

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

Том 20, № 5. С. 607-778

2018

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



X 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 получат 12 зачетных единиц (кредитов) по специальности: «аллергология и иммунология» или «клиническая лабораторная диагностика»

Координатор проекта:

Председатель Правления СПб РО РААКИ, академик РАН, Тотолян Арег Артемович

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

тел./факс: (812) 232-00-66

e-mail: totolian@spb-raaci.ru

Заявки подавать до 1 декабря 2018 года.

Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна

Тел./факс: (812) 233-08-58

e-mail: shkola@spb-raaci.ru

Адрес для корреспонденции: 197136, Санкт-Петербург, а/я 58, СПб РО РААКИ

www.spb-raaci.ru

www.allergologi-immunologi.ru



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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

сентябрь-октябрь

2018, том 20

№ 5

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197136, Санкт-Петербург, а/я 58.

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

© Медицинская иммунология

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

Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

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

Издательство «Человек»

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 23.10.2018 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 21,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.)

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 года 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 Флориды, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

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

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

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

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

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

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

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

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH
(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

September-October

2018, volume 20

No. 5

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 Allergy, Chief, Moscow, Russian Federation

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

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

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

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

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

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

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

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

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaja
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

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

Address for correspondence:

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

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

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

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

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

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

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 23.10.2018. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 21,5. 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

Обзоры

Олейник Е.К., Чуров А.В., Олейник В.М.

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ: РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК Treg 613

Степанова О.И., Баженов Д.О., Хохлова Е.В., Коган И.Ю., Соколов Д.И., Сельков С.А.

РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD8⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ 621

Оригинальные статьи

Прохоренко Т.С., Зима А.П., Саприна Т.В., Мусина Н.Н., Шахманова Н.С., Васильева О.А., Новицкий В.В.

ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ У БЕРЕМЕННЫХ С АНЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ И ОЖИРЕНИЕМ 639

Глушков А.Н., Красильникова К.С., Поленок Е.Г., Костянюк М.В., Оленникова Р.В., Нерсисян С.Л.

СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ НА СОДЕРЖАНИЕ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ПОРОКАМИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА 647

Андреева Е.А., Хонина Н.А., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Пасман Н.М., Черных Е.Р.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ В Фолликулярной жидкости у женщин, проходящих лечение по программе ЭКО 657

Черткова А.И., Славина Е.Г., Шоуа Э.К., Жукова Л.Г., Окружнова М.А., Нуртдинова В.А., Борунова А.А., Джамгадзе Н.Т., Кадагидзе З.Г.

ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ТРОЙНЫМ НЕГАТИВНЫМ ФЕНОТИПОМ: СВЯЗЬ С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ХИМИОТЕРАПИИ 667

Михайлова Е.С., Вараксин Н.А., Архипов С.А., Голованова А.В., Студеникина А.А., Аутеншлюс А.И.

ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИЙ РЕСУРС ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ОПУХОЛЯХ И ПРЕДРАКОВЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 681

Коненков В.И., Королева Е.Г., Орлов Н.Б., Прокофьев В.Ф., Шевченко А.В., Новиков А.М.

СЫВОРОТОЧНЫЕ УРОВНИ ФАКТОРОВ РОСТА ГЕМОПОЭЗА И АНГИОГЕНЕЗА (IL-5, IL-7, IL-9, FGF- β , G-CSF, VEGF и PDGF) у женщин с миомой матки 691

Соколов А.В., Костевич В.А., Горбунов Н.П., Григорьева Д.В., Горудко И.В., Васильев В.Б., Панасенко О.М.

СВЯЗЬ МЕЖДУ АКТИВНОЙ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ И ХЛОРИРОВАННЫМ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ 699

Мальцева Н.В., Лапутенко Т.А., Архипова С.В., Смирнова А.Ш., Лыкова О.Ф., Горбатовский Я.А., Мещерякова О.А.

ЦИРКУЛЯТОРНЫЙ СЕКРЕТОРНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИН А ПРИ СЕПТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ 711

Петричук С.В., Мирошкина Л.В., Семикина Е.Л., Топтыгина А.П., Потапов А.С., Цимбалова Е.Г., Радыгина Т.В.

ПОКАЗАТЕЛИ ПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ КАК ПРЕДИКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРОМ TNF α у ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА 721

Краткие сообщения

Шрамко С.В., Зорина В.Н., Зорин Н.А., Ботвиньева И.А., Архипова С.В., Лихачева В.В.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ТКАНЯХ МАТКИ И СЫВОРОТОЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, ЦИТОКИНОВ, ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ ПРИ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ 731

Кочетова О.В., Ахмадишина Л.З., Корытина Г.Ф., Викторова Т.В.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ХЕМОКИНОВ, ИХ РЕЦЕПТОРОВ, ГЕНОВ БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ И ГЕНА CD4 ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ОЖИРЕНИЯ у ЖЕНЩИН 739

Авербах М.М. (мл.), Панова Л.В., Губкина М.Ф., Евсеева Н.И.

ДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГРАНУЛИЗИНА И КАТЕЛИЦИДИНА у ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ, БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ 747

Иммунологические методы

Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А., Сельков С.А., Чепанов С.В., Тотолян Арег А., Роггенбук Дирк

АНАЛИЗ СПЕКТРА АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ у ПАЦИЕНТОВ С ТРОМБОЗАМИ И ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ 753

Арсентьева Н.А., Тотолян Арег А.

МЕТОДИЧЕСКИЕ СЛОЖНОСТИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ 763

Правила для авторов 775

Авторский указатель 778

Предметный указатель 778

CONTENTS

Reviews

Oleinik E.K., Churov A.V., Oleinik V.M.

IMMUNOLOGICAL MEMORY: THE ROLE OF REGULATORY CELLS (Tregs) 613

Stepanova O.I., Bazhenov D.O., Khokhlova E.V., Kogan I.Yu., Sokolov D.I., Selkov S.I.

THE ROLE OF SUBPOPULATIONS OF CD8⁺ T LYMPHOCYTES IN THE DEVELOPMENT OF PREGNANCY 621

Original articles

Prokhorenko T.S., Zima A.P., Saprina T.V., Musina N.N., Shakhmanova N.S., Vasilyeva O.A., Novitsky V.V.

SIGNIFICANCE OF INFLAMMATION MARKERS DETERMINED IN PREGNANT WOMEN WITH ANEMIC SYNDROME AND OBESITY 639

Glushkov A.N., Krasilnikova K.S., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Olennikova R.V., Nersesyan S.L.

COMBINED EFFECT OF ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE UPON SEX HORMONE CONCENTRATIONS IN BLOOD SERUM OF PREGNANT WOMEN WITH CONGENITAL MALFORMATIONS OF FETUS 647

Andreeva E.A., Khonina N.A., Tikhonova M.A., Batorov E.V., Pasman N.M., Chernykh E.R.

REGULATORY T CELLS IN FOLLICULAR FLUID OF WOMEN UNDERGOING IVF TREATMENT 657

Chertkova A.I., Slavina E.G., Shoua E.K., Zhukova L.G., Okruzhnova M.A., Nurtdinova V.A., Borunova A.A., Dzhgamadze N.T., Kadagidze Z.G.

THE MAIN PARAMETERS OF CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER: RELATIONSHIP WITH EFFICIENCY OF CHEMOTHERAPY 667

Mikhaylova E.S., Varaksin N.A., Arkhipov S.A., Golovanova A.V., Studenikina A.A., Autenshlyus A.I.

