, e, h	2,506±0,43* a, b, c, g, h	24,38±2,96 d, h	39,58±4,15 h
Грызуны Rodents	1,33±0,37 a, b, c, d, e, f	28,19±4,11 h	42,71±5,81 d, e, h	1,469±0,35 a, b, d, e, f	24,57±3,01 d, h	34,26±3,67 h
Человек Human	1,56±0,31 a, b, c, d, e, f, g	80,73±10,82 a, b, c, d, e, f, g	92,38±10,11 a, b, c, d, e, f, g	1,750±0,36 a, b, c, d, e, f	85,38±9,78 a, b, c, d, e, f, g	109,32±11,1 a, b, c, d, e, f, g

Примечание. * – достоверность возрастных отличий ($p \leq 0,05$), достоверность отличий ($p \leq 0,05$) по сравнению: а – с земноводными, b – с ящерицами, c – со змеями, d – с голубеобразными, e – с воробьеобразными, f – с грызунами, g – с насекомоядными млекопитающими, h – с человеком.

Note. *, authenticity of age differences ($p \leq 0.05$), reliability of differences ($p \leq 0.05$) compared with: a – amphibians, b – lizards, c – snakes, d – dovey, e – passerines, f – rodents, g – insectivorous mammals, h – humans .

отличаются птицы и насекомоядные млекопитающие, тогда как у холоднокровных позвоночных изучаемые показатели снижены. У всех позвоночных животных диаметр артериол тимуса оказывается сходным и мало меняется с возрастом. Напротив, среди неполовозрелых позвоночных повышенные показатели диаметра венул тимуса характерны для птиц, у которых, в отличие от других животных, с возрастом происходит наиболее значительное снижение просвета венул. В результате в тимусе половозрелой возрастной группы у всех позвоночных изучаемые показатели выравниваются и значимость различий между сравниваемыми группами отсутствует (табл. 1). Как у половозрелых, так и у неполовозрелых позвоночных, включая человека, диаметр венул превышает соответствующие показатели артериол, что наиболее выражено у неполовозрелых птиц и половозрелых насекомоядных млекопитающих и земноводных (табл. 1). Диаметр прекапиллярных сосудов тимуса у неполовозрелых позвоночных изменяются в узких пределах: от $11,5 \pm 3,2$ мкм (пресмыкающиеся) до $14,4 \pm 3,8$ мкм (грызуны). У человека диаметр этих сосудов оказался повышенным ($16,2 \pm 4,4$ мкм). Статистическая обработка результатов показала значимость отличий при сравнении холоднокровных позвоночных с теплокровными. С возрастом увеличение диаметра прекапиллярных сосудов наблюдается только у амфибий и рептилий. В результате в тимусе различных групп половозрелых позвоночных просветы прекапиллярных сосудов оказываются сравнимыми. У позвоночных животных не наблюдается возрастных изменений диаметра капилляров тимуса. Наименьший диаметр данных сосудов характерен для мелких насекомоядных и грызунов: соответственно, $4,2 \pm 0,12$ и $5 \pm 0,10$ мкм. Увеличенным просветом капилляров отличается тимус человека ($6,3 \pm 0,54$ мкм) и земноводных ($7,4 \pm 0,71$ мкм). У пресмыкающихся и птиц размеры капилляров отличаются мало и изменяются в пределах $5 \pm 0,34$ – $6 \pm 0,31$ мкм. С возрастом увеличение диаметра капилляров тимуса (в пределах 1 мкм) наблюдается только у человека.

У земноводных и пресмыкающихся количество сосудов МЦР коры и мозгового вещества тимуса сопоставимо и практически не изменяется с возрастом. У птиц, как на стадии второй зрелости, так и у неполовозрелых представителей по сравнению с мозговым веществом, преобладает количество сосудов МЦР коры тимуса, которое превышает показатели холоднокровных позвоночных в 1,5–2 раза. В процессе старения количество сосудов МЦР в коре тимуса птиц снижается при неизменных показателях мозгового вещества. В результате микроциркуляторное русло половозрелых птиц по количеству сосудов сопоставимо с показателями земноводных и пресмыкающихся (рис. 1).

Напротив, млекопитающие отличаются от других групп позвоночных повышенным количеством сосудов МЦР в мозговом веществе тимуса по сравнению с его корой. У млекопитающих так же происходит возрастное увеличение количества сосудов МЦР тимуса. Однако значимыми эти различия оказываются только у насекомоядных млекопитающих. Поскольку возрастные изменения количества МЦР сосудов тимуса млекопитающих и птиц разнонаправленны, то с возрастом разрыв в показателях кровоснабжения тимуса мелких млекопитающих существенно возрастает по сравнению с птицами и холоднокровными позвоночными (рис. 1). Тимус человека особым образом отличается от всех изученных групп позвоночных. У неполовозрелого человека насыщение паренхимы тимуса сосудами МЦР максимально, как в коре, так и в мозговом веществе. Однако с возрастом в тимусе человека наблюдается значительное снижение этих показателей. В итоге у половозрелого человека кровоснабжение тимуса ухудшается, сравниваясь по своим характеристикам с холоднокровными позвоночными (табл. 1). У всех теплокровных позвоночных, в том числе и у человека, с возрастом отличия в количестве сосудов МЦР коры и мозгового вещества сглаживаются (отсутствует значимость различий), что напоминает ситуацию, характерную для тимуса холоднокровных позвоночных (рис. 1).

Возрастных изменений относительной площади сосудов микроциркуляторного русла тимуса у земноводных и ящериц не происходит (рис. 2). Неполовозрелые змеи отличаются от других групп холоднокровных позвоночных повышенной площадью сосудов МЦР коры и мозгового вещества тимуса. Однако в процессе старения эти показатели тимуса змей снижаются и в зрелом возрасте все представители холоднокровных позвоночных по площади сосудов тимуса оказываются сопоставимыми (рис. 2). Отличительной чертой возрастных изменений кровеносной системы тимуса птиц и млекопитающих является увеличение относительной площади сосудов МЦР коры и мозгового вещества у половозрелых представителей по сравнению с неполовозрелыми. Тимус птиц отличается от данного органа мелких млекопитающих более высокими показателями относительной площади сосудов МЦР в корковом веществе по сравнению с мозговым. Для млекопитающих характерна противоположная ситуация. У птиц в процессе возрастных изменений отличия между показателями коркового и мозгового вещества тимуса исчезают, тогда как у млекопитающих площадь сосудов МЦР в мозговом веществе по-прежнему превышает значения данного параметра коркового вещества тимуса (рис. 2). В целом мозговое вещество тимуса неполовозрелых птиц и холоднокровных позвоночных по показателям пло-

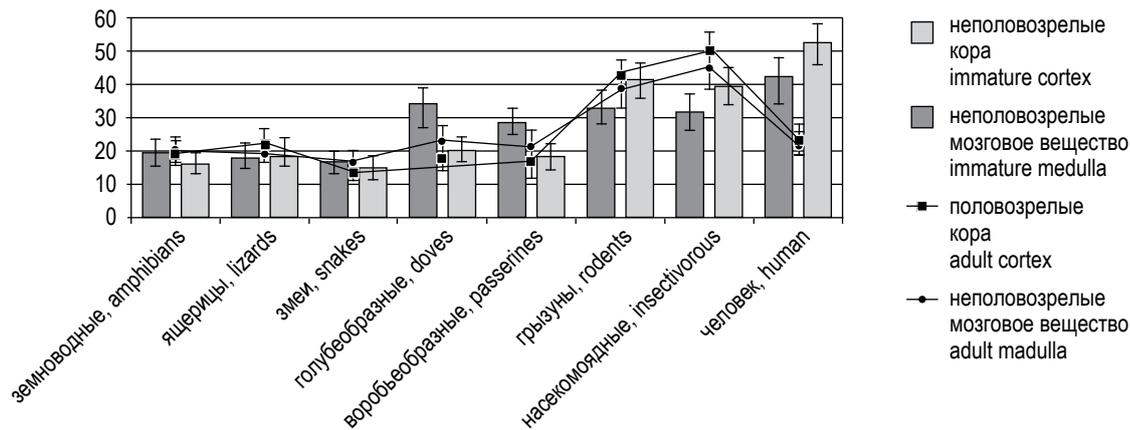


Рисунок 1. Количество сосудов микроциркуляторного русла на условной единице площади коркового и мозгового вещества тимуса (0,5 мм²)

Figure 1. The number of vessels of the microcirculatory bed on the conditional unit of the area of the cortical and medulla of the thymus (0.5 mm²)

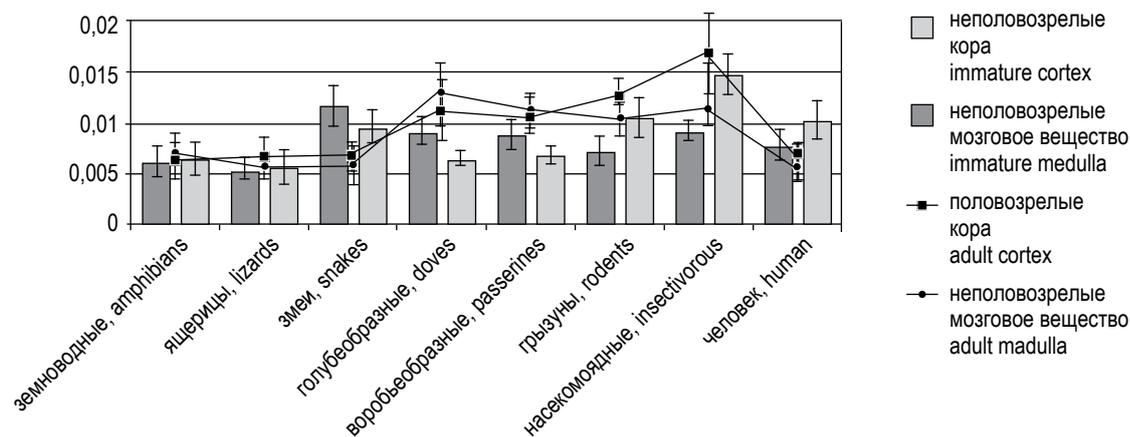


Рисунок 2. Площадь сосудов микроциркуляторного русла (мм²) на условной единице площади мозгового и коркового вещества тимуса (0,5 мм²)

Figure 2. The area of the vessels of the microcirculatory bed (mm²) on the conventional unit area of the brain and cortex of the thymus (0.5 mm²)

площади сосудов МЦР сопоставимо. Однако на стадии второй зрелости у птиц и млекопитающих площадь сосудов МЦР тимуса вдвое превышает значения соответствующих показателей тимуса холоднокровных позвоночных. По мере старения кровеносное русло тимуса человека, в отличие от других млекопитающих, изменяется в сторону снижения показателей относительной площади сосудов МЦР. В итоге тимус половозрелого человека по характеристикам сосудистого русла схож с тимусом холоднокровных позвоночных.

Обсуждение

Степень активности тимуса как органа эндокринной и лимфоидной систем в значитель-

ной степени зависит от характеристик кровоснабжения [4]. Более развитое сосудистое русло теплокровных позвоночных, в сравнении с холоднокровными представителями, не только увеличивает энергетическую емкость тканей тимуса, но и способствует существенному совершенствованию механизмов иммунной защиты [3]. Известно, что одной из возможных причин возрастной инволюции тимуса служат конкурентные взаимоотношения между иммунитетом и другими энергоемкими биологическими процессами, например размножением [6]. У теплокровных позвоночных такие межсистемные конкурентные взаимоотношения обострены, что и объясняет повышенную чувствительность по-

казателей кровеносного русла тимуса млекопитающих и птиц к возрастным изменениям. Одной из причин таких межсистемных перестроек у теплокровных животных является гормональный вектор, требующий непосредственного участия кровеносной системы. Неслучайно последнее время тимус расценивается как орган одновременно лимфоидной и эндокринной систем [5, 8]. Наиболее масштабные возрастные изменения кровеносной системы свойственны тимусу человека, что является свидетельством воздействия целого комплекса экстремальных факторов антропогенной среды [7]. Особенно следует обратить внимание на тот факт, что только у человека с возрастом увеличивается диаметр капилляров тимуса. Очевидно, в условиях стресса модулирующая роль эндотелиоцитов МЦР требует интенсификации обменного кровообращения и усиления рециркуляции тимоцитов [4]. Такие изменения позволяют компенсировать неблагоприятные воздействия антропогенного пресса на иммунитет. Совершенствование иммунной защиты во многом обеспечивается благодаря функциональной и морфологической специализации коркового и мозгового вещества тимуса, связанной с задачами формирования иммунокомпетентных Т-лимфоцитов [8]. Анализ состояния сосудистого русла тимуса показал, что расхождения в функциях коры и мозгового вещества тимуса формируются постепенно и окончательно устанавливаются только у теплокровных позвоночных. Развитие иммунной системы птиц и млекопитающих проходило независимыми путями. Изучение сосудов МЦР тимуса птиц свидетельствует о более интенсивных обменных

процессах в коре этого органа, тогда как у млекопитающих, включая человека, напротив – в его мозговом веществе. Такое перераспределение функциональной нагрузки опосредовано разнонаправленностью механизмов эндотелиальной регуляции функций тимуса [4], от которых во многом зависит диаметр просвета и площадь сосудов МЦР. Процесс возрастной инволюции нивелирует данные отличия, что особенно сильно заметно на примере тимуса человека. Вероятно, это событие можно расценивать как следствие существенного снижения функциональной активности тимуса, что вызывает ослабление иммунных барьеров и вполне естественно для зрелого возраста.

Таким образом, кровеносное русло тимуса является надежным индикатором возрастных изменений, отражает уровень организации, характеризует особенности морфофункционального состояния тимуса, а также прочно связано с образом жизни позвоночных.

Благодарности

Автор статьи выражает благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований.

Автор статьи выражает благодарность д.б.н., профессору Ерофеевой Людмиле Михайловне за консультативную помощь при написании научной работы.

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

Список литературы / References

1. Клевезаль Г.А. Принципы и методы определения возраста млекопитающих. М.: КМК, 2007. 282 с. [Klevezal G.A. Principles and methods of determinations of mammals]. Moscow: KMK, 2007. 282 p.
2. Куприянов В.В. Пути микроциркуляции. Кишинев: Карта Молдовенскэ, 1969. 254 с. [Kupriyanov V.V. Ways of microcirculation]. Kishinev: Carte Moldovenske, 1969. 254 p.
3. Andersson U., Tracey K.J. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 30, no. 1, pp. 313-335.
4. Danese S., Dejana E., Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 10, pp. 6017-6022.
5. Geenen V. The appearance of the thymus and the integrated evolution of adaptive immune and neuroendocrine systems. *Acta Clin. Belg.*, 2012, Vol. 67, no. 3, pp. 209-213.
6. Hareramadas B., Rai U. Thymic structural changes in relation to seasonal cycle and testosterone administration in wall lizard *Hemidactylus flaviviridis* (Ruppell). *Indian J. Exp. Biol.*, 2001, Vol. 39, no. 7, pp. 629-635.
7. McDade T.W. Life history theory and the immune system: steps toward a human ecological immunology. *Year Book Phys. Anthropol.*, 2012, Vol. 46, pp. 100-125.
8. Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol. Pathol.*, 2006, Vol. 34, no. 5, pp. 504-514.
9. Ribatti D., Crivellato E. Immune cells and angiogenesis. *J. Cell Mol. Med.*, 2009, Vol. 13, no. 9a, pp. 2822-2833.
10. Rodney Levic J., Charles Michel C. Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. *Cardiovascular Research*, 2010, Vol. 87, no. 2, pp. 198-210.
11. Scheiermann C., Frenette P.S., Hidalgo A. Regulation of leukocyte homeostasis in the circulation. *Cardiovascular Research*, 2015, Vol. 107, no. 3, pp. 340-351.
12. Smirina E.M. Age determination and longevity in amphibians. *Gerontology*, 1994, Vol. 40, no. 2-4, pp. 133-146.