CYTOKINE-PRODUCING RESOURCE OF IMMUNOCOMPETENT BLOOD CELLS IN BREAST TUMORS AND PRECANCEROUS CHANGES OF MAMMARY GLAND 681

Konenkov V.I., Koroleva E.G., Orlov N.B., Prokofiev V.F., Shevchenko A.V., Novikov A.M.

SERUM LEVELS OF HEMOPOIETIC AND ANGIOGENESIS GROWTH FACTORS (IL-5, IL-7, IL-9, FGF- β , G-CSF, VEGF AND PDGF) IN WOMEN WITH UTERINE MYOMA 691

Sokolov A.V., Kostevich V.A., Gorbunov N.P., Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Vasilyev V.B., Panasenkov O.M.

A LINK BETWEEN ACTIVE MYELOPEROXIDASE AND CHLORINATED CERULOPLASMIN IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASES 699

Mal'tseva N.V., Laputenko T.A., Arkhipova S.V., Smirnova A.Sh., Lykova O.F., Gorbatskiy Ya.A., Meshcheryakova O.A.

CIRCULATING SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A IN SEPTIC DISORDERS 711

Petrichuk S.V., Miroshkina L.V., Semikina E.L., Toptygina A.P., Potapov A.S., Tsimbalova E.G., Radygina T.V.

INDICATORS OF THE LYMPHOCYTE SUBSETS AS EFFICIENCY PREDICTORS OF THERAPY WITH INHIBITORS OF TNF α IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE..... 721

Short communications

Shramko S.V., Zorina V.N., Zorin N.A., Botvinyeva I.A., Arkhipova S.V., Likhacheva V.V.

INTERRELATION OF STEROID RECEPTOR GENE EXPRESSION IN UTERINE TISSUES AND SERUM CONCENTRATIONS OF IMMUNOREGULATORY PROTEINS, CYTOKINES, SEX STEROIDS IN PROLIFERATIVE DISEASES 731

Kochetova O.V., Akhmadishina L.Z., Korytina G.F., Victorova T.V.

GENE POLYMORPHISM ANALYSIS OF CHEMOKINES, CHEMOKINE RECEPTORS, ACUTE PHASE PROTEINS, AND CD14 IN FEMALE OBESITY DEVELOPMENT 739

Averbakh M.M. (Jr), Panova L.V., Gubkina M.F., Evseeva N.I.

DYNAMIC CHANGES OF GRANULYSIN AND CATHELICIDIN IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH DIFFERENT FORMS OF PULMONARY TUBERCULOSIS 747

Immunological methods

Tkachenko O.Yu., Lapin S.V., Shmonin A.A., Solovyova L.N., Bondareva E.A., Selkov S.A., Chepanov S.V., Totolian Areg A., Roggenbuck Dirk

RANGING OF ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES IN THE PATIENTS WITH THROMBOPHILIA AND RECURRENT MISCARRIAGE 753

Arsentieva N.A., Totolian Areg A.

METHODOLOGICAL ISSUES OF DETERMINING CONCENTRATIONS OF SOME CYTOKINES IN PERIPHERAL BLOOD FROM HEALTHY INDIVIDUALS..... 763

Instructions to Authors 775

Author index 778

Subject index..... 778

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ: РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК Treg

Олейник Е.К., Чуров А.В., Олейник В.М.

Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Резюме. Т-клетки памяти необходимы для развития иммунного ответа и представляют собой одну из наиболее многочисленных популяций Т-лимфоцитов человека. Регуляторные Т-клетки (Treg), напротив, выполняют функцию завершения адаптивного иммунного ответа и обеспечения толерантности к собственным антигенам. Эти группы клеток представлены разными субпопуляциями и присутствуют в организме в течение всей жизни. Однако сегодня еще нет ясного понимания того, как формируются взаимосвязи между этими группами клеток. В работе рассматриваются возможные пути развития и поддержания CD4⁺ Т-клеточной памяти с участием Treg-клеток. Обсуждаются разные механизмы дифференцировки Т-клеток памяти, Treg-клеток и недавно открытых Treg-клеток памяти, сравниваются их функциональные и молекулярно-генетические характеристики. Разделение клеток по функциональному профилю позволяет отметить параллели между Т-клетками памяти и Treg-клетками: и те и другие представлены центральными циркулирующими популяциями (T_c), эффекторными, которые мигрируют в ткани (T_e), и тканево-резидентными (T_r), пребывающими в тканях на периферии. Сходная структурная организация Tregs и Т-клеток памяти, существование переходных форм тканево-резидентных субпопуляций Tregs со свойствами клеток памяти может свидетельствовать о тесной взаимосвязи между данными группами лимфоцитов. Одним из вариантов такой связи может быть существование конверсии CD4⁺Т-клеток памяти с образованием Treg-клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор FoxP3. Treg-клетки памяти, обладающие свойствами и Т-клеток памяти, и Treg-клеток, могут представлять собой переходный этап дифференцировки. С другой стороны, Treg-клетки могут дифференцироваться независимо от Т-клеток памяти и накапливаться в течение жизни в виде Treg-клеток памяти, так как их супрессорная функция является столь же постоянно необходимой, как и готовность Т-клеток памяти развивать иммунный ответ. Возможно, часть Treg-клеток уже в тимусе проходит отбор и конститутивно экспрессирует антигенраспознающие рецепторы TCR, имеющие сродство с периферическими тканями. В дальнейшем эти коммитированные клетки могут расселяться в соответствующих тканях и становятся тканево-резидентными Treg-клетками, которые поддерживают региональную Т-клеточную память. Система Treg-клеток может представлять собой зеркальное отражение структурной организации Т-клеток памяти, но с обратным знаком — знаком супрессии. Количественное соотношение Treg-клеток и Т-клеток памяти (CD4⁺CD45RO⁺CD25^{hi}FoxP3⁺/CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺FoxP3⁻), возможно, является важным критерием для оценки функционального состояния иммунной системы. Поддержание баланса между этими функционально противоположными типами клеток должно обеспечивать устойчивое функционирование иммунной системы.

Ключевые слова: иммунологическая память, Т-клетки памяти, Treg-клетки, Treg-клетки памяти, субпопуляции, гетерогенность, дифференцировка

Адрес для переписки:

Олейник Евгения Константиновна
Институт биологии Карельского научного центра
Российской академии наук
185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск,
ул. Пушкинская, 11.
Тел.: 8 (8142) 76-98-10.
Тел./факс: 8 (8142) 76-98-10.
E-mail: ole@krc.karelia.ru

Address for correspondence:

Oleinik Evgeniya K.
Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian
Academy of Sciences
185910, Russian Federation, Republic of Karelia,
Petrozavodsk, Pushkinskaya str., 11.
Phone: 7 (8142) 76-98-10.
Phone/Fax: 7 (8142) 76-98-10.
E-mail: ole@krc.karelia.ru

Образец цитирования:

Е.К. Олейник, А.В. Чуров, В.М. Олейник
«Иммунологическая память: роль регуляторных клеток
Treg» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5.
С. 613–620. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-613-620
© Олейник Е.К. и соавт., 2018

For citation:

E.K. Oleinik, A.V. Churov, V.M. Oleinik "Immunological memory:
the role of regulatory cells (Tregs)", *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 613–620.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-613-620
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-613-620

IMMUNOLOGICAL MEMORY: THE ROLE OF REGULATORY CELLS (Tregs)

Oleinik E.K., Churov A.V., Oleinik V.M.

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Abstract. Memory T cells are necessary for development of the immune response and represent one of the most numerous population of human T lymphocytes. On the contrary, suppressive regulatory T cells (Tregs) may terminate the immune response and help to maintain tolerance to self-antigens. These important groups of cells are consisting of different subpopulations and retaining throughout life. However, today there is yet no clear understanding of how the relations between these two groups of cells are formed. In this work we consider possible ways of development and maintenance of CD4⁺ T cell memory and role of Tregs in these processes. Mechanisms of a differentiation of memory T cells, Tregs and recently described memory Tregs are discussed. The functional and genetic characteristics of these cells are compared. Division of cells according to the functional profile allows drawing parallels between memory T cells and Tregs. These two groups are consisted of central circulating populations (T_c), effector which can migrate toward specific tissues (T_e) and tissue-resident cells (T_r), which are staying in peripheral tissues. The similar structural organization of Tregs and memory T cells, existence of transitional forms of tissue-resident Treg subpopulations with properties of memory cells assumes existence of close interrelation between these groups of lymphocytes. The conversion of CD4⁺ memory T cells into FoxP3-expressing Tregs is one of possible mechanisms of communication between these two groups. The memory Treg-cells with T cell and memory Treg-cell properties can represent a transitional stage of differentiation. On the other side, Treg cells can differentiate independently of memory T cells and accumulate during life in the form of memory Treg cells. The suppressor function of Tregs is also necessary as well as function of memory T cells to develop the immune response. It is possible, that a subset of Treg cells undergoes selection in thymus and constitutively express TCR-receptors having affinity with peripheral tissues. Further, these committed cells can be settled into tissues and become tissue-resident Treg cells which maintain regional T cell memory. Tregs can represent the “mirror image” of the structural organization of memory T cells, but with the return sign – the sign of suppression. The quantitative ratio of Tregs and memory T cells (CD4⁺CD45RO⁺CD25^{hi}FoxP3⁺/CD4⁺CD45RO⁺CD25⁻FoxP3⁻), perhaps, is important criterion for functional assessment of immune system. The balance between these functionally opposite cell subsets has to provide stable functioning of immune system.

Keywords: immunological memory, memory T cells, Tregs, memory Tregs, subpopulations, heterogeneity, differentiation

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН, бюджетная тема № 0221-2017-0043.

Т-клетки памяти

Т-клетки памяти относятся к долгоживущим клеткам и характеризуются способностью длительное время персистировать в отсутствие АГ. Они обладают специфичностью к АГ или гаптену, значительной фенотипической и функциональной неоднородностью [8, 15]. Клетки памяти составляют наиболее многочисленную лимфоцитарную популяцию в течение большей части жизни индивида. Они также представляют преобладающую Т-клеточную популяцию в слизистых, коже, селезенке и костном мозге [14]. Эти Т-клетки аккумулируются на протяжении всей жизни, так как приобретение антигенного опыта сопровождается генерацией и персистенцией специфических клонов Т-клеток памяти, которые экспрессируют уникальные TCR и могут обеспечивать защиту от патогенов. После рождения Т-клетки памяти развиваются из наивных Т-клеток в ответ на встречи с разными антигенами. Предполагается, что при развитии иммунного ответа на АГ часть эффекторных клеток

выживает, приобретая свойства клеток памяти, в том числе АГ-специфичность, которая сохраняется в виде комплементарных антигену участков TCR [44]. Заметное увеличение циркулирующих Т-клеток происходит в первое десятилетие жизни, и к концу второго десятилетия Т-клетки памяти составляют до 35% циркулирующих Т-клеток. В третье десятилетие жизни количество циркулирующих Т-клеток памяти достигает максимума и стабилизируется. Выход Т-клеток из тимуса постепенно уменьшается в течение этой фазы, и далее число Т-лимфоцитов большей частью поддерживается через гомеостатический клеточный круговорот [11]. В эти средние годы жизни организм наиболее иммунологически устойчив и менее чувствителен к патогенам. После десятилетий стабильного состояния Т-клеток памяти функциональная активность этих клеток снижается в течение иммунологического старения, начиная с 65-70 лет [14, 18].

Т-клетки памяти человека экспрессируют RO изоформу CD45 в тимусе и конвертируются в CD45RA после эмиграции в периферические ткани, а при распознавании АГ на периферии эти клетки возвращаются опять к CD45RO. Почти все CD45RA⁺, экспрессирующие CD4⁺Т-клетки *in vitro*, теряют CD45RA-экспрессию и переходят

дят в $CD45RO^+$ клетки после 4 дней стимуляции TCR [4]. Хотя появились данные о переключении изоформы от $CD45RO$ назад к $CD45RA$ и на периферии [20], экспрессия изомера $CD45RO$ и отсутствие $CD45RA$ ($CD45RO^+CD45RA^-$), в комбинации с хемокиновыми рецепторами и селектинами в настоящее время широко используется для того, чтобы отличить наивные Т-клетки от Т-клеток памяти.

Гетерогенность Т-клеток памяти периферической крови человека была идентифицирована на основе экспрессии хемокинового рецептора CCR7 [38]. В отличие от наивных Т-клеток, которые экспрессируют CCR7, что отражает их преимущественную локализацию в лимфоидной ткани, Т-клетки памяти подразделяются на $CD45RA-CCR7^+$ центральные Т-клетки памяти (T_{cm}), которые передвигаются к лимфоидным тканям, и $CD45RA-CCR7^-$ эффекторные Т-клетки памяти (T_{em}), которые могут мигрировать во многие ткани. При этом T_{cm} интенсивно продуцируют IL-2, что не характерно для T_{em} клеток. Изучение экспрессии других поверхностных молекул, таких как маркер апоптоза CD95 (FAS) и ассоциированный с памятью маркер CD122 (IL-2R β), позволило очертить новую популяцию Т-клеток памяти у человека и мышей, названную стволовой клеткой памяти (T_{scm}) [16]. У человека T_{scm} клетки напоминали наивные Т-клетки, имея промежуточный фенотип $CD45RA^+CD45RO^-$, и экспрессировали повышенный уровень костимулирующих рецепторов CD27 и CD28, рецептор альфа-цепи IL-7 (IL-7R α), CD62L и CCR7. T_{scm} клетки имеют высокий пролиферативный потенциал, а также способность дальше дифференцироваться в другие Т-клеточные субпопуляции, включая T_{cm} и T_{em} , а также в противоопухолевые Т-клетки [17].

Хотя активное передвижение Т-клеток памяти по всему организму является неотъемлемой частью их способности обеспечивать иммунную защиту, исследования последних лет показывают, что дифференцировка некоторых Т-клеток в уникальные тканево-резидентные субпопуляции (T_{rm}), которые представлены практически во всех тканях и органах, дает хозяину возможность усилить региональный иммунитет [29].

Значительная часть $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти в селезенке, легких, кишечнике отличается повышенной экспрессией CD69, а экспрессия CD103 характерна для $CD8^+$ Т-клеток кишечника [40]. Изучение маркеров T_{rm} продолжается и пока трудно определить пропорции резидентных и циркулирующих Т-клеток памяти у человека. Однако становится все более очевидным, что именно тканево-резидентные клетки памяти составляют наиболее многочисленную фракцию общего пула Т-клеток памяти, что и привлекает особое внимание к этим клеткам.

Регуляторные клетки Treg

Как и Т-клетки памяти, регуляторные клетки Treg представлены разными субпопуляциями,

которые участвуют в контроле физиологического состояния организма. Эти клетки выполняют важную функцию завершения адаптивного иммунного ответа и обеспечения толерантности к собственным антигенам. Неспособность организма поддерживать достаточное количество и функции Treg приводит к аутоиммунным, опухолевым заболеваниям или к иммунодефицитным состояниям. В сущности, эти клетки являются супрессорами и могут подавлять активацию, пролиферацию и эффекторные функции широкого круга иммунокомпетентных клеток, включая $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки, а также NK-, NKT- и другие клетки. К Treg, обеспечивающим иммунологическую толерантность и супрессию Th1-зависимых аутоиммунных реакций, относят клетки с фенотипом $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$.