Автор:

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

Поступила 12.11.2017

Отправлена на доработку 28.11.2017

Принята к печати 05.12.2017

Author:

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

Received 12.11.2017

Revision received 28.11.2017

Accepted 05.12.2017

ИНТРАНАЗАЛЬНЫЕ ИНГАЛЯЦИИ БИОАКТИВНЫХ ФАКТОРОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ М2-МАКРОФАГАМИ, В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С ОРГАНИЧЕСКИМИ ПОРАЖЕНИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

**Останин А.А., Давыдова М.Н., Старостина Н.М., Сахно Л.В.,
Шевела Е.Я., Черных Е.Р.**

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

Резюме. Цель исследования — оценить безопасность и клиническую эффективность ингаляционной иммунотерапии на основе интраназального введения биоактивных факторов, продуцируемых М2-макрофагами, при лечении пациентов с органическими поражениями головного мозга (ОПМ).

В исследование, которое проводили по протоколу NCT02957123 (www.ClinicalTrials.gov), были включены 30 больных (10 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 до 81; Me 62,5 лет) с ОПМ различного генеза. Оценку неврологического статуса и уровня 32 цитокинов в сыворотке крови больных проводили до начала курса ингаляционной иммунотерапии и через 2-3 дня после его завершения.

Курсовое лечение с использованием интраназальных ингаляций кондиционных сред М2-макрофагов (по 2 мл 1 раз в сутки в течение 28-30 дней) было безопасным и хорошо переносимым. Ни у одного из 30 пролеченных больных не было отмечено тяжелых нежелательных явлений и выраженных побочных реакций. Проведение ингаляционной иммунотерапии уже через 1 мес. после начала лечения сопровождалось положительной динамикой показателей неврологического статуса. При этом у 67% (20/30) больных регистрировался выраженный клинический ответ, который проявлялся коррекцией по всем используемым шкалам и вопросам. Достигнутый эффект сохранялся также и через 6 мес. наблюдения. У остальных пациентов (33%, 10/30) отмечался умеренный клинический ответ в виде коррекции баллов по отдельным шкалам. В целом по группе пролеченных больных (n = 30) отмечалось: 1) снижение на 43% уровня тревоги и депрессии (по шкале HADS, $p_U = 0,0008$); 2) увеличение на 25% общей двигательной активности (устойчивости и походки, $p_U = 0,0001$); 3) коррекция когнитивных функций (MoCa тест, $p_U = 0,007$); 4) сокращение количества и уменьшение интенсивности симптомов болезни на 52% ($p_U = 0,0001$). Установлено, что развитие выраженного клинического ответа на проводимую иммунотерапию сопряжено с коррекцией/нормализацией уровня фактора роста гепатоцитов (HGF) в сыворотке крови.

Ингаляционная иммунотерапия на основе интраназального введения биоактивных факторов, продуцируемых М2-макрофагами, позволяет повысить эффективность неврологического и функционального восстановления больных с органическими поражениями головного мозга.

Ключевые слова: макрофаги 2 типа, цитокины, интраназальные ингаляции, функциональное восстановление, органические поражения мозга

Адрес для переписки:

*Останин Александр Анатольевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 236-03-29.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: ostanin62@mail.ru; ct_lab@mail.ru*

Address for correspondence:

*Ostanin Alexander A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 236-03-29.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: ostanin62@mail.ru; ct_lab@mail.ru*

Образец цитирования:

*А.А. Останин, М.Н. Давыдова, Н.М. Старостина,
Л.В. Сахно, Е.Я. Шевела, Е.Р. Черных «Интраназальные
ингаляции биоактивных факторов, продуцируемых
М2-макрофагами, в лечении больных с органическими
поражениями головного мозга» // Медицинская
иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 577-588.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-577-588*

© Останин А.А. и соавт., 2018

For citation:

*A.A. Ostanin, M.N. Davydova, N.M. Starostina, L.V. Sakhno,
E.Ya. Shevela, E.R. Chernykh "Intranasal inhalations of bioactive
factors produced by M2 macrophages in the treatment of patients
with organic brain syndrome", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 577-588.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-577-588*

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-577-588

INTRANASAL INHALATIONS OF BIOACTIVE FACTORS PRODUCED BY M2 MACROPHAGES IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH ORGANIC BRAIN SYNDROME

Ostanin A.A., Davydova M.N., Starostina N.M., Sakhno L.V., Shevela E.Ya., Chernykh E.R.

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

Abstract. The aim of present study was to evaluate safety and clinical efficacy of inhalatory immunotherapy based on intranasal delivery of bioactive factors produced by M2 macrophages applied for treatment of patients with organic brain syndrome (OBS). Materials and methods. The study under the NCT02957123 protocol (www.ClinicalTrials.gov) included thirty patients with OBS of various genesis (10 men and 20 women aged 18 to 81; Me, 62.5 years). Neurological assessment and the levels of 32 cytokines in the blood serum of patients were evaluated before and 2-3 days after completion of inhalation immunotherapy.

Intranasal inhalations of cell-free culture medium of M2 macrophages (2 mL, once a day for 28-30 days) were safe and well tolerated. None of 30 treated patients had severe adverse events and serious treatment-related side reactions. One month after starting the inhalations, a positive dynamics in neurological status was noted in all the patients. A marked clinical response was documented in twenty out of thirty patients (67%), which manifested as improvement, according to all scales and questionnaires. The neurological improvement was not reversed over 6 months of follow-up period. In other ten patients (33%), a moderate clinical response was shown as improvement of individual scores. The positive changes were as follows: 1) a 43% decrease in anxiety and depression scores (according to HADS scale, $p_U = 0.0008$); 2) an increase of total motor activity (stability and gait) by 25%, $p_U = 0.0001$; 3) correction of cognitive functions (MoCa test, $p_U = 0.007$); 4) reduced number and intensity of the disease symptoms by 52% ($p_U = 0.0001$). This marked clinical response to immunotherapy is shown to be associated with correction/normalization of serum hepatocyte growth factor (HGF) level. Conclusion. Inhalation immunotherapy based on intranasal delivery of bioactive factors produced by M2 macrophages can improve neurological and functional recovery in patients with organic brain syndrome.

Keywords: M2 type macrophages, cytokines, intranasal inhalations, functional recovery, organic brain syndrome

Введение

Известно, что макрофаги играют центральную роль в заживлении различных тканей, в том числе в репарации нервной ткани [12, 18, 19, 31]. Однако биологические эффекты макрофагов могут существенно различаться в силу гетерогенности этой клеточной популяции. Наряду с «классическими» макрофагами 1-го типа (M1) описаны также различные типы альтернативно-активированных макрофагов 2-го типа (M2) [14].

Проведенный нами сравнительный анализ макрофагов 1 и 2 типа показал, что M2 характеризуются более низкой антигенпрезентирующей и провоспалительной активностью и при этом обладают более выраженным регенераторным потенциалом за счет высокого уровня продукции целого комплекса нейротрофических, нейропротективных и ангиогенных факторов [5, 24]. M2-макрофаги отличаются более низким уровнем продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-18) и хемокинов (IL-8, MCP-1), при этом активно секретируют эритропоэтин (EPO), а также фактор роста эндотелия

сосудов (VEGF), необходимый для ангио/васкулогенеза; инсулиноподобный ростовой фактор-1 (IGF-1), индуцирующий пролиферацию/дифференцировку нейронов, а также астроцитов и олигодендроцитов; ряд других ростовых факторов (BDNF, EGF, FGF-basic), которые могут повышать выживаемость, усиливать пролиферацию, дифференцировку/деление астроцитов, олигодендроцитов, нейронов и эндотелиальных клеток, а также стимулировать эндогенные, в том числе и нейральные прогениторные, клетки. Проведенные нами пилотные исследования M2-макрофагов показали безопасность и клиническую эффективность этих клеток при тяжелых формах ДЦП [6, 7] и у пациентов, перенесших церебральный инсульт [8].

Важно отметить, что наличие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) существенно ограничивает попадание клеток и цитокинов в паренхиму мозговой ткани при их системном (внутривенном) введении. В этой связи большой интерес вызывает интраназальный путь доставки лекарственных препаратов, включая цитокины. Действительно, интраназальный путь введения

позволяет добиться быстрого и эффективного попадания различных субстанций в ткани головного и спинного мозга [11]. В исследованиях на крысах было показано, что при интраназальном введении нейротрофических факторов и эритропоэтина эти цитокины проникают в ткани мозга через ольфакторный и тригеминальный пути, минуя ГЭБ [1, 26, 33]. Возможность попадания цитокинов в мозговую ткань при интраназальном введении показана также у приматов [27]. Более того, проникновение субстанций (например, инсулина) из носовой полости в ткани мозга продемонстрировано у человека [3, 16].

Поскольку кондиционные среды М2-клеток содержат широкий спектр нейротрофических, проангиогенных и иммунорегуляторных цитокинов, была сформулирована рабочая гипотеза, что интраназальное введение биоактивных факторов, продуцируемых М2-макрофагами, может стимулировать неврологическое восстановление. **Целью исследования** явилась оценка безопасности и клинической эффективности предложенного подхода при лечении пациентов с органическими поражениями мозга (ОПМ) различного генеза. Кроме того, планировалось оценить, влияет ли ингаляционная иммунотерапия на профиль цитокинов в сыворотке крови больных.

Материалы и методы

Набор пациентов в исследование проводили в соответствии с протоколом (NCT02957123, www.ClinicalTrials.gov), одобренным локальным этическим комитетом НИИФКИ.

В исследование были включены 30 больных (10 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 до 81; Me 62,5 лет) с ОПМ различного генеза. Из них 12 пациентов с последствиями ишемического (n = 10) и геморрагического (n = 2) инсульта; 15 пациентов с хронической ишемией головного мозга (ХИМ) II степени и по одному больному с последствиями перинатальной патологии ЦНС и черепно-мозговой травмы, а также с энцефалопатией сложного генеза.

Критериями включения больных в исследование являлись: 1) возраст от 18 лет и старше; 2) наличие неврологических нарушений (двигательные, когнитивные расстройства на фоне травматических, сосудистых, нейродегенеративных и других поражений головного мозга), верифицированных клинически и по результатам МРТ; 3) наличие письменного информированного согласия пациента или ближайших родственников. Критерии исключения: 1) психические расстройства; 2) глубокая деменция; 3) наличие судорожного синдрома; 4) выраженная декомпенсированная сердечно-сосудистая, дыхательная, печеночная или почечная недостаточность; 5) ВИЧ или неконтролируемая бактериальная,

грибковая или вирусная инфекция; 6) беременность; 7) онкология; 8) непереносимость гентамицина и/или множественная лекарственная аллергия.

Обследование больных ОПМ, включая оценку неврологического статуса и получение образцов сыворотки крови для анализа цитокинового профиля, проводили до начала курса ингаляционной иммунотерапии и через 2-3 дня после его завершения. Через 6 мес. наблюдения оценивали только неврологический статус.

Первичной конечной точкой являлась оценка безопасности, включающая анализ тяжелых нежелательных явлений и побочных реакций (аллергические, токсические, воспалительные реакции; неврологическое ухудшение, судорожный синдром) на фоне ингаляционного применения цитокинов. Вторичной конечной точкой являлось изменение неврологического статуса, которое оценивалось врачом-неврологом, в том числе с привлечением различных шкал и вопросников. В качестве основных были использованы: шкала субъективной оценки клинических симптомов (СОКС); госпитальная шкала тревоги и депрессии (HADS); шкала двигательной активности (ШДА) и Монреальская шкала оценки когнитивных функций (MoCa).

СОКС является 5-балльной рейтинговой шкалой со стандартизированными критериями субъективной оценки выраженности (0 – нет; 1 – легкая; 2 – умеренная; 3 – выраженная; 4 – интенсивная) 15 различных симптомов заболевания (головная боль, головокружение, нарушение походки, речевые, зрительные нарушения, тремор и т.д.) в диапазоне от 0 до 60 баллов.

Шкала HADS позволяет диагностировать отсутствие достоверно выраженных симптомов тревоги/депрессии (на уровне 0-7 баллов); субклиническую (8-10 баллов) и клиническую (от 11 баллов и выше) форму тревоги/депрессии.

ШДА предназначена для оценки показателей, характеризующих устойчивость (0-24 балла) и походку (0-16 баллов). Максимальный для каждого задания балл соответствует норме, 0 – грубому нарушению. Степень нарушения общей двигательной активности (суммарный бал по субшкалам устойчивости и походки) определяется как значительная – в интервале 0-20; умеренная – 21-33; легкая – 34-38 баллов. Об отсутствии нарушений свидетельствуют 39-40 баллов.

С помощью MoCa-теста оцениваются когнитивные функции – «зрительно-конструктивные навыки», «называние», «внимание», «речь», «абстрактное мышление», «отсроченное воспроизведение заученных слов», «ориентация в месте и времени». 26-30 баллов – норма; 19-25 – умеренное когнитивное расстройство; 11-21 – деменция. В случае перекрытия баллов (19-21)

диагноз требует уточнения на основании клинической картины заболевания.

Получение кондиционных сред М2-макрофагов

М2-макрофаги генерировали из прилипающей фракции мононуклеарных клеток (МНК), как описано ранее [5, 24]. МНК выделяли стандартно из гепаринизированной венозной крови (150–200 мл) пациента и инкубировали ($3-5 \times 10^6$ /мл) в течение 18–24 ч при 37 °С и 5% CO₂ во флаконах (150 см², TPP) в среде RPMI-1640, содержащей 0,05 mM 2-меркапэтанола, 2 mM пирувата натрия, 0,3 mg/ml L-глутамина, 1% раствора незаменимых аминокислот, 100 µg/ml гентамицина, 2% аутоплазмы и рекомбинантный GM-CSF человека (rhGM-CSF, 50 нг/мл, R&D Systems). Затем фракцию неприкрепившихся к пластику клеток удаляли, а фракцию адгезивных клеток ($\approx 90-95\%$ CD14⁺ моноцитов) продолжали культивировать в среде RPMI-1640 (в том же составе) в течение 7 сут. Кондиционную среду полученных таким образом М2-макрофагов собирали в стерильные флаконы (2 мл/флакон, n = 28–30), которые маркировали и хранили при температуре -20 °С.

Ингаляционная иммунотерапия

Кондиционную среду аутологичных М2-макрофагов размораживали при комнатной температуре и использовали в виде мелкодисперсного аэрозоля интраназально с помощью компрессорного ингалятора (небулайзера) по 2 мл 1 раз в сутки курсом в течение от 28 до 30 дней. Первые 2–3 ингаляции проводили под контролем врача. Пациента обучали обращению с небулайзером и правильному дыханию, и последующее лечение пациент проводил самостоятельно в амбулаторном режиме.

Оценка цитокинового профиля в сыворотке крови

Забор венозной крови проводили по общепринятым правилам в вакуумные пробирки Vacutest (№ 11030, Clot activator, 9 мл, Vacutest Kima, Италия). В образцах сыворотки крови определяли концентрацию цитокинов методом проточной флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих Human Cytokine 21- и 8-plex тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Панель 21-plex включала IL-1 α , IL-2R α , IL-3, IL-12p40, IL-16, IL-18, STACK (cutaneous T cell-attracting chemokine, CCL27), GRO- α (growth-regulated oncogene- α , CXCL1), HGF (hepatocyte growth factor), IFN α 2, LIF (leukemia inhibitory factor), MCP-3 (monocyte chemotactic protein-3, CCL7), M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), MIF (macrophage migration inhibitory factor), MIG (monokine induced by IFN γ , CXCL9), β -NGF (β -nerve growth

factor), SCF (stem cell factor), SCGF- β (stem cell growth factor- β), SDF-1 α (stromal cell-derived factor 1 α , CXCL12a), TNF β (tumor necrosis factor- β), и TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Панель 8-plex включала IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN γ , TNF α . Дополнительно в исследуемых образцах сыворотки методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию MCP-1 (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), BDNF (brain-derived neurotrophic factor; Abcam) и общего IGF-1 (insulin-like growth factor-1; R&D Systems).

С целью корректной оценки профиля сывороточных цитокинов и определения соответствующей возрастной нормы была подобрана контрольная, референсная группа из 10 условно здоровых добровольцев из работающего персонала Института. Группа контроля была сопоставима с больными по полу (6 мужчин и 4 женщины, $r_{\text{TMF}} = 0,44$), возрасту (от 51 до 67; Me 60,5 лет, $r_U = 0,4$) и структуре/частоте факторов риска (курение, артериальная гипертензия, ожирение).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде медианных (Me) значений и интерквартильного диапазона (IQR, 25–75% квантили). Для проверки нормальности распределения признаков использовали тест Колмогорова–Смирнова и W-критерий Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности различий использовали точный критерий Фишера (r_{TMF} для дискретных переменных) и непараметрический критерий Манна–Уитни (r_U для непрерывных переменных). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции по Спирмену.