Используя метод иммунизации гаптенизированными IgG, Loblay R.H. и соавт. [26] впервые показали, что при первичном воздействии АГ среди Т-клеток генерируются супрессорные клетки памяти. Эти клетки были долгоживущими (не менее 9 мес.) и подавляли иммунный ответ с усиленной кинетикой при повторном контакте с АГ, причем в течение вторичного ответа требовалось в 5-10 раз меньше этих клеток, чтобы достичь уровня супрессии, эквивалентного тому, который наблюдается при первичном ответе. Авторы постулировали, что супрессорные клетки, проявляющие свойства Т-клеток памяти, могут играть важную роль в поддержании длительной толерантности к своим АГ. Было введено понятие регуляторной памяти, но эксперименты в течение длительного времени были затруднены в связи с отсутствием специфических маркеров, позволяющих выделять супрессорные клеточные популяции. В 2001 году Treg человека были впервые охарактеризованы как $CD4^+CD25^+$, так как были получены доказательства конститутивной экспрессии CD25 [2]. Открытие транскрипционного фактора FoxP3, как наиболее специфического маркера Treg-клеток, позволило более точно определять регуляторные популяции [21]. Важным оказалось то, что повышенная экспрессия FoxP3 в Т-клетках может быть одним из компонентов гомеостатической программы, инициируемой этими клетками, для реализации отрицательной обратной связи в ходе иммунного ответа. Дальнейшее изучение фенотипических и функциональных характеристик Treg-клеток выявило гетерогенность этой популяции, и начались попытки определить их происхождение и структурную организацию [37].

Периферическая кровь здорового человека содержит две фенотипически и функционально различающиеся популяции Treg-клеток: $CD45RA^+FoxP3^{low}$ и $CD45RA^-FoxP3^{hi}$ клетки, названные, соответственно, «отдыхающими» и «активированными» Treg-клетками [28]. Обе популяции были стабильными, высокосупрессивными

Treg-клетками, у которых отсутствовала продукция эффекторных цитокинов. При этом CD45RA⁺FoxP3^{hi}Treg-клетки экспрессировали высокий уровень внутриклеточных маркеров активации, таких как CTLA-4, ICOS, HLA-DR, GITR, CD39, CD45RO.

Возможно, что наивные или покоящиеся Treg-клетки эмигрируют из тимуса в раннем детстве и при встрече с АГ на периферии пролиферируют и дифференцируются в «активированные» эффекторные Treg-клетки. Можно предположить, что именно популяции «активированных» Treg-клеток среди мононуклеаров периферической крови человека и представляют собой Treg-клетки памяти, которые циркулируют и остаются активированными по своему фенотипу в отсутствие постоянной АГ-стимуляции. С возрастом количество CD45RA⁺Treg-клеток в периферической крови постепенно снижается, в то время как число CD45RO⁺Treg-клеток увеличивается [45]. Наименее высокий процент CD45RA⁺Treg-клеток содержит пуповинная кровь человека [13]. Подобно Т-клеткам памяти, CD4⁺Treg могут экспрессировать либо CD45RA, либо CD45RO. Так как известно, что CD45RA и CD45RO являются неизменными участниками активации антиген-распознающего Т-клеточного рецептора TCR, можно предположить, что изменение соотношения числа CD45RA⁺ и CD45RO⁺Treg отражает функциональное состояние регуляторных клеток и может быть индикатором супрессии. Возможно, что стимуляция TCR фенотипически проявляется в переходе одной изоформы в другую.

До сих пор остается неясным, какие механизмы обеспечивают стабильный уровень регуляторных CD4⁺CD45RO⁺CD25^{hi}FoxP3⁺Т-лимфоцитарных популяций человека в течение длительного времени вплоть до пожилого возраста (65–70 лет), когда наблюдается увеличение числа Treg [25]. В условиях стабильного состояния организма число CD4⁺CD45RO⁺CD25^{hi}FoxP3⁺Treg-клеток поддерживается в определенном количественном диапазоне с высоким темпом деления клеток. При этом Treg-клетки характеризуются очень короткими теломерами и невысокой теломеразной активностью, экспрессируют низкий уровень антиапоптотической молекулы BCL-2 и чувствительны к апоптозу, что отличает Treg от классических Т-клеток памяти и свидетельствует о маловероятности их самостоятельной регенерации. Скорее всего, эти клетки постоянно набираются из других предшественников, в частности, возможно, из пула CD4⁺Т-клеток памяти, так как существует очень тесная TCR клональная гомология между регуляторными клетками и CD4⁺Т-клетками памяти [46].

Кроме разделения по происхождению (тимические и периферические), FoxP3⁺Treg могут быть разделены по функциональному профилю на три группы: центральные, эффекторные

и тканево-резидентные [48]. Центральные Treg составляют большинство среди циркулирующих и находящихся во вторичных лимфоидных органах Treg-клеток. Эта популяция имеет фенотипические характеристики, сходные с наивными Т-клетками и Т-клетками памяти. Центральную популяцию Treg представляют клетки с фенотипом CD62L^{hi}CCR7⁺ или FoxP3^{low}CD45RA^{hi}CD25^{low}. Циркулирующие Treg обладают высокой скоростью пролиферации по сравнению с обычными Т-клетками: примерно 50% популяции проходит деление каждые 10 дней [25, 46]. Эффекторные Treg-клетки составляют минорную фракцию Treg-клеток как среди циркулирующих, так и во вторичных лимфоидных органах. Фенотипически эти клетки несут черты активированных антигеном Т-клеток, усиленно мигрируя через нелимфоидные ткани, и их можно определить как FoxP3^{hi}CD45RA^{low}CD25^{hi}. Тканево-резидентные Treg-клетки характеризуются тем, что долгое время пребывают в нелимфоидной ткани и могут приобретать антигенную специфичность, изменяя свои функции и гомеостатические свойства в зависимости от условий микроокружения [6, 19].

Регуляторные клетки памяти Treg

Потенциально каждый орган может быть гаванью различных популяций тканево-резидентных Treg-клеток, участвующих в регуляции местного иммунитета. Недавно были изучены фенотипические и функциональные характеристики Treg-клеток, которые удалось выделить из кожи человека [39, 47]. Оказалось, что почти все Treg-клетки в коже взрослого экспрессируют CD45RO, в то время как в коже плода значительная часть Treg-клеток была CD45RO⁺CD45RA⁺. Treg-клетки в коже взрослого экспрессировали высокий уровень и других маркеров (CD27 и BCL-2), ассоциированных с Т-клетками памяти. По сравнению с кожными эффекторными Т-клетками памяти эти Treg-клетки экспрессировали уникальную последовательность в TCR, не экспрессируя СС-хемокиновый рецептор 7 (CCR7) и не мигрируя из кожи *in vivo* [41]. Можно предполагать, что кожа человека содержит Treg-клетки с фенотипом «эффекторные клетки памяти», которые способны распознавать уникальные АГ и которые стабильно проживают в этой ткани. Примером тканево-резидентных Treg также являются Treg жировой ткани, которые экспрессируют транскрипционный фактор PPAR-gamma (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma), и Treg-клетки кишечника, которые экспрессируют рецептор свободных жирных кислот FFAR2 (free fatty acid receptor 2). Есть данные и о специализированных резидентных Treg в мышечной ткани [6]. Некоторые авторы считают, что TCR тканево-резидентных Treg реагирует на тканеспецифические сигналы и клетки приобретают тканево-специфический субфено-

тип [25]. В кишечнике, например, аккумулируется много разных по антигенной специфичности Treg, но большинство TCRs, выделенных из этих Treg, распознают антигены бактерий кишечника и, видимо, способствуют дифференцировке специфичных к микробиоте резидентных Treg [7, 23, 43].

Среди АГ-специфических регуляторных Т-клеток была выделена новая популяция — Treg-клетки памяти [34]. Исследования на моделях аутоиммунитета показали, что Treg-клетки памяти уменьшали повреждение тканей у мышей при повышенной чувствительности к реакции клеток памяти. Также есть данные о том, что регуляторные Т-клетки памяти способствуют усилению толерантности во время беременности [36]. Возможно, что постоянная экспрессия собственных АГ в тканях приводит к преимущественной аккумуляции Treg-клеток вместо эффекторных Т-клеток, и Treg-клетки памяти могут генерироваться из этих резидентных Treg-клеток. Важность регуляторных клеток памяти подчеркивается в ряде исследований, в которых фенотипически и функционально были охарактеризованы Treg-клетки памяти при вирусных инфекциях у мышей. Удалось показать персистенцию долгоживущих АГ-специфических Treg-клеток с мощными иммуносупрессивными свойствами, несмотря на элиминацию исходного АГ [5, 37]. Предлагают также разделить Treg памяти на центральные (те, которые находятся во вторичных лимфоидных органах), эффекторные (возможно, рециркулируют между кровью и нелимфоидными тканями, точно так же как Т-клетки памяти) и тканево-резидентные (пребывают в периферической ткани) [35].

Как упоминалось выше, число Treg в значительной степени увеличивается у стареющих людей (такая же динамика характерна для мышей). Поскольку Treg управляют интенсивностью Т-клеточных реакций, то при старении рост их числа способствует иммунным дисфункциям и снижению эффективности Т-клеточного ответа. Поэтому связанная с возрастом иммунная супрессия является основным фактором «иммунного старения», который повышает чувствительность к инфекциям и опухолям и существенно увеличивает заболеваемость у пожилых людей [32, 33]. Таким образом, следует иметь в виду, что, в дополнение к своей важной роли поддержания иммунологической толерантности, Treg могут вносить вклад в снижение эффективности Т-клеточного ответа при старении.

В настоящее время особое внимание привлекают вопросы генерации разнообразия популяций Treg, поддержания их стабильности. Иммунологическая память сохраняется в результате идиотип-антиидиотипических взаимодействий, образующих идиотипические сети. Может быть, таким же образом сложные сети управляют гене-

рацией регуляторных клеток памяти и их поддержанием.

Недавно было показано, что существует способ сигнализации TCR, который регулирует именно дифференцировку Treg-клеток, их численность и функции, оказывая влияние на экспрессию генов, метаболизм, клеточную адгезию и миграцию этих клеток [24]. Поэтому можно предположить, что именно TCR является основным триггером, который инициирует и в дальнейшем управляет дифференцировкой Treg в соответствии с их функциями в норме и при патологиях. Treg-клетки, которые способны подавлять аутоиммунное воспаление, экспрессируют высокие уровни TCR-индуцированных CD5, CTLA-4, CD25 (IL-2R α) и низкий уровень CD45RB. На необходимость сигналов TCR для экспрессии FoxP3 также указывает то, что активация TCR всегда предшествует транскрипции гена FoxP3. Кроме того, стимуляция TCR существенно активирует транскрипционные программы, которые связаны с развитием Treg, включая I κ B-киназы (IKK) — ассоциированные с ядерным фактором κ B (NF- κ B) и кальций-зависимым ядерным фактором активированных Т-клеток (NFAT). В эту сеть могут также входить и другие важные факторы влияния, такие как эпигенетические модификации, транскрипционные факторы, цитокины.

Treg-специфические эпигенетические изменения, например ДНК-гипометилирование (в локусе CNS2), способствуют экспрессии FoxP3 и других молекул, ассоциированных с Treg-клетками, а также обеспечивают стабильность клеточных линий, что имеет решающее значение для долгосрочной иммунологической толерантности [30]. Авторы считают, что эпигенетические модификации являются ключевым молекулярным событием для развития Treg, функционально отличающихся от других субпопуляций Т-клеток.

Известно, что высокий уровень транскрипционного фактора T-bet одновременно с низким уровнем транскрипционного фактора eomesodermin (EOMES) содействуют дифференцировке наивных CD8⁺ клеток в короткоживущие эффекторные клетки, в то время как низкий уровень T-bet с высоким уровнем EOMES приводят к их дифференцировке в клетки памяти [3]. Такая же закономерность может быть справедлива и для CD4⁺Т-клеток. Транскрипционный фактор В-лимфоцитов, индуцирующий созревание белка 1 (BLIMP1), также известный как PRDM1 и BCL-6, проявляет скоординированное влияние на развитие эффекторных клеток памяти CD4⁺ [10]. Интересно, что высокий уровень BLIMP1 экспрессируется и в популяции Treg-клеток с эффекторным фенотипом, и в фолликулярных Treg-клетках, которые также экспрессируют BCL-6. Таким образом, специфические транскрипционные факторы оказывают влияние на развитие эффекторных Treg-клеток и Treg-

клеток памяти, аналогично тому, что наблюдается в других $CD4^+$ T-клеточных субпопуляциях.

Важную роль в генерации и поддержании Treg-клеток памяти играют и цитокиновые факторы роста. Известно, что как IL-2, так и IL-7 вовлекаются в генерацию и поддержание $CD4^+$ T-клеточных популяций памяти [22]. CD127 (α -цепь рецептора для IL-7) экспрессируется на высоком уровне на $CD4^+$ эффекторных T-клетках памяти и играет важную роль в поддержании их в периферической ткани. Но большинство Treg-клеток, находящихся во вторичных лимфоидных органах, экспрессируют низкий уровень IL-7R, в то время как Treg-клетки памяти в коже имеют повышенную экспрессию IL-7. Было показано, что IL-2 был необходим для генерации и поддержания Treg-клеток памяти, в то время как IL-7, но не IL-2, требовался для их поддержания в коже [19]. Субпопуляция $CD44^{hi}CD62L^{low}CCR7^{low}$ Treg-клеток имеет пониженный уровень экспрессии IL-2R, и IL-2 не был необходим для поддержания этих клеток *in vivo* [42]. Значит, потребность в тех или иных цитокинах для разных субпопуляций Treg различна.

Отличающимися оказались и метаболические пути, которые используются на разных этапах дифференцировки и активации Treg-клеток. Если пролиферирующие клетки-эффекторы больше полагаются в основном на аэробный гликолиз, то клетки памяти зависят от окисления жирных кислот [31]. Устойчивая гликолитическая активность ингибирует формирование клеток памяти, тогда как ингибирование гликолиза способствует развитию этих клеток. Поэтому ингибирование мишени рапамицина (mTOR) способствует окислению жирных кислот и увеличению образования клеток памяти [1]. Возможно, T-клетки памяти больше зависят от окисления жирных кислот в связи с тем, что это дает преимущество для получения энергии в условиях стресса и обеспечивает более быстрое реагирование при реинфекции. Такой же метаболический путь способствует развитию Treg-клеток. По сравнению с эффекторными T-клетками, Treg-клетки экспрессируют низкий уровень глюкозного транспортера 1 (GLUT1, также известного как SLC2A1) и имеют более высокую скорость базального липидного окисления, что свидетельствует о том, что они в первую очередь используют окисление жирных кислот для своих энергетических потребностей [27]. В соответствии с этим блокирование либо гликолиза, либо мишени рапамицина mTOR способствует развитию Treg-клеток. Возможно, что активированные T-клетки дифференцируются в эффекторные Treg-клетки только при высоких уровнях активирующих mTOR сигналов, а при низком уровне сигналов, активирующих mTOR, — в долгоживущие Treg-клетки памяти [9]. Таким образом, метаболические нужды Treg и T-клеток памяти отличаются от таковых для других $CD4^+$ T-клеточных популяций, но

можно ли на основе различий в метаболизме разделить Treg-клетки памяти от наивных и эффекторных Treg-клеток, пока не ясно.