Результаты

До начала ингаляционной иммунотерапии больные с ОПМ чаще всего отмечали наличие таких симптомов, как головная боль, головокружение, утомляемость/астения, нарушение походки, эмоциональная лабильность, когнитивные и речевые расстройства. Из данных таблицы 1 видно, что исходно по шкале СОКС медиана по группе составила 14,5 баллов (IQR 11–17). Из 30 опрошенных только у 4 пациентов отсутствовали симптомы тревоги/депрессии, тогда у 6 (20%) и 20 (67%) больных определялось наличие субклинически и клинически выраженной тревоги/депрессии соответственно (HADS Me = 14; IQR 9–21). Координационно-двигательные нарушения регистрировались практически в 100% случаев. По шкале двигательной активности медиана по группе составила 30 баллов (IQR 25–35).

Нарушения устойчивости и походки умеренной (на уровне 21-33 балла) или легкой (34-38 балла) степени выраженности обнаруживались у 20 (67%) и 9 (30%) больных соответственно. 53% больных (16/30) характеризовались наличием умеренных когнитивных расстройств (MoCa менее 25 баллов). Кроме того, 3 пациента вообще не могли выполнить MoCa тест из-за афазии (n = 1) или алексии (n = 2, нарушение способности к чтению).

Курсовое лечение с использованием интраназальных ингаляций кондиционных сред аутологичных M2-макрофагов было безопасным и хорошо переносимым. Ни у одного из 30 пролеченных больных не было отмечено тяжелых нежелательных явлений и выраженных побочных реакций. Только 1 больной отмечал заложенность носа в течение 1,5 ч после ингаляции, и еще в одном случае регистрировалось усиление отделяемого из носа. Эти реакции купировались самостоятельно и не требовали медикаментозного лечения.

Динамику изменений неврологического статуса больных оценивали через 1 и 6 мес. после начала ингаляционной иммунотерапии (табл. 1). Уже через 1-2 дня после завершения курса ингаляций (через 1 мес. после начала лечения) отме-

чалась статистически значимая коррекция баллов по всем используемым шкалам. Достигнутый клинический результат был стойким, поскольку сохранялся и через 6 мес. наблюдения. К этому сроку у пролеченных больных (n = 30) отмечалось: 1) достоверное снижение на 43% уровня тревоги и депрессии (с исходных 14 до 8 баллов, $p_U = 0,0008$); 2) увеличение на 25% общей двигательной активности (с исходных 30 до 37,5 баллов, $p_U = 0,0001$); а также коррекция когнитивных функций ($p_U = 0,007$). При этом важно отметить, что один из трех пациентов с алексией/грубой афазией смог частично пройти MoCa-тест на 12 баллов.

Регистрировалось также двукратное снижение (на 52%, $p_U = 0,0001$) балла по шкале СОКС в среднем с 14,5 до 7 баллов. При анкетировании и опросе больные отмечали не только сокращение количества, но и снижение выраженности отдельных симптомов болезни. Положительный клинический эффект проявлялся в виде уменьшения интенсивности головных болей, головокружения, шума в голове/ушах, координационных нарушений, астении, эмоциональной лабильности. Большинство (более 70%) пролеченных больных изъявили желание повторить

ТАБЛИЦА 1. НЕВРОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ С ОПМ (n = 30) ДО И ЧЕРЕЗ 1 И 6 МЕС. ПОСЛЕ НАЧАЛА ИНГАЛЯЦИОННОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

TABLE 1. NEUROLOGICAL STATUS OF PATIENTS WITH OBS (n = 30) BEFORE AND 1 AND 6 MONTHS AFTER THE INHALATION IMMUNOTHERAPY STARTING

Шкалы Scales		До терапии Before therapy	Через 1 мес. After 1 month	Через 6 мес. After 6 months
СОКС SACS	M±SE	15,0±1,0	9,9±1,1***	8,4±1,2***
	Median	14,5	8,5	7
	IQR	1-17	5-14	4-12
HADS	M±SE	15,1±1,2	9,3±0,9***	8,8±1,1***
	Median	14	9	8
	IQR	9-21	6-11	5-13
ШДА MAS	M±SE	29,9±1,1	34,7±0,9**	35,9±0,9***
	Median	30	36	37,5
	IQR	25-35	26-29	34-39
MoCa	M±SE	24,7±0,6	27,1±0,6**	26,6±0,9**
	Median	25	28	28,5
	IQR	23-27	26-29	24-29

Примечание. Здесь и в таблице 2: шкала субъективной оценки клинических симптомов (СОКС); госпитальная шкала тревоги и депрессии (HADS); шкала двигательной активности (ШДА); Монреальская шкала оценки когнитивных функций (MoCa).

*** – $p_U < 0,001$; ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различия по сравнению с показателями до начала терапии (U-критерий Манна-Уитни).

Note. Here and in Table 2: scale of subjective assessment of clinical symptoms (SACS); hospital anxiety and depression scale (HADS); mobility activity scale (MAS); Montreal cognitive assessment (MoCa).

***, $p_U < 0,001$; **, $p_U < 0,01$ – the significance of differences compared with data before therapy (Mann-Whitney U test).

курс ингаляционной иммунотерапии уже вне рамок проводимых клинических испытаний.

Анализ динамики изменений неврологического статуса на уровне индивидуальных значений позволил выделить две подгруппы больных, которые были сопоставимы по полу и возрасту, а также по выраженности неврологического дефицита (баллы по шкалам) и нозологической структуре ОПМ. В то же время больные в сформированных подгруппах различались по выраженности клинического ответа на проводимую ингаляционную иммунотерапию (табл. 2). Подгруппа 1 включала 20 пациентов (20/30, 67%) с выраженным клиническим ответом, который уже через 1 мес. после начала лечения проявлялся статистически значимой коррекцией показателей по всем используемым шкалам и сохранялся в течение 6 мес. наблюдения. Подгруппу 2 составили 10 больных с умеренным клиническим ответом. У этих больных также регистрировались положительные сдвиги, но только по отдельным шкалам, поэтому коррекция на уровне средних групповых значений не была достоверной.

Одной из задач исследования являлась оценка цитокинового статуса у больных с ОПМ в динамике проведения ингаляционной иммунотерапии. Из мультиплексной, диагностической панели уровень IL-1 α , TNF β , IL-12p40, LIF, M-CSF и SCGF- β в сыворотке крови больных и здоровых добровольцев выходил за нижнюю границу чувствительности используемых тест-систем. Поэтому они были исключены из дальнейшего

статистического анализа. Для удобства восприятия материала оставшиеся цитокины с учетом их функциональной активности были нами отнесены к нескольким подгруппам (табл. 3). Подгруппа провоспалительных и проапоптотических цитокинов включала IL-18, MIF, IFN α 2, TNF α и TRAIL; подгруппа Th1- и Th2-цитокинов – IL-2, IL-2R α , IFN γ и IL-4, IL-6, IL-10 соответственно; подгруппа нейротрофических и ангиогенных факторов – BDNF, β -NGF, IGF-1 и HGF; подгруппа гемопоэтических факторов – SCF, IL-3 и GM-CSF; подгруппа хемокинов – IL-16, STACK, GRO- α , IL-8, MCP-3, MCP-1, MIG и SDF-1 α .

Из данных таблицы 3 видно, что в сыворотке крови больных ОПМ до начала лечения обнаруживается многокомпонентный дефицит цитокинов. По сравнению с контролем достоверно снижено содержание провоспалительных (MIF) и проапоптотических (TRAIL) цитокинов, растворимого рецептора IL-2 (IL-2R α) и Th2-цитокинов (IL-6, IL-10), отдельных хемокинов (IL-16, STACK, GRO- α), а также на уровне отчетливого тренда – IL-8, MCP-3 и MCP-1 и, что важно отметить, нейротрофических (BDNF) и ангиогенных (HGF) факторов ($p_U < 0,01$).

Корреляционный анализ в общей выборке условно здоровых доноров ($n = 10$) и больных ОПМ, обследованных до терапии ($n = 15$), выявил наличие прямой взаимосвязи возраста обследованных с уровнем MIG ($r_s = 0,47$; $p = 0,017$; $n = 25$) и об-

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ С ВЫРАЖЕННЫМ (ПОДГРУППА 1, $n = 20$) И УМЕРЕННЫМ (ПОДГРУППА 2, $n = 10$) КЛИНИЧЕСКИМ ОТВЕТОМ

TABLE 2. DYNAMICS OF NEUROLOGICAL STATUS IN PATIENTS WITH MARKED (SUBGROUP 1, $n = 20$) AND MODERATE (SUBGROUP 2, $n = 10$) CLINICAL RESPONSE

Группы Groups	Обследование Testing	СОКС SACS	HADS	ШДА MAS	MoCa
Подгруппа 1 Subgroup 1	До терапии Before therapy	14 (10,5-16,5)	15,5 (9-21)	32 (27,5-35,5)	25 (23-27)
	Через 1 мес. After 1 month	8 (4-10)**	8 (5,5-10,5)**	37 (33-39)**	29 (27-30)**
	Через 6 мес. After 6 months	5 (3-7)**	5,5 (4-13)**	38,5 (36-40)**	29 (28-30)**
Подгруппа 2 Subgroup 2	До терапии Before therapy	17 (13-24)	13,5 (11-18)	26 (21-31)	24 (23-27,5)
	Через 1 мес. After 1 month	14 (7-22) $p_U = 0,17$	10 (8-15) $p_U = 0,18$	34 (26-37) $p_U = 0,11$	25 (24-27,5) $p_U = 0,52$
	Через 6 мес. After 6 months	13 (7,5-18) $p_U = 0,10$	11,5 (7,5-15) $p_U = 0,20$	34 (28,5-37) $p_U = 0,06$	24 (24-29) $p_U = 0,38$

Примечание. См. примечание к таблице 1. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различия по сравнению с показателями до начала терапии (U-критерий Манна–Уитни).

Note. As for Table 1. Data are presented as median and interquartile range (in brackets); **, $p_U < 0,01$ – the significance of differences compared with data before therapy (Mann–Whitney U test).

ратной зависимости с IGF-1 ($r_s = -0,59$; $p = 0,002$; $n = 25$).

Исходно выявленный дефицит цитокинов сохранялся в целом у больных ОПМ и после окончания курса ингаляционной иммунотерапии (табл. 3). По сравнению с контролем концентрация TRAIL, IL-2R α , GRO- α , BDNF и HGF

оставалась на низком уровне ($p_U < 0,05$). Содержание IL-6, IL-10 и ряда хемокинов (IL-16, IL-8, MCP-3 и MCP-1) также было снижено, хотя различия с донорами не были статистически значимы ($p_U > 0,05$). После лечения отмечалась только нормализация уровня MIF (в среднем с 91 до 179 пг/мл vs 200 пг/мл у доноров) и СТАК

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ОПМ ДО И ЧЕРЕЗ 1 МЕС. ПОСЛЕ НАЧАЛА ИНГАЛЯЦИОННОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

TABLE 3. SERUM CYTOKINE LEVEL IN PATIENTS WITH OBS BEFORE AND 1 MONTH AFTER THE INHALATION IMMUNOTHERAPY STARTING

Группы цитокинов (пг/мл) Groups of cytokines (pg/mL)		Контроль Control (n = 10)	До терапии Before therapy (n = 15)	Через 1 мес. After 1 month (n = 15)	p	p
		1	2	3	2 vs 1	3 vs 1
Группа 1 Group 1	IL-18	4,5 (1,0-10,2)	1,9 (1,0-3,2)	3,2 (0,6-5,5)		
	MIF	200 (92-261)	91 (68-157)*	179 (120-371)	0,046	0,8
	IFN α 2	28 (20-57)	29 (9-37)	23 (6-34)		
	TNF α	73 (68-134)	71 (6-111)	61 (7-241)		
	TRAIL	32 (26-47)	22 (9-31)*	15 (1,5-44)*	0,02	0,03
Группа 2 Group 2	IL-2	18 (16-25)	12 (1,5-21)	11 (1,5-52)		
	IL-2R α	27 (23-57)	19 (6-28)*	18 (3-24)*	0,02	0,02
	IFN γ	464 (200-774)	340 (44-564)	260 (76-1280)		
	IL-4	18 (14-27)	17 (6-22)	17 (7-38)		
	IL-6	28 (24-61)	23 (4-26)*	12 (4-96)	0,049	0,37
	IL-10	15 (12-21)	7,0 (2-12)*	5,0 (2-41)	0,05	0,62
Группа 3 Group 3	HGF	60 (33-121)	14 (4-33)**	19 (5-71)*	0,0009	0,05
	BDNF	12570 (10610-14000)	6740 (3600-9410)**	8160 (2540-10390)*	0,01	0,02
	IGF-1 (нг/мл)	125 (112-140)	107 (97-131)	114 (89-196)		
	β -NGF	36 (22-60)	36 (18-44)	27 (13-47)		
Группа 4 Group 4	SCF	43 (33-48)	29 (19-43)	32 (24-38)		
	IL-3	64 (59-92)	59 (13-89)	31 (13-86)		
	GM-CSF	63 (60-104)	37 (5-86)	35 (5-165)		
Группа 5 Group 5	IL-16	154 (150-240)	104 (10-147)**	87 (7-210)	0,007	0,12
	СТАК	232 (202-374)	128 (98-194)*	240 (94-294)	0,04	0,37
	GRO- α	39 (34-69)	17 (4-34)**	4,0 (3-38)*	0,003	0,04
	IL-8	58 (54-72)	39 (6-72)	44 (15-127)		
	MCP-3	32 (29-69)	16 (2-39)	20 (2-45)		
	MCP-1	170 (140-200)	125 (79-214)	129 (84-191)		
	MIG	178 (113-390)	164 (5-414)	78 (5-363)		
	SDF-1 α	265 (240-366)	200 (126-309)	168 (74-315)		

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); p – U-критерий Манна–Уитни. Группа 1 – провоспалительные и проапоптотические цитокины; группа 2 – Th1- и Th2-цитокины; группа 3 – нейротрофические и ангиогенные факторы; группа 4 – гемопоэтические факторы; группа 5 – хемокины.

Note. Data are presented as median and interquartile range (in brackets); p, Mann–Whitney U test. Group 1, pro-inflammatory and pro-apoptotic cytokines; group 2, Th1 and Th2 cytokines; group 3, neurotrophic and angiogenic factors; group 4, hematopoietic factors; group 5, chemokines.

(CCL27, в среднем с 128 до 240 пг/мл vs 232 пг/мл у доноров).

Интересным оказался тот факт, что больные с выраженным и умеренным клиническим ответом на ингаляционную иммунотерапию различались между собой по исходному (до начала лечения) содержанию цитокинов в сыворотке крови. При этом больные, которые хорошо ответили на терапию, характеризовались более выраженными нарушениями цитокинового профиля (табл. 4). Видно, что по сравнению с группой контроля у больных в подгруппе 1 была достоверно снижена концентрация 13 цитокинов (TRAIL, IL-2, IL-2R α , IFN γ , IL-6, IL-10, HGF, BDNF, GM-CSF, IL-16, STACK, GRO- α , IL-8), тогда как у больных с умеренным ответом – только 3 (HGF, IL-16, GRO- α). При этом по уровню IL-2, IFN γ , IL-6 и GM-CSF больные подгруппы 1 отличались также и от больных 2-ой подгруппы ($p_U < 0,05$).

Оценка содержания цитокинов в сыворотке крови до и после окончания курса ингаляционной иммунотерапии не выявила каких-либо статистически значимых различий у больных с умеренным неврологическим улучшением. В то же время у больных с выраженным клиническим ответом концентрация MIF возрастала до уровня нормальных значений (в среднем с 90 до 180 пг/мл, $p_U = 0,02$ vs 200 пг/мл у доноров). Кроме того, отмечалось восстановление уровня HGF (в среднем с 17 до 68 пг/мл, $p_U = 0,05$ vs 62 пг/мл у доноров).

Из данных, представленных на рисунке 1, видно, что увеличение содержания HGF после окончания иммунотерапии отмечалось в 78% случаев (у 7/9 больных) в подгруппе 1 и только у одного из 6 пролеченных больных из оппозитной 2-ой подгруппы (16,5%, $p_{ТМФ} = 0,04$).