Заключение

В заключение следует отметить, что окончательно не стандартизированная, но принятая на сегодняшний день структурная организация T-клеток памяти очень напоминает структурную организацию регуляторных лимфоцитов Treg. И те и другие клетки представлены сходными функциональными субпопуляциями: T_{cm} — центральные циркулирующие, T_{em} — эффекторные, мигрирующие в ткани, T_{rm} — тканево-резидентные, пребывающие в тканях на периферии. Повидимому, популяционный состав Treg-клеток представляет собой зеркальное отражение структурной организации популяций T-клеток памяти, но с обратным знаком — знаком супрессии. Сосуществование этих двух функционально противоположных T-клеточных популяций обеспечивает стабильность и необходимый баланс для поддержания иммунного гомеостаза. Вероятно, соотношение Treg/T-клетки памяти (в частности $CD4^+CD45RO^+CD25^{hi}FoxP3^+/CD4^+CD45RO^+CD25^-FoxP3^-$) является важным показателем, отражающим функциональное состояние иммунной системы, и может быть использовано для оценки иммунного статуса.

По всей видимости, существует несколько путей генерации этих популяций лимфоцитов. Одним из вариантов взаимоотношений между клетками памяти и регуляторными клетками может быть конверсия $CD4^+$ T-клеток памяти в Treg, то есть $CD4^+$ T-клетки памяти могут быть предшественниками регуляторных супрессоров Treg. При получении сигнала (например, антигенного) клетки памяти активируются, индуцируют иммунный ответ, и часть образующихся эффекторных клеток дифференцируется в T-клетки памяти, из которых в свою очередь образуются Treg, включая экспрессию транскрипционного фактора FoxP3. Возможно, что Treg-клетки памяти, несущие черты и T-клеток памяти, и Treg-клеток, представляют переходные этапы дифференцировки регуляторных клеток и могут быть свидетельством конверсии T-клеток памяти в Treg и, возможно, обратно.

С другой стороны, если T-клетки памяти существуют для того, чтобы эффективно отвечать на те или иные антигенные стимулы, то не менее важно, чтобы существовали и механизмы, предусматривающие остановку этого иммунного ответа, его завершение. Можно предположить, что Treg дифференцируются параллельно с T-клетками памяти и накапливаются в течение жизни в виде Treg памяти, так как их супрессорная функция является столь же постоянно необходимой, как и готовность T-клеток памяти развивать иммунный ответ. Возможно, что часть nTreg уже в тимусе проходит отбор и конститутивно экспрессирует антигенраспознающие рецепторы TCR, имеющие сродство с периферическими тканями.

В дальнейшем эти коммитированные клетки могут расселяться в соответствующих тканях, становясь тканево-резидентными Трег и поддерживают защитную память в тканевых сайтах.

У человека клоны Т-клеток памяти могут жить десятилетиями, и, как упоминалось выше,

большинство Т-клеток в организме человека имеют фенотип памяти. Поэтому изучение Т-клеток памяти, более глубокое понимание их роли при аутоиммунных заболеваниях, инфекциях, противоопухолевом иммунитете позволит найти более целенаправленные подходы к иммунотерапии.

Список литературы / References

1. Araki K., Turner A.P., Shaffer V.O., Gangappa S., Keller S.A., Bachman M.F., Larsen C.P., Ahmed R. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*, 2009, Vol. 460, no. 7251, pp. 108-112.
2. Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 3, pp. 1245-1253.
3. Banerjee A., Gordon S.M., Intlekofer A.M., Paley M.A., Mooney E.C., Lindsten T., Wherry E.J., Reiner S.L. Cutting edge: the transcription factor eomesodermin enables CD8⁺ T cells to compete for the memory cell niche. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 9, pp. 4988-4992.
4. Booth N.J., McQuaid A.J., Sobande T., Kissane S., Agius E., Jackson S.E., Salmon M., Falciani F., Yong K., Rustin M.H., Akbar A.N., Vukmanovic-Stejic M. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4⁺ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 8, pp. 4317-4326.
5. Brincks E.L., Roberts A.D., Cookenham T., Sell S., Kohlmeier J.E., Blackman M.A., Woodland D.L. Antigen-specific memory regulatory CD4⁺Foxp3⁺ T cells control memory responses to influenza virus infection. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 7, pp. 3438-3446.
6. Burzyn D., Benoist, C., Mathis, D. Regulatory T cells in nonlymphoid tissues. *Nat. Immunol.*, 2013, Vol. 14, no. 10, pp. 1007-1013.
7. Cebula A., Rempala G.A., Pabla S.S., McIndoe R.A., Denning T.L., Bry L., Kray P., Kisielow P., Ignatovic L. Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota. *Nature*, 2013, Vol. 497, no. 7448, pp. 258-262.
8. Chang J.T., Wherry E.J., Goldrath A.W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 12, pp. 1104-1115.
9. Coe D.J., Kishore M., Marelli-Berg F. Metabolic regulation of regulatory T cell development and function. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, no. 590, pp. 1-6.
10. Cretny E., Xin A., Shi W., Minnich M., Masson F., Miasari M., Belz G.T., Smyth G.K., Busslinger M., Nutt S.L., Kallies A. The transcription factors BLIMP1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 4, pp. 304-311.
11. den Braber I., Mugwagwa T., Vriskoop N., Westera L., Mogling R., de Boer A.B., Willems N., Schrijver E.H.R., Spierenburg G., Gaiser K., Mul E., Otto S.A., Ruiter A.N., Ackermans M.T., Miedema F., José A.M. Borghans J.A.M., de Boer R.J., Tesselaar K. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 2, pp. 288-297.
12. den Braber I., Mugwagwa T., Vriskoop N., Westera L., Mogling R., de Boer A.B., Willems N., Schrijver E.H.R., Spierenburg G., Gaiser K., Mul E., Otto S.A., Ruiter A.N., Ackermans M.T., Miedema F., José A.M. Borghans J.A.M., de Boer R.J., Tesselaar K., Goronzy J.J., Weyand C.M. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat. Immunol.*, 2013, Vol. 14, no. 5, pp. 428-436.
13. Dong S., Maiella S., Xhaard A., Pang Y., Wenandy L., Larghero J., Becavin C., Benecke A., Bianchi E., Socie G., Rogge L. Multiparameter single-cell profiling of human CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T-cell populations in homeostatic conditions and during graft-versus-host disease. *Blood*, 2013, Vol. 122, no. 10, pp. 1802-1812.
14. Farber D.L., Yudanin N.A., Restifo N.P. Human memory T-cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 14, no. 1, pp. 24-35.
15. Farber D.L., Netea M.G., Radbruch A., Rajewsky K., Zinkernagel R.M. Immunological memory: lessons from the past and look to the future. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 2, pp. 125-128.
16. Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M.F., Almeida J.R., Gostick E., Yu Z., Carpenito C., Wang E., Douek D.C., Price D.A., June C.H., Marincola F.M., Roederer M., Restifo N.P. A human memory T-cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 10, pp. 1290-1297.
17. Gattinoni L., Klebanoff C.A., Restifo N.P. Path to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat. Rev. Cancer*, 2012, Vol. 12, no. 10, pp. 671-684.
18. Goronzy J.J., Weyand C.M. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat. Immunol.*, 2013, Vol. 14, no. 5, pp. 428-436.
19. Gratz I.K., Campbell D.J. Organ-specific and memory Treg cells: specificity, development, function, and maintenance. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 333.
20. Henson S.M., Riddell N.E., Akbar A.N. Properties of end-stage human T-cells defined by CD45RA re-expression. *Curr. Opin. Immunol.*, 2012, Vol. 24, no. 4, pp. 476-481.
21. Hori S., Haurly M., Coutinho A., Demengeot J. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25⁺4⁺ regulatory T-cells in anti-myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, Vol. 99, no. 12, pp. 8213-8218.
22. Katzman S.D., Hoyer K.K., Dooks H., Gratz I.K., Rosenblum M.D., Paw J.S., Isakson S.H., Abbas A.K. Opposing functions of IL-2 and IL-7 in the regulation of immune responses. *Cytokine*, 2011, Vol. 56, no. 1, pp. 116-121.
23. Lathrop S.K., Bloom S.M., Rao S.M., Nutsch K., Lio C-W., Santacruz N., Peterson D.A., Stappenbeck T.S., Hsieh C-S. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*, 2011, Vol. 478, no. 7368, pp. 250-254.
24. Li M.O., Rudensky A.Y. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 4, pp. 220-233.

25. Liston A., Gray D.H. Homeostatic control of regulatory T-cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 14, no. 3, pp. 154-165.
26. Loblay R.H., Pritchard-Briscoe H., Basten A. Suppressor T-cell memory. *Nature*, 1978, Vol. 272, no. 5654, pp. 620-622.
27. Michalek R.D., Gerriets V.A., Jacobs S.R., Macintyre A.N., MacIver N.J., Mason E.F., Sullivan S.A., Nichols A.G., Rathmel J.C. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 6, pp. 3299-3303.
28. Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A., Parizot C., Taflin C., Heike T., Valeyre D., Mathian A., Nakahata T., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., Amoura Z., Gorochov G., Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FOXP3 transcription factor. *Immunity*, 2009, Vol. 30, no. 6, pp. 899-911.
29. Mueller S.N., Mackay L.K. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 2, pp. 79-89.
30. Ohkura N., Kitagawa Y., Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 3, pp. 414-423.
31. Pearce E.L., Poffenberger M.C., Chang C.-H., Jones R.G. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*, 2013, Vol. 342, no. 6155, 1242454. doi: 10.1126/science.1242454.
32. Pulko V., Davies J.S., Martinez C., Lanteri M.C., Busch M.P., Diamond M.S., Knox K., Bush E.C., Sims P.A., Sinari S., Billheimer D., Haddad E.K., Murray K.O., Wertheimer A.M., Nikolich-Zugich J. Human memory T-cells with a naive phenotype accumulate with aging and respond to persistent viruses. *Nat. Immunology*, 2016, Vol. 17, no. 8, pp. 966-975.
33. Raynor J., Lages C.S., Shehata H., Hildeman D., Chouqnet C.A. Homeostasis and function of regulatory T-cells in aging. *Curr. Opin. Immunol.*, 2012, Vol. 24, no. 4, pp. 482-487.
34. Rosenblum M.D., Gratz I.K., Paw J.S., Lee K., Marshak-Rothstein A., Abbas A.K. Response to self antigen imprints regulatory memory in tissues. *Nature*, 2011, Vol. 480, no. 7378, pp. 538-542.
35. Rosenblum M.D., Way S.S., Abbas A.K. Regulatory T-cell memory. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 2, pp. 90-101.
36. Rowe J.H., Ertelt J.M., Xin L., Way S.S. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature*, 2012, Vol. 490, no. 7418, pp. 102-106.
37. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C.M., Hafler D.A. FOXP3⁺ regulatory T-cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 7, pp. 490-500.
38. Sallusto F., Lenig D., Forster R., Lipp M., Lanzavecchia A. Two subsets of memory T-lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, Vol. 401, no. 6754, pp. 708-712.
39. Sanchez Rodriguez R., Pauli M.L., Neuhaus I.M., Yu S.S., Arron S.T., Harris H.W., Yang S.H., Anthony B.A., Sverdrup F.M., Krow-Lucal E., MacKenzie T.C., Johnson D.S., Meyer E.H., Lohr A., Hsu A., Koo J., Liao W., Gupta R., Debbaneh M.G., Butler D., Huynh M., Levin E.C., Leon A., Hoffman W.Y., McGrath M.H., Alvarado M.D., Ludwig C.H., Truong H.A., Maurano M.M., Gratz I.K., Abbas A.K., Rosenblum M.D. Memory regulatory T-cells reside in human skin. *J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 124, no. 3, pp. 1027-1036.
40. Sathaliyawala T., Kubota M., Yudanin N., Turner D., Camp P., Thome J.J., Bickham K.L., Lerner H., Goldstein M., Sykes M., Kato T., Farber D.L. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T-cell subsets. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 1, pp. 187-197.
41. Schenkel J.M., Fraser K.A., Masopust D. Cutting edge: resident memory CD8 T cells occupy frontline niches in secondary lymphoid organs. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 7, pp. 2961-2964.
42. Smigiel K.S., Richards E., Srivastava S., Thomas K.R., Dudda J.C., Klonowski K.D., Campbell D.J. CCR7 provides localized access to IL 2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J. Exp. Med.*, 2014, Vol. 211, no. 1, pp. 121-136.
43. Tanoe T., Atarashi K., Honda K. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 5, pp. 295-309.
44. Taylor J.J., Jenkins M. CD4⁺ memory T cell survival. *Curr. Opin. Immunol.*, 2011, Vol. 23, pp. 319-323.
45. van der Geest K.S., Abdulahad W.H., Tete S.M., Lorencetti P.G., Horst G., Bos N.A., Kroesen B.J., Brouwer E. Aging disturbs the balance between effector and regulatory CD4⁺ T cells. *Exp. Gerontol.*, 2014, Vol. 60, pp. 190-196.
46. Vukmanovic-Stejic M., Zang Y., Cook J.E., Fletcher J.M., McQuaid A., Masters J.E., Rustin M.H.A., Taams L.S., Beverley P.C.L., Macallan D.C., Akbar A.N. Human CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T-cells are derived by rapid turnover of memory populations *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 9, pp. 2423-2433.
47. Vukmanovic-Stejic M., Sandhu D., Sobande T.O., Agius E., Lacy K.E., Riddell N., Montez S., Dintwe O.B., Scriba T.J., Breuer J., Nikolich-Zugich J., Ogg G., Rustin M.H., Akbar A.N. Varicella zoster-specific CD4⁺Foxp3⁺ T cells accumulate after cutaneous antigen challenge in humans. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 3, pp. 977-986.
48. Xiao-Feng Qin F. Dynamic behavior and function of FOXP3⁺ regulatory T cells in tumor bearing host cell. *Molecular Immunol.*, 2009, Vol. 6, no. 1, pp. 3-13.