Корреляционный анализ в общей выборке больных ОПМ, обследованных до и после терапии, выявил прямую корреляционную взаимо-

ТАБЛИЦА 4. ИСХОДНЫЙ УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ВЫРАЖЕННЫМ (ПОДГРУППА 1) И УМЕРЕННЫМ (ПОДГРУППА 2) КЛИНИЧЕСКИМ ОТВЕТОМ

TABLE 4. BASELINE SERUM CYTOKINE LEVEL IN PATIENTS WITH MARKED (SUBGROUP 1) AND MODERATE (SUBGROUP 2) CLINICAL RESPONSE

Цитокины (пг/мл) Cytokines (pg/mL)	Контроль Control (n = 10)	Больные с ОПМ Patients with OBS		p		
		Подгруппа 1 Subgroup 1 (n = 9)	Подгруппа 2 Subgroup 2 (n = 6)	*	#	*
	1	2	3	2 vs 1	2 vs 3	3 vs 1
MIF	200 (92-261)	90 (71-157)	86 (65-100)	0,07		0,12
TRAIL	32 (26-47)	22 (9-29)*	24 (14-31)	0,03		0,10
IL-2	18 (16-25)	6,5 (1,5-12)** #	19 (16-33)	0,009	0,05	0,66
IL-2R α	27 (23-57)	18 (6-28)*	22 (8-24)	0,04		0,06
IFN γ	464 (200-774)	120 (38-340)* #	526 (360-930)	0,05	0,04	0,62
IL-6	28 (24-61)	4,0 (4-25)** #	29 (23-76)	0,004	0,04	0,99
IL-10	15 (12-21)	2,5 (2-10)*	12 (7-27)	0,01	0,12	0,66
HGF	60 (33-121)	17 (5-30)**	5,0 (4-33)**	0,004	0,34	0,006
BDNF	12570 (10610-14000)	7250 (2100-9410)*	6560 (5960-8120)	0,01		0,10
SCF	43 (33-48)	27 (20-43)	40 (13-42)	0,06		0,23
GM-CSF	63 (60-104)	17 (4,5-37)* #	72 (57-146)	0,02	0,05	0,91
IL-16	154 (150-240)	104 (10-125)*	138 (61-147)*	0,02		0,03
STACK	232 (202-374)	112 (5-182)*	157 (102-232)	0,03		0,28
GRO- α	39 (34-69)	4,0 (4-30)**	20 (3-47)*	0,003	0,72	0,05
IL-8	58 (54-72)	25 (6-47)*	62 (39-120)	0,02	0,11	0,91
MCP-1	170 (140-200)	121 (68-162)	156 (122-214)	0,06		0,74

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); p – U-критерий Манна–Уитни.

Note. Data are presented as median and interquartile range (in brackets); p, Mann–Whitney U test.

связь уровня HGF с BDNF ($r_s = 0,46$; $p = 0,01$; $n = 30$). Наличие такой взаимосвязи свидетельствует, что клинически значимый ответ на проводимую иммунотерапию сопряжен не только с коррекцией уровня циркулирующего HGF, но и с увеличением концентрации BDNF – факторов, играющих ключевую роль в ангиогенезе и репаративных процессах (HGF) и обеспечивающих нейрогенез, синаптогенез и протекцию нейронов в ЦНС (BDNF).

Обсуждение

Нервная и иммунная системы являются основными регуляторными гомеостатическими системами организма, функционирование которых тесно взаимосвязано. Установлено, что различные биоактивные факторы (цитокины, ростовые и трофические факторы, хемокины) играют определяющую роль в психонейроиммунных взаимоотношениях, поскольку как сами биоактивные факторы, так и рецепторы к ним продуцируются и экспрессируются иммунокомпетентными клетками (Т-лимфоцитами, макрофагами) и клетками нервной системы (микроглией, нейронами, олигодендроцитами). Таким образом, обеспечивается адекватная сопряженная работа иммунной и нервной систем [20].

Цитокины играют исключительно важную роль в регуляции нейрорепаративных процессов. Нейротрофические факторы (NGF, BDNF, GDNF, NT 4/5) и ряд ростовых факторов (IGF-1, bFGF, EGF, EPO, VEGF) стимулируют миграцию, пролиферацию и дифференцировку нейральных стволовых клеток, рост аксонов, синаптогенез и образование новых сосудов [10, 21, 30]. Указанные факторы в наибольших количествах продуцируются мезенхимальными стромальными клетками, а также макрофагами 2-го типа [5, 13].

Проведенные нами клинические исследования показали, что использование 1) кондиционной среды M2-макрофагов в качестве терапевтического средства и 2) интраназальных ингаляций в качестве способа доставки биоактивных факторов через слизистую обонятельных зон является безопасным, хорошо переносимым и, по предварительным данным, клинически эффективным в лечении пациентов с ОПМ различного генеза. Проведение ингаляционной иммунотерапии не сопровождалось развитием серьезных нежелательных явлений и побочных реакций. Через 2-3 дня после завершения курса ингаляций в целом по группе регистрировалось статистически достоверное снижение уровня тревоги и депрессии; увеличение общей двигательной активности (устойчивости и походки); коррекция когнитивных функций; сокращение количества и уменьшение интенсивности симптомов болезни.

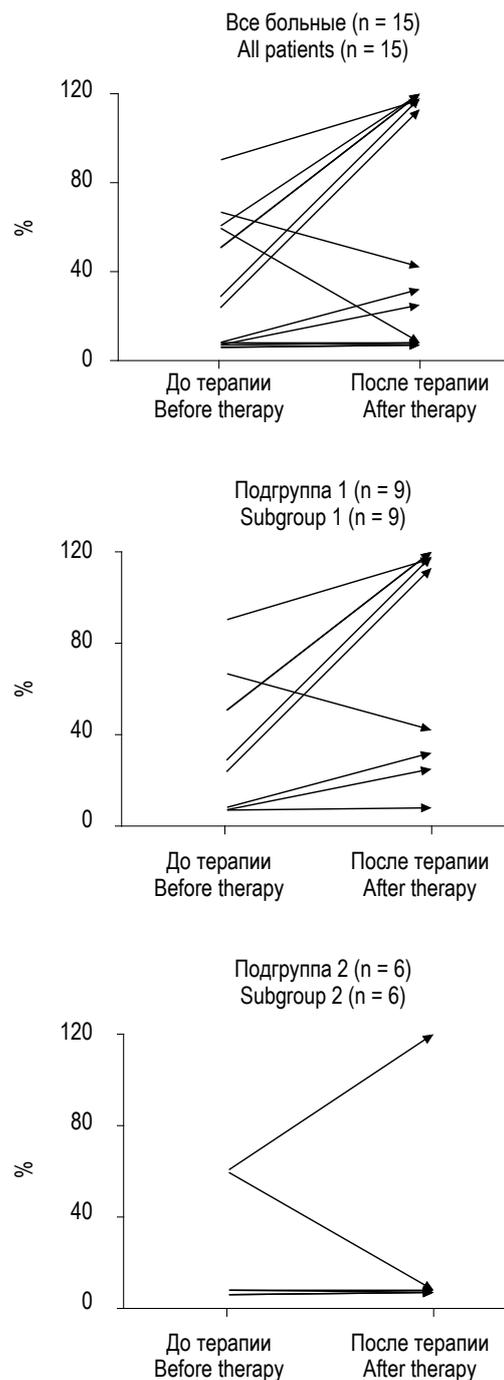


Рисунок 1. Изменение сывороточного уровня HGF у больных с ОПМ в динамике ингаляционной иммунотерапии

Примечание. Данные представлены в виде относительной величины от медианного значения контрольной группы (62 пг/мл; $n = 10$), принятого за 100%. Подгруппа 1 – больные с выраженным и подгруппа 2 – с умеренным клиническим ответом на терапию.

Figure 1. Change in serum HGF level in patients with OBS in the dynamics of inhalation immunotherapy

Note. The data are presented as a relative value of the median of the control group (62 pg/mL, $n = 10$) taken as 100%. Subgroup 1, patients with marked; subgroup 2, with moderate clinical response to therapy.

Больные отмечали уменьшение головных болей, головокружения, шума в голове/ушах, координационных нарушений, астении, эмоциональной лабильности, что в конечном итоге приводило к улучшению активности, коммуникационных возможностей и нормализации эмоционального фона. Клинический эффект проявлялся достаточно быстро — уже через месяц после первой ингаляции, и сохранялся в течение 6-месячного срока последующего наблюдения.

Несмотря на общую положительную динамику, индивидуальный анализ изменений неврологического статуса позволил выделить больных с выраженным ($n = 20,67\%$) и умеренным ($n = 10,33\%$) клиническим ответом на проводимую терапию.

При оценке уровня цитокинов в сыворотке крови у этих больных неожиданным для нас оказалось два наблюдения. Во-первых, больные, которые хорошо ответили на ингаляционную иммунотерапию, отличались более выраженными нарушениями цитокинового профиля. По сравнению с донорами у больных с умеренным клиническим ответом был достоверно снижен уровень HGF, IL-16 и GRO- α , тогда как у больных с выраженным клиническим ответом в дополнение к ним — TRAIL, IL-2, IL-2R α , IFN γ , IL-6, IL-10, BDNF, GM-CSF, CTACK и IL-8.

Во-вторых, несмотря на то, что у больных в целом, и особенно у пациентов с умеренным клиническим ответом, проведение курса ингаляционной иммунотерапии не сопровождалось статистически значимой коррекцией цитокинового статуса на системном уровне, в подгруппе больных с выраженным клиническим ответом отмечалась нормализация концентрации MIF и HGF в крови. В частности, в этой группе прирост в уровне HGF регистрировался в 78%, тогда как в оппозитной 2-ой подгруппе — только в 16,5% случаев ($p_{\text{ТМФ}} = 0,04$). Характерно при этом, что уровень HGF прямо коррелировал с концентрацией BDNF ($r_s = 0,46$; $p = 0,01$). Схожие данные были получены Baum E. и соавт., которые у больных с тяжелой почечной недостаточностью показали, что повышение уровня HGF в сыворотке крови после проведения процедуры гемодиализа прямо коррелирует ($R = 0,469$, $P < 0,001$) с показателями качества жизни по анкете KDQoL-SF (Kidney Disease Quality of Life Short Form) [2].

HGF — это полифункциональный цитокин, который обладает ангиогенной, противовоспалительной, антиапоптотической и антифибротической активностями [23]. Благодаря такому широкому спектру биологических эффектов, HGF активно участвует в репаративных процессах в различных органах и тканях (печень, почки, легкие, сердце, мозг). В частности, еще в 90-х годах было установлено, что HGF обладает нейро-

трофическими свойствами и обеспечивает выживаемость нейронов гиппокампа и коры головного мозга, а также спинного мозга [17, 22]. В модели окклюзии мозговой артерии было показано, что HGF стимулирует функциональное восстановление у крыс через механизмы усиления роста нейритов, стабилизации синаптических контактов и образования новых сосудов и коллатералей в зоне ишемии [25].

Эффекты HGF реализуются через его связывание с рецептором с-Met, что приводит к фосфорилированию тирозина и активации тирозинкиназного сигнального каскада [4]. В результате, стимулируются процессы нейрогенеза (т.е. образования из нейральных стволовых клеток новых нейронов), синаптогенеза (т.е. формирования новых синаптических связей) и ангиогенеза. Недавно было показано, что с помощью синтетического аналога ангиотензина (Dihexa) можно значительно усилить способность HGF активировать с-Met-опосредованные сигнальные каскады и, как следствие, интенсифицировать процессы нейрорегенерации. Поскольку Dihexa, являясь низкомолекулярной субстанцией, может проникать через ГЭБ при пероральном приеме, ее использование рассматривается в качестве нового перспективного подхода в лечении болезни Альцгеймера [28] и болезни Паркинсона [29].

Концентрация HGF в сыворотке крови может существенно снижаться, особенно при длительно текущих, хронических заболеваниях вследствие сохраняющейся ишемии, высокого уровня гликемии или циркулирующего TGF- β . 83% больных, включенных нами в исследование, были либо с последствиями ишемического инсульта (10 пациентов), либо с хронической ишемией головного мозга II степени (15 пациентов). Не удивительно, что в сыворотке крови больных ОПМ до начала курса ингаляционной иммунотерапии нами был выявлен многокомпонентный дефицит цитокинов, в том числе HGF и BDNF.

Ранее нами было показано, что M2-макрофаги активно секретируют целый комплекс различных нейротрофических, нейропротективных и ангиогенных факторов (EPO, VEGF, IGF-1, BDNF, EGF, FGF-basic и др.) [5, 24]. Следует отметить, что по спектру продуцируемых трофических факторов M2-макрофаги во многом схожи с мезенхимальными стромальными клетками (МСК), а также нейральными стволовыми клетками [13]. Различные типы этих клеток (МСК, выделенные из костного мозга, пуповинной крови, жировой ткани; стволовые клетки: клетки-предшественники: эмбриональные стволовые клетки и т.д.), а также отдельные трофические факторы (EPO, BDNF, HGF, GM-CSF и др.) активно используются в доклинических и клинических трайлах с целью усиления восстановительных процессов

и улучшения неврологических функций после инсульта [9, 15, 32].

Заключение

Показана возможность клинического применения растворимых продуктов M2-макрофагов в виде курса интраназальных ингаляций для ле-

чения больных с ОПМ различного генеза. Установлено, что выраженный позитивный ответ на ингаляционную иммунотерапию сопряжен с увеличением концентрации HGF в сыворотке. Ингаляционная иммунотерапия позволяет повысить эффективность неврологического и функционального восстановления больных с ОПМ.

Список литературы / References

1. Alcalá-Barraza S.R., Lee M.S., Hanson L.R., McDonald A.A., Frey W.H., McLoon L.K. Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO and NT-4 to the CNS. *J. Drug Target.*, 2010, Vol. 18, no. 3, pp. 179-190.
2. Baum E., Pawlaczyk K., Mackowiak B., Sosinska P., Matecka M., Kolodziejczak B., Musielak M., Breborowicz A. Levels of hepatocyte growth factor in serum correlate with quality of life in hemodialysis patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, Vol. 8, no. 10, pp. 13477-13482.
3. Benedict C., Kern W., Schultes B., Born J., Hallschmid M. Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2008, Vol. 93, no. 4, pp. 1339-1344.
4. Bottaro D.P., Rubin J.S., Faletto D.L., Chan A.M., Kmiecik T.E., Vande Woude G.F., Aaronson S.A. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*, 1991, Vol. 251, no. 4995, pp. 802-804.
5. Chernykh E.R., Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Petrovsky Ya.L., Ostanin A.A. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair? *Cell Ther. Transplant.*, 2010, Vol. 2, no. 6, e.000080.01. doi: 10.3205/ctt-2010-en-000080.01.
6. Chernykh E.R., Kafanova M.Yu., Shevela E.Y., Adonina E.I., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A. Autologous M2-like macrophage applications in children with cerebral palsy. *Cell Ther Transplant.*, 2011, Vol. 3, no. 11, e.000092.01. doi: 10.3205/ctt-2011-en-000092.01.
7. Chernykh E.R., Kafanova M.Y., Shevela E.Y., Sirota S.I., Adonina E.A., Ostanin A.A., Kozlov V.A. Clinical experience with autologous M2-macrophages in children with severe cerebral palsy. *Cell Transplant.*, 2014, Vol. 23, Suppl. 1, S97-104.
8. Chernykh E.R., Shevela E.Y., Starostina N.M., Morozov S.A., Davydova M.N., Menyaeva E.V., Ostanin A.A. Safety and therapeutic potential of M2-macrophages in stroke treatment. *Cell Transplant.*, 2016, Vol. 25, no. 8, pp. 1461-1471.
9. Chopp M., Li Y. Stimulation of plasticity and functional recovery after stroke – cell-based and pharmacological therapy. *European Neurological Review*, 2011, Vol. 6, no. 2, pp. 97-100.
10. Crigler L., Robey R.C., Asawachaicharn A., Gaupp D., Phinney D.G. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp. Neurol.*, 2006, Vol. 198, no. 1, pp. 54-64.
11. Dhuria S.V., Hanson L.R., Frey W.H. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J. Pharm. Sci.*, 2010, Vol. 99, no. 4, pp. 1654-1673.
12. Donnelly D.J., Popovich P.G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, 2008, Vol. 209, no. 2, pp. 378-388.
13. Drago D., Cossetti C., Iraci N., Gaude E., Musco G., Bachi A., Pluchino S. The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie*, 2013, Vol. 95, no. 12, pp. 2271-2285.
14. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, no. 12, pp. 953-964.
15. Gutierrez-Fernandez M., Fuentes B., Rodriguez-Frutos B., Ramos-Cejudo J., Vallejo-Cremades M.T., Diez-Tejedor E. Trophic factors and cell therapy to stimulate brain repair after ischaemic stroke. *J. Cell Mol. Med.*, 2012, Vol. 16, no. 10, pp. 2280-2290.
16. Hallschmid M., Benedict C., Schultes B., Born J., Kern W. Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling. *Int. J. Obes. (Lond.)*, 2008, Vol. 32, no. 2, pp. 275-282.
17. Hamaoui M., Takemoto N., Matsumoto K., Nakamura T., Nakajima K., Kohsaka S. Neurotrophic effect of hepatocyte growth factor on central nervous system neurons *in vitro*. *J. Neurosci. Res.*, 1996, Vol. 43, no. 5, pp. 554-564.
18. Hohlfeld R., Kerschensteiner M., Meinl E. Dual role of inflammation in CNS disease. *Neurology*, 2007, Vol. 68, no. 22, Suppl. 3, S58-S63.
19. Kerschensteiner M., Gallmeier E., Behrens L., Leal V.V., Misgeld T., Klinkert W.E., Kolbeck R., Hoppe E., Oropeza-Wekerle R.L., Bartke I., Stadelmann C., Lassmann H., Wekerle H., Hohlfeld R. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor *in vitro* and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation. *J. Exp. Med.*, 1999, Vol. 189, no. 5, pp. 865-870.
20. Kronfol Z., Remick D.G. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am. J. Psychiatry*, 2000, Vol. 157, no. 5, pp. 683-694.

21. Lu D., Mahmood A., Qu C. Goussev A., Schallert T., Chopp M. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 2005, Vol. 22, no. 9, pp. 1011-1017.
22. Miyazawa T., Matsumoto K., Ohmichi H., Katoh H., Yamashima T., Nakamura T. Protection of hippocampal neurons from ischemia-induced delayed neuronal death by hepatocyte growth factor: a novel neurotrophic factor. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1998, Vol. 18, no. 4, pp. 345-348.
23. Nakamura T., Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc. Jpn Acad., Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 2010, Vol. 86, no. 6, pp. 588-610.
24. Sakhno L.V., Shevela E.Ya., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. The phenotypic and functional features of human M2 macrophages generated under low serum conditions. *Scand. J. Immunol.*, 2016, Vol. 83, no. 2, pp. 151-159.
25. Shimamura M., Sato N., Waguri S., Uchiyama Y., Hayashi T., Iida H., Nakamura T., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R. Gene transfer of hepatocyte growth factor gene improves learning and memory in the chronic stage of cerebral infarction. *Hypertension*, 2006, Vol. 47, pp. 742-751.
26. Thorne R.G., Pronk G.J., Padmanabhan V., Frey W.H. Delivery of IGF-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*, 2004, Vol. 127, no. 2, pp. 481-496.
27. Thorne R.G., Hanson L.R., Ross T.M., Tung D., Frey W.H. Delivery of interferon- β to the monkey nervous system following intranasal administration. *Neuroscience*, 2008, Vol. 152, no. 3, pp. 785-797.
28. Wright J.W., Harding J.W. The brain hepatocyte growth factor/c-Met receptor system: a new target for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.*, 2015, Vol. 45, no. 4, pp. 985-1000.
29. Wright J.W., Kawas L.H., Harding J.W. The development of small molecule angiotensin IV analogs to treat Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Prog. Neurobiol.*, 2015, Vol. 125, pp. 26-46.
30. Yang X.T., Bi Y.Y., Feng D.F. From the vascular microenvironment to neurogenesis. *Brain Res. Bull.*, 2011, Vol. 84, no. 1, pp. 1-7.
31. Yin Y., Cui Q., Li Y., Irwin N., Fischer D., Harvey A.R., Benowitz L.I. Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J. Neurosci.*, 2003, Vol. 23, no. 6, pp. 2284-2293.
32. Zhang Z.G., Chopp M. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol.*, 2009, Vol. 8, no. 5, pp. 491-500.
33. Zhu J., Jiang Y., Xu G., Liu X. Intranasal administration: a potential solution for cross-BBB delivering neurotrophic factors. *Histol. Histopathol.*, 2012, Vol. 27, no. 5, pp. 537-548.

Авторы:

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

Давыдова М.Н. — врач-невролог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Старостина Н.М. — к.м.н., заслуженный врач РФ, заведующая отделением иммунологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сахно Л.В. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

Authors:

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

Davydova M.N., Neurologist, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Starostina N.M., PhD (Medicine), Honored Doctor of Russian Federation, Head, Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

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

Поступила 12.09.2017
Принята к печати 15.02.2018

Received 12.09.2017
Accepted 15.02.2018

РЕАГИН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ НА УРОВЕНЬ ИНСУЛИНА ПРИ НАРУШЕНИЯХ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ГРУПП КРОВИ (В СИСТЕМЕ АВО)

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

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. В работе показано, что у лиц с разными группами крови и уровнем глюкозы имеются индивидуальные реакции индукции IgE к инсулину. Так, 0 (I) группа крови при понижении уровня глюкозы ниже 4 ммоль/л демонстрировала самые высокие значения IgE к инсулину — 124,83±67,9 кЕ/л. Такие значения характерны для А (II) и В (III) групп крови при глюкозе в норме. У В (III) группы крови при глюкозе ниже 4 ммоль/л наблюдалась самая низкая индукция инсулина — 0,85±0,05 мкЕ/мл, а продукция IgE к инсулину повышалась в 80 раз, составляя 113,0±56,0 кЕ/л. На первых стадиях нарушений углеводного обмена (глюкоза 6,0-7,6 ммоль/л), «пограничной ситуации», выработка инсулина у 0 (I) и А (II) групп крови повышается в 3 раза, в то время как у В (III) группы крови уровень инсулина находится практически в норме — 12,3±3,7, а IgE к инсулину — наименьший — 27,2±9,08 кЕ/л, что в 5 раз ниже контрольной ситуации для В (III) группы крови. Однако все три группы крови на повышение уровня глюкозы и инсулина в крови, а также при выраженном диабете 2 типа реагируют понижением продукции специфических IgE к инсулину.

Ключевые слова: специфический иммуноглобулин E, IgE, антитела, группы крови (ABO), антигенные детерминанты, сахарный диабет, нарушения углеводного обмена, инсулин

REAGIN-SPECIFIC RESPONSE TO INSULIN LEVEL IN CARBOHYDRATE METABOLISM DISORDERS IS DEPENDENT ON THE BLOOD GROUP ABO ANTIGENIC DETERMINANTS

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

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The paper presents evidence that the individuals with different blood groups and glucose levels exhibit individual IgE reagin responses to insulin. Thus, the persons with 0 (I) blood group showed the highest

Адрес для переписки:

Коновальчик Мария Алексеевна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
344010, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Петренко, 6/184.
Тел.: 8 (928) 763-63-20.
E-mail: mariya_konovalchik@mail.ru

Address for correspondence:

Konovalchik Maria A.
Rostov State Medical University
344010, Russian Federation, Rostov-on-Don, Petrenko str., 6,
apt 184.
Phone: 7 (928) 763-63-20.
E-mail: mariya_konovalchik@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Р. Телесманич, М.А. Коновальчик, З.И. Микашинович, Э.Г. Криволапова «Реагин-специфическая реакция на уровень инсулина при нарушениях углеводного обмена в зависимости от антигенных детерминант групп крови (в системе АВО)» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 589-596. doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-589-596

© Телесманич Н.Р. и соавт., 2018

For citation:

N.R. Telesmanich, M.A. Konovalchik, Z.I. Mikashinovich, E.G. Krivolapova "Reagin-specific response to insulin level in carbohydrate metabolism disorders is dependent on the blood group ABO antigenic determinants", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 589-596. doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-589-596

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-589-596

values of anti-insulin-specific IgE (124.83 ± 67.9 kE/L) when their glucose level was under 4 mmol/l. Such values are characteristic to the patients with A (II) and B (III) blood groups with normal glucose levels. Among subjects with B (III) blood group showing decreased glucose values (< 4 mmol/L), the lowest insulin induction (0.85 ± 0.05 mkE/ml) was observed, and the IgE production to insulin increased 80-fold, reaching 113.0 ± 56.0 kE/L. At the first ("borderline") stage of carbohydrate metabolism disorders (glucose levels 6.0 to 7.6 mmol/L), the insulin production is increased 3-fold in 0 (I) and A (II) blood groups, whereas insulin levels in persons with B(III) blood group are near-normal (12.3 ± 3.7), and IgE antibodies to insulin show lowest levels (27.2 ± 9.08 kE/L), thus being 5 times lower when compared to the persons with B (III) blood group. However, carriers of all three group antigens and patients with expressed type 2 diabetes respond to increased glucose and insulin levels in blood by decreased production of specific IgE antibodies to insulin.

Keywords: specific IgE, IgE, antibodies, blood group (ABO), antigenic determinants, diabetes, carbohydrate metabolism disorders, insulin

Введение

Результаты исследований последних лет свидетельствуют о важной роли иммунного воспаления в развитии сахарного диабета 2 типа (СД2). Показано, что у пациентов с СД 2 типа обнаруживается воспаление низкой степени выраженности за годы до первых клинических проявлений. В последнее время практически сформировалось воззрение, что усиление IgE-поликлонального ответа и противовоспалительных цитокинов считают маркером экспансии Th2 и развитием иммунной системы по аллергическому типу, что понижает риск развития сахарного диабета 1 типа (СД1). И наоборот, пациенты, болеющие СД1, мало подвержены аллергии [14]. Существует мнение, что у лиц с разными группами крови (ABO) могут быть различия в индивидуальном уровне адаптивной реакции организма. Для обладателей группы крови А (II) характерно наибольшее содержание инсулина и кортизола в сыворотке крови, а метаболический профиль лиц с АВ (IV) может характеризоваться наибольшим содержанием глюкозы [5]. Уже известно, что у лиц 0 (I) группы крови в 3 раза чаще встречается язвенная болезнь желудка. Антигены А (II) и В (III) групп крови необходимы мембранам клеток слизистой оболочки желудка в обеспечении их устойчивости к действию соляной кислоты, их присутствие мешает заселению желудка *Helicobacter pylori* [1]. По всей видимости, этими же факторами обусловлена подверженность другим инфекционным заболеваниям [7, 9].

Цель работы – анализ уровня специфических IgE к инсулину в зависимости от группоспецифичности антигенов крови у людей с различными показателями уровня глюкозы в крови.

Материалы и методы

Исследования проводили с ноября 2015 по декабрь 2016 года. В исследовании участвовали 110 человек с 0 (I), А (II), В (III) группами крови.

Весь контингент был разделен на 4 подгруппы. Подгруппа 0 – контрольная группа; подгруппа 1 – показатели глюкозы и гликозилирован-

ного гемоглобина (HbA1c) по нижней границе нормы и ниже нормы (глюкоза 2,2-4,1 ммоль/л; HbA1c 3,7-5%); подгруппа 2 – показатели глюкозы и гликозилированного Hb по верхней границе нормы и тенденции к превышению нормы (глюкоза 6,2-7,8 ммоль/л; HbA1c 5,9-6,9%); подгруппа 3 – выраженное нарушение толерантности к глюкозе (глюкоза 8-20,3 ммоль/л; HbA1c 6,7-13,6%).

0 (I) группа крови была определена у 41 человека. Глюкоза и HbA1c выше нормы наблюдались у 30 человек: подгруппа 2 (глюкоза 6,2-7,6 ммоль/л), $n = 11$ и подгруппа 3 (глюкоза 8,0-20,3 ммоль/л), $n = 14$. Всего с нарушением углеводного обмена – подгруппа 2 + подгруппа 3 – 73%, $n = 25$. Из них с диагнозом «сахарный диабет 2-го типа» (СД2) – 19 (46%) человек в возрасте от 48 до 79 лет – 5 человек подгруппы 2 и 14 человек подгруппы 3. «Сахарный диабет 1-го типа» (СД1) – 5 (12%) человек – попали в подгруппу 3 в возрасте 19-34 лет. Подгруппа 1 – с пониженным уровнем глюкозы (3,0-4,1 ммоль/л), $n = 4$ (10%) (табл. 1).

А (II) группа крови определена у 31 человека. Глюкоза выше нормы обнаружена у 18 человек: подгруппа 2 (глюкоза 6,2-7,8 ммоль/л), $n = 10$ и подгруппа 3 (глюкоза 8,2-16,0 ммоль/л), $n = 8$. Всего с нарушением углеводного обмена – подгруппа 2 + подгруппа 3 – 58%, $n = 18$. Из них СД2 – 12 (39%) человек в возрасте 45-78 лет – 4 человека подгруппы 2 и 8 – подгруппы 3. СД1 – 2 (6%) человека попали в подгруппу 2 в возрасте 26-27 лет. Подгруппа 1 – с пониженным уровнем глюкозы (2,9-4,0 ммоль/л), $n = 5$ (16%) (табл. 2).

В (III) группа крови определена у 38 человек, из них у 22 глюкоза выше нормы: подгруппа 2 (глюкоза 6,2-6,9 ммоль/л), $n = 9$ и подгруппа 3 (глюкоза 7,4-17,5 ммоль/л), $n = 13$. Всего с нарушением углеводного обмена (подгруппа 2 + подгруппа 3) – 58%, $n = 22$. Из них СД2 – 13 (34%) человек в возрасте 24-74 лет только подгруппы 3; СД1 – 0%. Подгруппа 1 (2,2-3,2 ммоль/л – глюкоза ниже нормы), $n = 2$ (5%) (табл. 3).

Для определения групп крови человека системы АВ0 использовали моноклональные антитела

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЗНАЧЕНИЙ СПЕЦИФИЧЕСКОГО IgE К ИНСУЛИНУ И ГЛЮКОЗЫ У ЛЮДЕЙ С НАРУШЕНИЯМИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА С 0 (I) ГРУППОЙ КРОВИ (X±m)

TABLE 1. AVERAGE VALUES OF SPECIFIC IgE VALUES FOR INSULIN AND GLUCOSE IN PEOPLE WITH IMPAIRED CARBOHYDRATE METABOLISM WITH 0 (I) BLOOD GROUP (X±m)

Показатель Index	Контрольная группа (n = 7) глю (4,3-6,0 ммоль/л) HbA1c (4,9-5,7%) Control group (n = 7) Glu (4,3-6,0 mmol/l) HbA1c (4,9-5,7%)	Подгруппа 1 (n = 4) глю (3,0-4,1 ммоль/л) HbA1c (4,2-5,0%) Subgroup 1 (n = 4) Glu (3,0-4,1 mmol/l) HbA1c (4,2-5,0%)	Подгруппа 2 (n = 11) глю (6,2-7,6 ммоль/л) HbA1c (5,9-6,8%) Subgroup 2 (n = 11) Glu (6,2-7,6 mmol/l) HbA1c (5,9-6,8%)	Подгруппа 3 (n = 14) глю (8,0-20,3 ммоль/л) HbA1c (6,8-13,6%) Subgroup 3 (n = 14) Glu (8,0-20,3 mmol/l) HbA1c (6,8-13,6%)
Глюкоза (4,2-6,1 ммоль/л) Glucose (4,2-6,1 mmol/l)	5,07±0,20	3,8±0,27 p < 0,05	6,9±0,15 p < 0,05	11,0±1,1 p > 0,05
HbA1c (4,0-6,2%)	5,29±0,09	4,7±0,18 p < 0,05	6,4±0,08 p < 0,05	8,5±0,6 p > 0,05
Специфический IgE к инсулину (0-50 кЕ/л) Specific IgE to insulin (0-50 kE/l)	49,94±16,09	124,83±67,9 p > 0,05	42,2±8,7 p < 0,05	33,3±8,6 p < 0,05
Инсулин (2-25 мкЕ/мл) Insulin (2-25 mkE/ml)	4,6±1,7	5,9±3,87 p < 0,05	16,5±3,6 p < 0,05	18,0±5,0 p > 0,05
IgE инс/инс IgE to insulin/insulin	10,9	21,2	2,6	1,85

Примечание. p – достоверно относительно контрольной группы. Подгруппа 1 – нижняя граница нормы, ниже нормы. Подгруппа 2 – верхняя граница нормы и тенденция к превышению нормы. Подгруппа 3 – выраженное нарушение толерантности к глюкозе.

Note. p, significantly relative to the control group. Subgroup 1, the lower limit of normal, below normal. Subgroup 2, upper limit of normal and a tendency to exceed the norm. Subgroup 3, marked glucose intolerance.

класса IgM мышинных гибридом анти-А, анти-В, анти-АВ в реакции прямой гемагглютинации на плоскости «Эритротест™ – цоликлоны» (производство ООО «Гематолог», Москва).

Концентрацию инсулина определяли твердофазным сэндвич методом, двухстадийным ИФА в сыворотке крови. Показатели нормы – 2-25 мкЕ/мл.

Уровни специфического IgE определяли твердофазным неконкурентным непрямым методом в сыворотке крови (IgE-Ат-ИФА) серии «Иммунотекс» (г. Ставрополь). Показатели нормы – 0-50 КЕ/л.

Концентрацию глюкозы в сыворотке крови определяли энзиматическим колориметрическим методом без депротеинизации, использовали набор реагентов (производитель ООО «Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург). Показатели нормы – 4,2-6,1 ммоль/л.

Процентное содержание гликогемоглобина (HbA1c) в крови определяли с помощью набора «Гликогемотест» (Москва), который применяют для диагностики латентной (скрытой) формы сахарного диабета. Показатели нормы – 4,0-6,2%.

Верификация, диагноз заболевания и степень компенсации углеводного обмена осуществлялись квалифицированными специалистами г. Ростова-на-Дону согласно рекомендациям ВОЗ (1999) и «Национальным стандартам оказания медицинской помощи больным сахарным диабетом».

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программного пакета Statistica версии 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, США) с определением средней величины (M), средней ошибки средней величины (m). Статистическая значимость различий между сравниваемыми показателями определяли с помощью парного t-критерия Стьюдента. При сравнении динамики показате-

ТАБЛИЦА 2. СРЕДНИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЗНАЧЕНИЙ СПЕЦИФИЧЕСКОГО IgE К ИНСУЛИНУ И ГЛЮКОЗЫ У ЛЮДЕЙ С НАРУШЕНИЯМИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА С А (II) ГРУППОЙ КРОВИ ($X \pm m$)

TABLE 2. AVERAGE VALUES OF SPECIFIC IgE VALUES FOR INSULIN AND GLUCOSE IN PEOPLE WITH IMPAIRED CARBOHYDRATE METABOLISM WITH A (II) BLOOD GROUP ($X \pm m$)

Показатель Index	Контрольная группа (n = 8) глю (4,2-6,0 ммоль/л) HbA1c (4,8-5,7%) Control group (n = 8) Glu (4,2-6,0 mmol/l) HbA1c (4,8-5,7%)	Подгруппа 1 (n = 5) глю (2,9-4,0 ммоль/л) HbA1c (4,2-4,8%) Subgroup 1 (n = 5) Glu (2,9-4,0 mmol/l) HbA1c (4,2-4,8%)	Подгруппа 2 (n = 10) глю (6,2-7,8 ммоль/л); HbA1c (5,9-6,9%) Subgroup 2 (n = 10) Glu (6,2-7,8 mmol/l) HbA1c (5,9-6,9%)	Подгруппа 3 (n = 8) глю (8,2-16,0 ммоль/л); HbA1c (7,0-11,3%) Subgroup 3 (n = 8) Glu (8,2-16,0 mmol/l) HbA1c (7,0-11,3%)
Глюкоза (4,2-6,1 ммоль/л) Glucose (4,2-6,1 mmol/l)	4,8±0,2	3,42±0,18 p < 0,05	6,9±0,2 p > 0,05	11,0±0,9 p > 0,05
HbA1c (4,0-6,2%)	5,2±0,1	4,42±0,11 p > 0,05	6,4±0,13 p > 0,05	8,5±0,5 p > 0,05
Специфический IgE к инсулину (0-50 кЕ/л) Specific IgE to insulin (0-50 kE/l)	93,3±43,6	31,5±6,9 p > 0,05	75,5±35,4 p > 0,05	22,0±3,6 p > 0,05
Инсулин (2-25 мкЕ/мл) Insulin (2-25 mkE/ml)	7,3±3,3	10,86±7,5 p > 0,05	20,0±9,0 p > 0,05	18,7±12,2 p > 0,05
IgE инс/инс IgE to insulin/insulin	12,8	2,9	3,8	1,2

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

лей в каждой группе до и после окончания периода наблюдения использовали расчет t-критерия для зависимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В норме (контрольная группа) уровень инсулина для 0 (I) группы крови характеризовался наименьшим уровнем продукции – $4,6 \pm 1,7$ мкЕ/мл (табл. 1). А (II) группа крови имела более высокие средние значения уровня инсулина в сыворотке крови – $7,3 \pm 3,3$ мкЕ/мл (табл. 2). В (III) характеризовалась наибольшим уровнем инсулина и составила $10,7 \pm 2,2$ мкЕ/мл (табл. 3). Ранее нами были описаны закономерности IgE-поликлонального ответа при нарушениях углеводного обмена в зависимости от антигенов группы крови [8].

Уровень специфического IgE к инсулину в норме (контрольная группа) распределился следующим образом: 0 (I) группа крови – $49,94 \pm 16,09$ кЕ/л – это самые низкие значения [норма 0-50 кЕ/л]. А (II) – уровень IgE к инсулину

был в два раза выше и составил $93,3 \pm 43,6$ кЕ/л. В (III) – имела самые высокие цифры IgE к инсулину – $113,0 \pm 56,0$ кЕ/л.

Если оценить отношение между уровнем продукции специфических IgE к инсулину и уровнем продукции инсулина (IgEинс/инс), то мы получим для контрольной группы следующие цифры: 0 (I) группа крови – IgE к инсулину продуцируется в 10,9 раза больше, чем инсулина; для А (II) IgE к инсулину продуцируется в 12,8 раза больше, чем инсулина; для В (III) группы крови IgE к инсулину продуцируется в 10,6 раза больше, чем инсулина.

Таким образом, в контрольной группе, имеющей нормальный уровень глюкозы и гликозилированного гемоглобина, которая в наших исследованиях была представлена ($n = 33$), IgE к инсулину продуцируется в 11-12 раз больше, чем самого инсулина, независимо от детерминированности групп крови, хотя по степени индукции инсулина и IgE к инсулину между группами крови существуют закономерные отличия.

ТАБЛИЦА 3. СРЕДНИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЗНАЧЕНИЙ СПЕЦИФИЧЕСКОГО IgE К ИНСУЛИНУ И ГЛЮКОЗЫ У ЛЮДЕЙ С НАРУШЕНИЯМИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА С В (III) ГРУППОЙ КРОВИ ($X \pm m$)

TABLE 3. AVERAGE VALUES OF SPECIFIC IgE VALUES FOR INSULIN AND GLUCOSE IN PEOPLE WITH IMPAIRED CARBOHYDRATE METABOLISM WITH B (III) BLOOD GROUP ($X \pm m$)

Показатель Index	Контрольная группа (n = 14) глю (4,2-6,1 ммоль/л) HbA1c (4,8-5,9%) Control group (n = 14) Glu (4,2-6,1 mmol/l) HbA1c (4,8-5,9%)	Подгруппа 1 (n = 2) глю (2,2-3,2 ммоль/л) HbA1c (3,7-4,3%) Subgroup 1 (n = 2) Glu (2,2-3,2 mmol/l) HbA1c (3,7-4,3%)	Подгруппа 2 (n = 9) глю (6,2-6,9 ммоль/л) HbA1c (5,9-6,5%) Subgroup 2 (n = 9) Glu (6,2-6,9 mmol/l) HbA1c (5,9-6,5%)	Подгруппа 3 (n = 13) глю (7,4-17,5 ммоль/л) HbA1c (6,7-12,0%) Subgroup 3 (n = 13) Glu (7,4-17,5 mmol/l) HbA1c (6,7-12,0%)
Глюкоза (4,2-6,1 ммоль/л) Glucose (4,2-6,1 mmol/l)	4,9±0,2	2,7±0,5 p < 0,05	6,5±0,09 p < 0,05	10,6±0,9 p < 0,05
HbA1c (4,0-6,2 %)	5,2±0,09	4,0±0,30 p < 0,05	6,2±0,07 p < 0,05	8,3±0,5 P < 0,05
Специфический IgE к инсулину (0-50 кЕ/л) Specific IgE to insulin (0-50 kE/l)	113,0±56,0	67,9±13,1	27,2±9,08 p > 0,05	31,2±6,7 p > 0,05
Инсулин (2-25 мкЕ/мл) Insulin (2-25 mkE/ml)	10,7±2,2	0,85±0,05	12,3±3,7 p > 0,05	21,0±5,0 p > 0,05
IgE инс/инс IgE to insulin/insulin	10,6	80,0	2,2	1,5

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Подгруппа 1, имеющая уровень глюкозы и HbA1c ниже нормы в 0 (I) и А (II) группе крови характеризовалась уровнем инсулина значительно выше контрольной группы (табл. 1, 2); В (III) – самыми низкими значениями – 0,85±0,05 мкЕ/мл (табл. 3), что в 8 раз ниже, чем у первых двух групп и ниже данных контроля в 125 раз.

Самые высокие значения IgE к инсулину при пониженном уровне глюкозы – 3-4 ммоль/л демонстрировала 0 (I) группа крови (табл. 1) – 124,83±67,9 кЕ/л, то есть при пониженном уровне глюкозы у 0 (I) группы крови уровень специфических IgE к инсулину достигал значений этого параметра контрольной группы А (II) и В (III) группы крови, который у них в контрольной группе (при глюкозе до 6,0 ммоль/л) составлял 93,3±43,6 кЕ/л (табл. 2) и 113,0±56,0 кЕ/л соответственно (табл. 3), в то время как уровень инсулина был почти на уровне контрольной группы 0 (I) группы крови, при незначительном повышении с 4,6 до 5,9 соответственно. У А (II) и В (III) групп крови при низкой глюкозе понижался и уровень IgE к инсулину.

Можно предположить, что в связи с низкой продукцией инсулина и специфических IgE к инсулину, характерных для 0 (I) группы крови в норме генетически, низкий уровень глюкозы нормализует продукцию IgE специфических к инсулину антител, и данное соотношение наиболее физиологично для этой группы крови. В то время как у В (III) группы крови при низком уровне глюкозы (2-3 ммоль/л) индукция инсулина резко снижается, а уровень IgE специфических антител остается высоким. В результате этой ситуации IgE к инсулину продуцируется в 80 раз больше, чем самого инсулина (табл. 3). В (III) группа крови является индикатором, свидетельствующим о нарушении физиологически обоснованного соотношения анализируемых параметров и, по всей вероятности, дефицит глюкозы переносится В (III) группой крови значительно тяжелее, чем 0 (I). Напомним, что в контрольной группе для В (III) группы крови отношение IgEинс/инс = 10,6.

Пониженный уровень глюкозы (3-4 ммоль/л) незначительно индуцирует уровень инсулина у А (II) группы крови (табл. 2), в то время как IgE

специфические антитела понижаются в 3 раза по сравнению с контрольной группой и с другими группами крови этой подгруппы. Данная ситуация приводит к тому, что IgE к инсулину продуцируется только в 2,9 раза больше, чем инсулина, что значительно ниже данного соотношения, вычисленному нами для контрольной группы нормы (IgEинс/инс = 12,8).

Подгруппа 2 включает контингент, имеющий уровень глюкозы и гликозилированного гемоглобина по верхней границе нормы и тенденции к превышению нормы, можно назвать это пограничным состоянием. В этой ситуации (подгруппа 2), В (III) группа крови (табл. 3) имеет наименьший уровень продукции инсулина и IgE к инсулину, отношение IgEинс/инс = 2,2. Наибольший уровень инсулина и IgE к инсулину вырабатывает А (II) группа крови (табл. 2), отношение IgEинс/инс = 3,8. 0 (I) группа крови в подгруппе 2 занимает среднюю позицию (табл. 1), отношение IgEинс/инс = 2,6. Таким образом, в подгруппе 2 отношение IgEинс/инс адекватно отражает уровень продукции инсулина и IgE, но наименьшую индукцию инсулина и IgE к инсулину при повышении глюкозы имеет В (III) группа крови.

Необходимо отметить, что при «пограничной» ситуации, к которой относится подгруппа 2, выработка инсулина у 0 (I) и А (II) групп крови повышается в 3 раза по сравнению с контролем, в то время как у В (III) группы уровень инсулина практически такой же как у контрольной группы нормы. Так же у В (III) группы крови (подгруппа 2) (табл. 3) IgE к инсулину наименьший и в 5 раз ниже контрольной группы, что свидетельствует о том, что на повышенный уровень глюкозы иммунная система реагирует раньше и более выражено, чем эндокринная система, что выражается в понижении продукции IgE, а инсулин остается в пределах нормы. У А (II) группы крови в 3 раза повышается уровень инсулина по сравнению с контролем, а уровень IgE понижается только в 1,2 раза (незначительно) (табл. 2). Также в 0 (I) группе крови (табл. 1) при повышенных значениях глюкозы инсулин повышается в 4 раза, а IgE к инсулину сохраняется практически на уровне контроля.

В подгруппе 3 у всех представителей разных групп крови наблюдается высокий уровень инсулина (в среднем до 19 мкЕ/мл), и продолжает падать уровень IgE к инсулину по сравнению с контрольной группой и составляет в среднем 29 кЕ/мл. Уровень IgE к инсулину снижается по сравнению с контрольной группой независимо от группы крови. По мере возрастания глюкозы выше 6,2 ммоль/л отношение уровня IgE к инсулину и уровня инсулина (IgEинс/инс) падает. Для всех групп крови в подгруппе 2 инсулин начинает вырабатываться в среднем в 2,8 раз мень-

ше, а в подгруппе 3 это отношение уже составляет 1,5. В то время как в контрольной группе это соотношение в среднем до 12.

Сахарный диабет 2 типа характеризуется выраженным нарушением метаболизма инсулина и глюкозы. Известно [11], что на ранних этапах заболевания инсулин вырабатывается β -клетками поджелудочной железы в избыточном количестве, тем самым компенсируя все более усугубляющуюся инсулинрезистентность. Однако, по нашим данным, при повышении глюкозы выше 6,2 ммоль/л (подгруппа 2) наблюдается повышенная выработка инсулина в 0 (I) и А (II) группах крови, в то время как В (III) продуцирует инсулин в пределах нормы, а при пониженной глюкозе он приближается к нулю. При повышении глюкозы > 7,8 ммоль/л наблюдается повышение уровня инсулина в 3 раза у всех групп крови и понижение IgE. Однако IgE к инсулину ниже всего в подгруппе 2 у В (III) группы крови.

В подгруппе 3 у всех групп крови наблюдается повышение инсулина, понижение IgE. При нарушении углеводного обмена соотношение IgEинс/инс по отношению к контрольной группе (12 и выше) начинает падать до 3 и ниже. Выраженная гипергликемия у всех групп крови так же сопровождается ростом уровня инсулина, в среднем до 20 мкЕ/мл, что выше контрольной группы в 4 раза. IgE у инсулину сильно падает (в 3,5 раза у В (III) группы крови), в 4 раза у А (II), в 1,5 раза у 0 (I). Показано [2], что индексы соотношения между цитокинами являются эффективными показателями состояния больного. Так, при оптимизации аллергического статуса отношение IL-4/IFN γ увеличивался от 4,2 до 8,0. А отношение IL-4/IL-10 при аллергиях составлял 1,2, после улучшения состояния поднимался до 5. Известно, что IL-10 подавляет продукцию общего и специфического IgE [2].

Известно, что в регуляции синтеза IgE участвуют гормоны. Кортизол, инсулиноподобный фактор роста I действуют как сигналы для переключения В-лимфоцитов на синтез IgE [12, 13].

В соответствии с Th1/Th2-гипотезой, иммунная система развивается либо через Th1-клетки, либо через Th2-клетки. Это будет означать, что развитие IgE-опосредованной аллергии (Th2-путь) будет понижать риск развития СД1 [16]. Известно, что Th1-эффекторы CD4⁺ играют существенную роль в противовирусном иммунитете [14].

Показано, что СД 2 типа сопровождается развитием субклинического воспаления, ассоциированного с увеличением продукции ряда провоспалительных медиаторов. Однако до настоящего времени не установлены точные механизмы и особенности развития цитокинового дисбаланса у пациентов с СД 2 типа [4].

Переключающими на синтез IgE цитокинами, влияющими на уровень общего IgE и на развитие Th2-клеток, являются IL-4, IL-13 [12]. IL-4 – это активатор секреции IgE и антагонист IFN γ . Активация промотора гена IL-4 направляет T-клеточный иммунитет по Th2-пути [15]. В наших исследованиях снижение IgE к инсулину при высокой глюкозе свидетельствует о снижении концентрации IL-4 и повышении уровня IFN γ , что направляет иммунитет по Th1-пути. Вместе с тем имеются сообщения, что СД 2 типа сопровождается повышением IL-4 [4, 6].

Понижение уровня IgE, свидетельствует о понижении IL-4 и увеличении уровня IFN γ , так как последние являются антагонистами. Известно, что IFN γ участвует в развитии воспалений, так же как и TNF α , направляет иммунный ответ по Th1-пути (сахарный диабет).

Показано, что для пациентов с СД2 характерно повышение содержания IL-4, IL-6, IL-10, моноклеары IL-17A и TNF α [3]. Вместе с тем IL-10 подавляет продукцию IgE, а IL-4 – показатель повышения IgE, что свидетельствует о «конфликтной» ситуации цитокинов Th1- и Th2-пути при СД2.

Заключение

Полученные нами данные позволяют выдвинуть гипотезу о регуляторной роли IgE к инсулину, так как чем больше продуцируется инсулина

в ответ на глюкозу, тем меньше концентрация IgE к инсулину. Чем меньше инсулина, тем больше «несвязанного» IgE. Понижение глюкозы ниже нормы, например у 0 (I) и В (III) групп крови, приводит к наибольшим значениям специфических IgE к инсулину.

Существует мнение, что важным компонентом формирования аутоиммунных процессов при нарушениях углеводного обмена являются антитела к рецепторам инсулина, что может приводить к «нейтрализации инсулина», следовательно, к инсулинрезистентности. Считают, что идентификация антител к этим рецепторам позволит не только объяснить резистентность к инсулину, но и расширить наши знания об их структурно-функциональных взаимосвязях. Известно, что уровень инсулина при наличии антител к рецепторам повышается в 5-50 раз.

Известно, что отличие IgE от антител других классов заключается в том, что он способен распознавать конформационные эпитопы, тогда как все остальные антитела распознают только линейные эпитопы белков [10].

Тем самым IgE, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью, предназначен для удаления из организма малых концентраций антигенов, маскированных антигенов, антигенные свойства которых заключаются только в конформационных изменениях поверхностных структур [3].

Список литературы / References

1. Васильев Ю.В., Беляева В.С. Патогенетические аспекты *Helicobacter pylori* // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2006. № 1. С. 28-36. [Vasiliev Yu.V., Belyaeva V.S. Pathogenetic aspects of *Helicobacter pylori*. *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2006, no. 1, pp. 28-36. (In Russ.)]
2. Гайдук И.М., Коростовцев Д.С., Шапорова Н.Л., Брейкин Д.В., Трусова О.В., Камаева И.А. Изменение иммунологических показателей при проведении сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии у детей с поллинозом // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 1. С. 51-54. [Gaiduk I.M., Korostovtsev D.S., Shapороva N.L., Breykin D.V., Trusova O.V., Kamaeva I.A. Changes of immune indexes during sublingual allergen-specific immunotherapy in children with hay fever. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 1, pp. 51-54. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-1-51-54.
3. Зубаткина О.В., Добродеева Л.К., Попов А.А. Значимость уровня лептина при оценке состояния адаптивного иммунитета // Экологическая физиология, 2015. Т. 12. С. 16-20. [Zubatkina O.V., Dobrodeeva L.K., Popov A.A. Significance of leptin level in assessment of adaptive immunity. *Ekologicheskaya fiziologiya = Ecological Physiology*, 2015, Vol. 12, pp. 16-20. (In Russ.)]
4. Кологривова И.В., Суслова Т.Е., Кошельская О.А., Винницкая И.В., Трубачева О.А. Влияние глюкозы и инсулина на секрецию цитокинов моноклеарами периферической крови *in vitro* // Иммунопатология и клиническая иммунология, 2013. Т. 5. С. 267-270. [Kologrivova I.V., Suslova T.E., Koshelskaya O.A., Vinnitskaya I.V., Trubacheva O.A. Influence of insulin and glucose on cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Immunopatologiya i klinicheskaya immunologiya = Immunopathology and Clinical Immunology*, 2013, Vol. 5, pp. 267-270. (In Russ.)]
5. Колотьева Н.А., Шахнович Е.А., Нефедова Н.С., Кобозева Е.И., Волков Е.Д., Рыскина Е.А. Роль малых молекул в реализации белок-белковых взаимодействий // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии: сборник трудов II Международной Интернет-конференции. Казань: Казанский университет, 2011. С. 152-153. [Kolotova N.A., Shakhnovich E. A., Nefedova N., Kobozeva E.I., Volkov D.E., Ryskina E.A. The role of small molecules in the realization of protein-protein interactions. Actual problems of biochemistry and bionanotechnology: proceedings of the II International Internet conference]. Kazan: Kazan University, 2011, pp. 152-153.

6. Оспельникова Т.П., Лизогуб Н.В., Осипова Г.Л. Применение индукторов интерферона в комплексной терапии больных аллергическими заболеваниями // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 4-5. С. 354-355. [Ospelnikova T.P., Lizogub N.V., Osipova G.L. The use of interferon inducers in the complex therapy of patients with allergic diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 4-5, pp. 354-355. (In Russ.)]
7. Телесманич Н.Р., Колякина А.В., Ломов Ю.М., Меньшикова Е.А., Миронова А.В. Характеристика адгезивной активности холерных вибрионов на эритроцитах млекопитающих для выбора дополнительного ориентировочного теста их эпидемической значимости // Клиническая лабораторная диагностика, 2008. Т. 7. С. 45-48. [Telesmanich N.R., Kolyakina A.V., Lomov Yu.M., Menshikova Ye.A., Mironova A.V. The Characterization of the adhesive activity of cholera vibrios on mammalian red blood cells for choice of an additional orientative test of their epidemic significance. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2008, Vol. 7, pp. 45-48. (In Russ.)]
8. Телесманич Н.Р., Коновальчик М.А. Зависимость уровня общего IgE от биохимических показателей нарушения углеводного обмена и антигенов группы крови // Уральский научный вестник, 2017. Т. 4, № 3. С. 69-73. [Telesmanich N.R., Konovalchik M.A. Dependence of the total IgE level on biochemical indices of the disturbance of carbohydrate metabolism and blood group antigens. *Uralskiy nauchnyy vestnik = Ural Scientific Bulletin*, 2017, Vol. 4, no. 3, pp. 69-73. (In Russ.)]
9. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М. Лектины холерных вибрионов как основные факторы патогенности и персистенции (биотехнологические аспекты использования) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2012. № 2. С. 93-99. [Telesmanich N.R., Lomov Yu.M. Cholera vibrios lectins as main pathogenicity and persistence factors (biotechnological aspects of use). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2012, no. 2, pp. 93-99. (In Russ.)]
10. Bogh K.L., Nielsen H., Eieqger T., Madsen C.B., Mills E.N., Rigby N.M. IgE versus IgG4 epitopes of the peanut allergen Ara h 1 in patients with severe allergy. *Mol. Immunol.*, 2014, Vol. 58, no. 2, pp. 169-176.
11. Donath M.Y., Shoelson S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Natur. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, pp. 98-107.
12. Jabara H., Loh R., Ramesh N., Fuleihan R., Rosen R.S., Chatila T., Fu S.M., Stamenkovic I., Geha R.S. Sequential switching from μ to ϵ via $\gamma 4$ in human B cells stimulated with IL-4 and hydrocortisone. *J. Immunol.*, 1993, Vol. 151, pp. 4528-4533.
13. Kimata H., Fujimoto M. Growth hormone and insulin-like growth factor 1 induce IgE and IgG4 production by human B cells. *J. Exp. Med.*, 1994, Vol. 180, pp. 727-732.
14. Klamt S., Vogel M., Hiemisch A., Prensel F., Zachariae S., Ceglarik U., Thiery I., Kiess W. Association between IgE mediated allergies and diabetes mellitus tupe 1 in children and adolescents. *Pediatric Diadetes.*, 2015, Vol. 16, pp. 493-503.
15. Lai C.-Y., Lin S.-Y., Wu C.-K., Yen L.-T., Sytwu H.-K., Miaw S.-C. Tyrosine phosphorylation of c-Maf enhance the expression of IL-4 gene. *Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 4, pp. 1545-1550.
16. Roep B.O. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*, 2003, Vol. 46, no. 3, pp. 305-321.

Авторы:

Телесманич Н.Р. — д.б.н., профессор кафедры общей и клинической биохимии № 1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Коновальчик М.А. — аспирант кафедры общей и клинической биохимии № 1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Микашинович З.И. — д.б.н., профессор, заведующая кафедрой общей и клинической биохимии № 1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Криволапова Э.Г. — ординатор кафедры неврологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Telesmanich N.R., PhD, MD (Biology), Professor, Department of General and Clinical Biochemistry No. 1, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Konovalchik M.A., Graduate Student, Department of General and Clinical Biochemistry No. 1, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Mikashinovich Z.I., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of General and Clinical Biochemistry No. 1, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Krivilapova E.G., Clinical Resident, Department of Neurology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 02.08.2017

Отправлена на доработку 26.10.2017

Принята к печати 27.10.2017

Received 02.08.2017

Revision received 26.10.2017

Accepted 27.10.2017

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ВОДНО-СОЛЕВОГО МИКСТ-АЛЛЕРГЕНА ИЗ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ СУБЛИНГВАЛЬНОЙ ФОРМЫ

Бержец В.М.¹, Хлгатян С.В.¹, Петрова С.Ю.¹, Хрулева В.А.¹,
Ефремов М.А.², Васильева А.В.¹, Петрова Н.С.¹, Акутина В.А.¹

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

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

Резюме. В настоящее время аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) является наиболее патогенетически обоснованным методом лечения IgE-зависимых аллергических заболеваний. В широкой клинической практике в настоящий момент используют подкожный (ПКИТ) и сублингвальный (СЛИТ) способы АСИТ. Сублингвальная иммунотерапия отличается удобством применения, выраженным снижением системных и местных побочных эффектов и доказанной клинической эффективностью. В России, к сожалению, в настоящее время сублингвальных форм клещевых аллергенов для проведения АСИТ не производится. Ранее в нашей лаборатории была разработана технология получения сублингвального препарата аллергена из клещей *D. farina* и было показано, что полученный препарат не токсичен и не вызывает выраженных побочных эффектов. Целью настоящего исследования является получение препарата микст-аллергена из клещей *D. pteronyssinus* и *D. farinae*, предназначенного для проведения аллерген-специфической иммунотерапии сублингвальным способом. Задачи исследования: изучение физико-химических и иммунобиологических свойств полученного без фенольного водно-солевого микст-экстракта (БВСМЭ) из клещей *D. pteronyssinus* и *D. farinae*. Изучали свойства полученного БВСМЭ из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) и *Dermatophagoides farinae* (Der f), прошедшего стерилизующую фильтрацию. БВСМЭ анализировали методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецил-сульфата натрия и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией. Проводили ИФА с кроличьими поликлональными сыворотками, полученными в результате сенсибилизации животных рекомбинантными аллергенами Der f1 и Der f2. В ИФА показана положительная реакция БВСМЭ с IgG-антителами кроликов. Изучали острую и хроническую токсичность полученного микст-аллергенного препарата на лабораторных животных. Согласно проведенному патоморфологическому анализу было показано, что препарат не обладает токсичностью и не вызывает местного раздражающего действия у испытуемых животных. Полученный БВСМЭ содержит нативные белки, сохраняет иммуногенные свойства, не токсичен и не вызывает выраженных побочных эффектов. Данный экстракт может быть использован в качестве основы для создания сублингвальной формы клещевого микст-аллергена, что особенно перспективно для применения в педиатрической практике.

Ключевые слова: клещи домашней пыли, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, сублингвальная форма, аллергия, АСИТ

Адрес для переписки:

Петрова Станислава Юрьевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, М. Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (495) 917-52-64.
E-mail: laball@yandex.ru

Address for correspondence:

Petrova Stanislava Yu.
I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow,
Maliy Kazenny lane, 5a.
Phone: 7 (495) 917-52-64.
E-mail: laball@yandex.ru

Образец цитирования:

В.М. Бержец, С.В. Хлгатян, С.Ю. Петрова,
В.А. Хрулева, М.А. Ефремов, А.В. Васильева, Н.С. Петрова,
В.А. Акутина «Изучение свойств водно-солевого микст-
аллергена из клещей домашней пыли с целью создания
сублингвальной формы» // Медицинская иммунология, 2018.
Т. 20, № 4. С. 597-600.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-597-600

© Бержец В.М. и соавт., 2018

For citation:

V.M. Berzhets, S.V. Khlgatian, S.Yu. Petrova, V.A. Khruleva,
M.A. Efreinov, A.V. Vasilyeva, N.S. Petrova, V.A. Akutina
“Study of the properties of the mixed water/salt house dust mite
allergen aiming to design its sublingual form”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20,
no. 4, pp. 597-600.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-597-600

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-597-600

STUDY OF THE PROPERTIES OF THE MIXED WATER/SALT HOUSE DUST MITE ALLERGEN AIMING TO DESIGN ITS SUBLINGUAL FORM

Berzhets V.M.^a, Khlgtatian S.V.^a, Petrova S.Yu.^a, Khruleva V.A.^a, Efremov M.A.^b, Vasilyeva A.V.^a, Petrova N.S.^a, Akutina V.A.^a

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

^b Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. Current allergen-specific immunotherapy (AIT) is the most pathogenetically justified method of the IgE-dependent treatment of allergic diseases. Subcutaneous (SCIT) and sublingual (SLIT) AIT are currently used in wide clinical practice. Sublingual immunotherapy is characterized by the convenience of use, decreased incidence of systemic and local side effects, and proven clinical efficacy. However, sublingual form of home dust mite allergen for AIT is not yet produced in Russia. Previously, the technology for sublingual form of *D. farinae* (Der f) mites allergen was developed in our laboratory, and this extract was shown to be non-toxic and free of any significant side effects. We obtained a sublingual form of mixed *D. pteronyssinus* (Der p)/*D. farinae* mites allergen for sublingually allergen-specific immunotherapy. We studied physico-chemical and immunobiological properties of the Der p and Der f mites phenol-free water-salt mixed extract (WWSME). WWSME was studied after sterilizing filtration. WWSME was analyzed by electrophoresis in polyacrylamide gel in the presence of dodecyl-sodium sulfate and reverse-phase high-performance liquid chromatography. ELISA was performed with polyclonal rabbit serum, obtained by sensitization of animals with recombinant Der f1 and Der f2 allergens. ELISA shows positive reaction of WWSME with IgG-antibodies of rabbits. We studied acute and chronic toxicity of received mixed allergen in laboratory animals. Pathomorphological studies have shown that WWSME has no detectable toxicity and does not cause local irritation in the animals. The WWSME product contains native proteins, retains immunogenic properties, is non-toxic and does not cause significant side effects. This extract can be used as the basis for designing a sublingual form of dust mite mixed allergen, which is especially promising for pediatric applications.

Keywords: home dust mite allergens, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, sublingual form, allergy, allergen-specific immunotherapy

В настоящее время аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) является наиболее патогенетически обоснованным методом лечения IgE-зависимых аллергических заболеваний [1]. АСИТ можно рассматривать как проявление адаптационных иммунологических реакций организма на постепенное введение возрастающих доз аллергена, к которому выявлена сенсибилизация. АСИТ приводит к снижению аллергочувствительности к вводимому аллергену и в конечном итоге вызывает уменьшение или полное исчезновение клинических симптомов при естественной экспозиции аллергена [7]. В широкой клинической практике в настоящий момент используют подкожный (ПКИТ) и сублингвальный (СЛИТ) способы АСИТ [6, 9]. Сублингвальная иммунотерапия отличается удобством применения, выраженным снижением системных и местных побочных эффектов и доказанной клинической эффективностью [1, 4]. На международном

фармакологическом рынке существует немало препаратов, предназначенных для сублингвального применения. В России, к сожалению, в настоящее время подобных препаратов нет [1, 3, 8].

Ранее в нашей лаборатории была разработана технология получения сублингвального препарата аллергена из клещей *D. farinae*. Нами показано, что полученный препарат не токсичен и не вызывает выраженных побочных эффектов, благодаря отсутствию в нем консерванта — фенола [2].

Целью настоящего исследования является получение лечебной формы микст-аллергена из клещей *D. pteronyssinus* и *D. farinae*, предназначенной для проведения аллерген-специфической иммунотерапии сублингвальным способом. Задачи исследования: изучение физико-химических и иммунобиологических свойств полученного бесфенольного водно-солевого микст-экстракта (БВСМЭ) из клещей *D. pteronyssinus* и *D. farinae*.

Материалы и методы

Изучали свойства полученного БВСМЭ из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) и *Dermatophagoides farinae* (Der f), прошедшего стерилизующую фильтрацию. Концентрация белка составила 10150 ± 750 PNU. Длительность хранения 12-24 дней при t от -3 до -6 °С. БВСМЭ анализировали методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецил-сульфата натрия и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ ВЭЖХ). Проводили ИФА с кроличьими поликлональными сыворотками, полученными в результате сенсибилизации животных рекомбинантными аллергенами Der f1 и Der f2. Изучали острую и хроническую токсичность полученного микст-аллергенного препарата на лабораторных животных.

Результаты и обсуждение

Согласно проведенному патоморфологическому анализу, было показано, что препарат не обладает токсичностью и не вызывает местного раздражающего действия у испытуемых животных.

Электрофореграмма выявила, что в данном препарате имеются белки с молекулярной массой приблизительно 26 кДа, что согласуется

с данными литературы и соответствует главным клещевым аллергенам Der p1/Der f1(cysteine protease) [5]. Минорные аллергены не определяются на фореграмме, что, вероятно, связано с их низкой концентрацией в анализируемом препарате. В ИФА показана положительная реакция БВСМЭ с IgG кроликов, сенсибилизированных рекомбинантными аллергенами Der f1 и Der f2. ОФ ВЭЖХ выявила наличие от двух до восьми белковых фракций в растворе (в зависимости от условий проведения эксперимента), а также присутствие множественных фрагментированных пептидных молекул. Для идентификации выявленных белковых фракций нами проводится сравнительный анализ полученных пиков удерживания белков с пиками удерживания главных нативных аллергенов.

Выводы

Полученный БВСМЭ содержит нативные белки, сохраняет иммуногенные свойства, не токсичен и не вызывает выраженных побочных эффектов. Данный экстракт может быть использован в качестве основы для создания сублингвальной формы клещевого микст-аллергена, что особенно перспективно для применения в педиатрической практике. Полученный препарат может быть рекомендован для дальнейшего изучения.

Список литературы / References

1. Астафьева Н.Г., Гамова И.В., Удовиченко Е.Н., Перфилова И.А., Кобзев Д.Ю., Вачугова Л.К. Место аллергенспецифической иммунотерапии в лечении атопии // *Consilium medicum*, 2013. № 3. С. 55-61. [Astafyeva N.G., Gamova I.V., Udovichenko E.N., Perfilova I.A., Kobzev D.Yu., Vachugova L.K. Place of the allergen-specific immunotherapy in the atopy's treatment. *Consilium medicum*, 2013, no. 3, pp. 55-61. (In Russ.)]
2. Бержец В.М., Коренева Е.А., Петрова Н.С., Пищулина Л.А. Способ получения гранулированной лекарственной формы из аллергена клещей рода *Dermatophagoides farinae* // Патент на изобретение №: 2216353. 2002. С. 1. [Berzhets V.M., Koreneva E.A., Petrova N.S., Pishchulina L.A. A method of preparing a granular medicine form from *Dermatophagoides farinae* allergen. Patent for innovation No. 2216353, 2002, p. 1.]
3. Бжедугова Е.Р., Ненашева Н.М. Эффективность и безопасность сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии аллергенами клещей домашней пыли // *Российский аллергологический журнал*, 2008. № 6. С. 67-73. [Bzhedugova E.R., Nenasheva N.M. Efficacy and safety of house dust mite sublingual immunotherapy. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2008, no. 6, pp. 67-73. (In Russ.)]
4. Воробьева О.В., Гуштин И.С. Контролируемые исследования эффективности и безопасности аллерген-специфической иммунотерапии: исторический аспект // *Российский аллергологический журнал*, 2011. № 4. С. 3-14. [Vorobyeva O.V., Gushtin I.S. Controlled trials of the efficacy and safety of allergen-specific immunotherapy: historical aspect. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2011, no. 4, pp. 3-14. (In Russ.)]
5. Коровкина Е.С., Мокроносова М.А. Аллергия к клещам домашней пыли с позиций молекулярной аллергологии // *Медицинская иммунология*, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 279-288. [Korovkina E.S., Mokronosova M.A. House dust mite allergy in view of molecular allergology. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 279-288. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-279-288.
6. Сублингвальная иммунотерапия. Меморандум Всемирной организации по аллергии (WAO) // *Астма*, 2010. Т. 11, № 1. С. 5-57. [Sublingual Immunotherapy: Memorandum WAO (WAO). *Astma = Asthma*, 2010, Vol. 11, no. 1, pp. 5-57. (In Russ.)]

7. Хутеева С.Х., Федосеева В.Н. Аллергенспецифическая иммунотерапия бронхиальной астмы. М.: Экон, 2000. С. 250. [Khuteeva S.Kh., Fedoseeva V.N. Allergen-specific immunotherapy of Asthma]. Moscow: Ekon, 2000, p. 250.
8. Park K.H., Son M., Choi S.Y., Park H.J., Lee J.H., Jeong K.Y., Lee J.S., Park J.W. *In vitro* evaluation of allergen potencies of commercial house dust mite sublingual immunotherapy reagents. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2015, Vol. 7, no. 2, pp. 124-129.
9. Yuta A., Miyamoto Y., Ogihara H., Hattori R., Okubo K. Antigen specific sublingual immunotherapy for pediatric Japanese cedar pollinosis. *Alerugi*, 2009, Vol. 58, no. 2, pp. 124-132.

Авторы:

Бержец В.М. — д.б.н., профессор, заведующая лабораторией по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Хлгатаян С.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Петрова С.Ю. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Хрулева В.А. — младший научный сотрудник лаборатории по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Ефремов М.А. — младший научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБНУ «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия

Васильева А.В. — научный сотрудник лаборатории по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Петрова Н.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Акутина В.А. — младший научный сотрудник лаборатории по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Berzhets V.M., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Khlgatian S.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Petrova S.Yu., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Khruleva V.A., Junior Research Associate, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Efremov M.A., Junior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

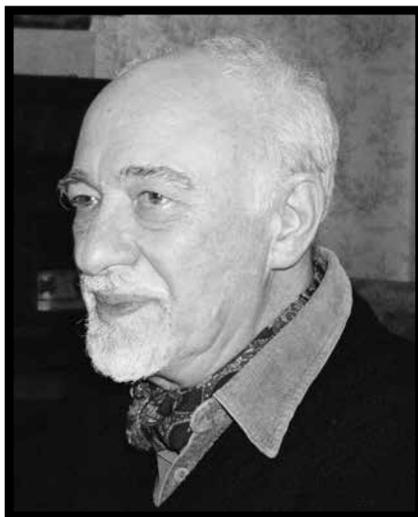
Vasilyeva A.V., Research Associate, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Petrova N.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Akutina V.A., Junior Research Associate, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 15.12.2017
Отправлена на доработку 18.12.2017
Принята к печати 21.12.2017

Received 15.12.2017
Revision received 18.12.2017
Accepted 21.12.2017



КЛИМОВИЧ

ВЛАДИМИР БОРИСОВИЧ

После продолжительной болезни в возрасте 80 лет ушел из жизни один из ведущих отечественных иммунологов Владимир Борисович Климович.

Окончив в 1965 г. 1-й Ленинградский медицинский институт им. И.П. Павлова, В.Б. Климович всю жизнь посвятил научно-исследовательской работе. В 1967 г. он защитил кандидатскую, а в 1996 г. — докторскую диссертацию. В 1998 г. ему присвоено ученое звание профессора по специальности «иммунология».

В течение 53 лет жизнь и творческая деятельность В.Б. Климовича были неразрывно связаны с НИИ рентгенологии и радиологии (ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий»). В период с 1971 по 1982 гг. работы В.Б. Климовича были посвящены изучению поздних последствий действия облучения на иммунологические реакции организма. В 1982 г. в рамках выполнения государственной программы по развитию биотехнологии в СССР В.Б. Климович организовал работу в новом для института направлении — гибридной технологии. Поставив перед собой и коллективом лаборатории задачу освоения новой области теоретических знаний и методических подходов, Владимир Борисович увлекал и вдохновлял всех своим редким умением преодолевать любые трудности и преграды на пути к поставленной цели. Он явился организатором и бессменным руководителем лаборатории гибридной технологии, которая успешно работает и развивается и в настоящее время. Задачей лаборатории явилось создание моноклональных антител, предназначенных для иммунодиагностики инфекционных, аутоиммунных, онкологических и эндокринных заболеваний человека. Результатом работы лаборатории явилась не имеющая аналогов панель моноклональных антител, включающая реагенты, которые распознают все классы иммуноглобулинов человека, подклассы IgG, легкие цепи, как свободные, так и связанные, а также белки, входящие в состав секреторных Ig: SC и J-цепь. Были получены антитела против ряда бактериальных и вирусных антигенов, против тиреоглобулина, против белка Тамма—Хорсфолла и против ряда других растворимых и клеточных антигенов. Реагенты, разработанные в лаборатории, прошли Государственные испытания и были включены в Государственный реестр медицинских изделий. На основе лаборатории В.Б. Климовичем была сформирована компания «ПОЛИГНОСТ», выпускающая моноклональные антитела и иммунодиагностические реагенты, которые славятся своей надежностью и которые используют в своей работе многие иммунологические лаборатории. До настоящего времени

В.Б. Климович по праву считался лучшим специалистом в области гибридной технологии с международным авторитетом.

В.Б. Климович пользовался высоким авторитетом среди коллег из медицинских и научных учреждений страны. Он был членом редколлегии научных журналов «Цитология», «Медицинская иммунология», «Цитокины и воспаление». Он выступал в качестве официального оппонента по диссертациям в ряде специализированных Ученых советов. В.Б. Климович принимал активное участие в проведении «Дней иммунологии в Санкт-Петербурге», ежегодной школы «Иммунология для врачей», читал курс лекций в Германии, выступал на международных школах и симпозиумах по иммунологии. Его блестящие выступления на научных форумах характеризовались глубиной мысли, широкой научной эрудицией, новизной и оригинальностью концепций и трактовок, привлекали интерес не только иммунологов, но и врачей-клиницистов. За внешней невозмутимостью и профессорской солидностью чувствовался яркий темперамент страстно увлеченного своим делом ученого.

В течение ряда лет В.Б. Климович, будучи профессором СПбГУ, читал для магистрантов курс лекций «Имунопатология и аллергология». Его лекционная манера отличалась отсутствием официозности, спокойным доверительным тоном и глубиной анализа материала. Он являлся выдающимся ученым и с присущим ему высоким профессионализмом, ответственностью, инициативой, твердостью и принципиальностью в работе передавал молодым специалистам свой богатый научно-практический опыт и обширные знания. Он являлся одним из организаторов и участников проведения на базе лаборатории курса летних практических занятий «Современные иммунологические методы исследования» для студентов кафедры цитологии и гистологии СПбГУ. В.Б. Климович воспитал целую Школу грамотных специалистов в области иммунологии и биотехнологии, многие из которых работают не только в руководимой им лаборатории, но и в других научных учреждениях страны и за рубежом. Владимир Борисович оставил нам новые идеи и новые знания, более 300 научных публикаций. Он подготовил 11 кандидатов и одного доктора наук.

В сообществе иммунологов города и страны нам будет не хватать В.Б. Климовича.

Светлая память о Владимире Борисовиче навсегда останется в наших сердцах.

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

Аак О.В.	561	Каретникова В.Н.	477	Сельков С.А.	485
Акутина В.А.	597	Керкешко Г.О.	485	Сенатов Ф.С.	515
Анисимова Н.Ю.	515	Киселевский М.В.	515	Соколов Д.И.	485
Асадуллина И.А.	463	Климко Н.Н.	561	Соловьева Г.И.	561
Бержец В.М.	597	Козлова Я.И.	561	Старостина Н.М.	577
Борисов А.Г.	551	Коновальчик М.А.	589	Сухорукова Э.Е.	523
Васильева А.В.	597	Корневский А.В.	485	Талаев В.Ю.	535
Власенко Р.Я.	515	Коротков М.Г.	543	Талаева М.В.	535
Волкова Р.А.	543	Криволапова Э.Г.	589	Телесманич Н.Р.	589
Воронина Е.В.	535	Кудрявцев И.В.	463, 551	Устинникова О.Б.	543
Гвоздев И.И.	551	Медведев А.Ю.	551	Учасова Е.Г.	477
Головкин А.С.	463	Микашинович З.И.	589	Учеваткина А.Е.	561
Голошапова Е.О.	543	Минаева Н.В.	523	Филиппова Л.В.	561
Груздева О.В.	477	Мошев А.В.	551	Фокина Е.С.	523
Давыдова М.Н.	577	Назарова Е.Л.	523	Фролова Е.В.	561
Должикова Ю.И.	515	Останин А.А.	577	Хлгатын С.В.	597
Дылева Ю.А.	477	Петрова Н.С.	597	Хрулева В.А.	597
Ефремов М.А.	597	Петрова С.Ю.	597	Черных Е.Р.	577
Заиченко И.Е.	535	Рунова О.Б.	543	Шардаков В.И.	523
Здзитовецкий Д.Э.	551	Савченко А.А.	551	Шевела Е.Я.	577
Караулов А.В.	515	Сахно Л.В.	577	Юрчинский В.Я.	571

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аденозин	463	межклеточные взаимодействия ...	485	сравнительная морфология	571
аллергический бронхолегочный		мезенхимальные		стандартный образец	544
аспергиллез	561	мультипотентные стромальные		стимулирующий фактор роста ...	477
аллергия	597	клетки	515	сублингвальная форма	597
антигенные детерминанты	589	мембранные молекулы	535	субстанция	544
антитела	589	микровезикулы	485	тимус	571
АСИТ	597	микроциркуляторное русло	571	тканеинженерные	
АТФ	463	моноциты	535	конструкции	515
биоимплантаты костей	515	нарушения углеводного обмена ..	589	трофобласт	485
бронхиальная астма	561	нейтрофилы	552	фагоцитоз	552
возрастные изменения	571	органические поражения мозга ..	577	фиброз	477
гемостаз	552	остеоиммунология	515	функциональная активность	552
гипертензия	485	острый панкреатит	552	функциональное	
группы крови (AB0)	589	пептидное картирование	544	восстановление	577
дендритные клетки	535	плацента	485	хемокины	561
иммунный ответ	524	подлинность	544	хронический лимфолейкоз	524
иммуномодулирующая		позвоночные животные	571	цитокины	535, 561, 577
активность	515	полиморфизм генов	524	эффективность лечения	524
инсулин	589	преэклампсия	485	<i>Aspergillus fumigatus</i>	561
интерлейкин-10	524	пуринергическая регуляция	463	<i>Aspergillus spp.</i>	561
интерлейкин-33	477	респираторный взрыв	552	CD39	463
интерферон альфа-2b	544	ритуксимаб	524	CD73	463
интраназальные ингаляции	577	сахарный диабет	589	<i>Dermatophagoides farinae</i>	597
итраконазол	561	созревание	535	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	597
клещи домашней пыли	597	специфический		IgE	589
макрофаги 2 типа	577	иммуноглобулин E	589		

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