Авторы:

Олейник Е.К. — д.б.н., доцент, главный научный сотрудник, руководитель группы иммунологии, Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Чуров А.В. — к.б.н., научный сотрудник группы иммунологии, Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Олейник В.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник группы иммунологии, Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Authors:

Oleinik E.K., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Senior Research Associate, Head, Immunology Group, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Churov A.V., PhD (Biology), Research Associate, Immunology Group, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Oleinik V.M., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Immunology Group, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Поступила 09.11.2017

Принята к печати 28.11.2017

Received 09.11.2017

Accepted 28.11.2017

РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD8⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Степанова О.И.¹, Баженов Д.О.¹, Хохлова Е.В.¹, Коган И.Ю.¹,
Соколов Д.И.^{1,2}, Сельков С.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. В настоящее время выявлено существование широкого спектра субпопуляций CD8⁺Т-лимфоцитов, среди которых выделяют субпопуляции наивных клеток, клеток памяти, регуляторных. Кроме клеток с высоким уровнем цитотоксической активности, выявлены субпопуляции, обладающие выраженной регуляторной активностью. Каждая субпопуляция характеризуется совокупностью продуцируемых медиаторов, поверхностных и внутриклеточных маркеров, позволяющих предположить их различную функциональную активность в условиях *in vivo*. В настоящем обзоре описана классификация CD8⁺Т-лимфоцитов, учитывающая их морфофункциональные признаки. Традиционно считается, что CD8⁺Т-лимфоциты являются популяцией лимфоцитов, обладающей высокой цитотоксической активностью, что имеет чрезвычайное значение в условиях инвазии полуалогенных плодовых клеток в эндометрий при беременности. Доля CD8⁺Т-лимфоцитов в децидуальной оболочке довольно велика. В обзоре обсуждаются известные на сегодняшний день механизмы регуляции дифференцировки, избирательной миграции и функциональной активности CD8⁺Т-лимфоцитов в децидуальной оболочке и плаценте при беременности. Основными факторами цитотоксического действия CD8⁺Т-лимфоцитов являются перфорин и гранзим. К регуляторным медиаторам CD8⁺Т-лимфоцитов относят цитокины IL-2, IL-5, IL-13, IFN γ , IL-17, TGF- β и IL-10. Для развития эффекторных свойств CD8⁺Т-лимфоцитов необходима антигенная стимуляция, которую обеспечивает взаимодействие CD8⁺Т-лимфоцитов с активированными CD4⁺Т-лимфоцитами или дендритными клетками, воздействие цитокинов. Условия специфической дифференцировки CD8⁺Т-лимфоцитов формируются за счет различного характера микроокружения. В децидуальной оболочке при беременности наблюдается концентрация CD8⁺Т-лимфоцитов, но их фенотип и функциональная активность отличаются от CD8⁺Т-лимфоцитов периферической крови. В настоящее время продолжается изучение механизмов избирательной миграции CD8⁺Т-лимфоцитов с регуляторными свойствами в децидуальную оболочку. Полагают, что это обеспечивается при участии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR5, цитокинов IL-6 и IL-15. Характер активности CD8⁺Т-лимфоцитов и продукция ими цитокинов CSF2, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 и TNF α в децидуальной оболочке имеют решающее значение для успешной инвазии клеток трофобласта. В свою очередь, клетки трофобла-

Адрес для переписки:

Соколов Дмитрий Игоревич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 323-75-45, 328-98-50.
Факс: 8 (812) 323-75-45.
E-mail: falcojuggen@yandex.ru

Address for correspondence:

Sokolov Dmitry I.
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
199034, Russian Federation, St. Petersburg, Mendeleevskaya line, 3.
Phone: 7 (812) 323-75-45, 328-98-50.
Fax: 7 (812) 323-75-45.
E-mail: falcojuggen@yandex.ru

Образец цитирования:

О.И. Степанова, Д.О. Баженов, Е.В. Хохлова, Коган И.Ю., Д.И. Соколов, С.А. Сельков «Роль различных субпопуляций CD8⁺Т-лимфоцитов при беременности» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 621-638.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-621-638
© Степанова О.И. и соавт., 2018

For citation:

O.I. Stepanova, D.O. Bazhenov, E.V. Khokhlova, Kogan I.Yu., D.I. Sokolov, S.A. Selkov "The role of subpopulations of CD8⁺ T lymphocytes in the development of pregnancy", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 621-638.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-621-638
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-621-638

ста и плаценты способствуют формированию пула регуляторных CD8⁺T-лимфоцитов в децидуальной оболочке, способны индуцировать апоптоз CD8⁺T-лимфоцитов. Таким образом, взаимодействие CD8⁺T-лимфоцитов матери и трофобласта в зоне маточно-плацентарного контакта является важным звеном в формировании иммунологической толерантности в системе мать-плод.

Ключевые слова: T-лимфоциты, беременность, цитотоксичность, децидуальная оболочка

THE ROLE OF SUBPOPULATIONS OF CD8⁺ T LYMPHOCYTES IN THE DEVELOPMENT OF PREGNANCY

Stepanova O.I.^a, Bazhenov D.O.^a, Khokhlova E.V.^a, Kogan I.Yu.^a, Sokolov D.I.^{a,b}, Selkov S.A.^a

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

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

Abstract. At the present time, a broad spectrum of CD8⁺ T lymphocyte subsets is revealed, including naïve cells, memory cells and regulatory subpopulations. Along with cells with high cytolytic activity, some subsets with marked regulatory activity were found there. Each subpopulation is characterized by a set of produced mediators, surface and intracellular markers allowing to suggest their differential *in vivo* functional activity. The present review article proposes a classification of CD8⁺ T cells which takes into account their morphological and functional features. According to conventional view, the CD8⁺ T lymphocytes is a cell population exhibiting high cytotoxic ability which is of critical significance in pregnancy, under the conditions of semi-allogenic fetal cell invasion into the endometrium. The fraction of CD8⁺ T cells is rather high in decidual structures. The review discusses the known mechanisms of differentiation regulation, selective migration and activity of CD8⁺ T cells in decidual membrane and placenta in the course of pregnancy. Perforine and granzyme are the main cytotoxicity factors of CD8⁺ T cells. IL-2, IL-5, IL-13, IFN γ , IL-17, TGF- β and IL-10 cytokines are considered regulatory mediators of CD8⁺ cells. To induce the effector properties of CD8⁺ T cells, an antigenic stimulation is required, which is provided by interactions between the CD8⁺ T cells and activated CD4⁺ T cells or dendritic cells, cytokine effects. Specific differentiation of the CD8⁺ T cells is determined by differences in microenvironment. In the course of pregnancy, accumulation of CD8⁺ T cells is observed in decidual membrane, but their phenotype and functional properties differ from CD8⁺ T cells in peripheral blood. At present time, the mechanisms of selective CD8⁺ T cell migration to decidual membrane are studied. These events are suggested to be mediated by means of CXCR3 and CCR5 chemokine receptors, IL-6 and IL-15 cytokines. The features of CD8⁺ T cell activities, and production of some cytokines, e.g., CSF2, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF α in decidual membrane and is of critical significance for effective invasion of trophoblast cells. In turn, the trophoblast and placental cells promote development of regulatory CD8⁺ T lymphocytes in decidual membrane, being able to induce CD8⁺ T cell apoptosis in decidual membrane. Hence, interaction between the maternal CD8⁺ T cells and trophoblast in the area of uterine-placental contact is an important link during development of immunological tolerance in the maternal/fetal system.

Keywords: T lymphocytes, pregnancy, cytotoxic, decidua

The present work was supported by the Russian Foundation for Basic Research grant No. 17-04-00679 and the Russian Science Foundation grant No. 17-15-01230.

Introduction

Cytotoxic lymphocytes are one of the key cellular elements, whose action is aimed at viral clearance. However, the spectrum of their function is much wider. It is noted that the change in metabolic pathways and function of CD8⁺ T lymphocytes is

associated with aging of the organism [46]. In connection with the possibility of recognition of MHC I, CD8⁺ T lymphocytes are an important part of the antitumor immune response. In particular, activated CD8⁺ T lymphocytes control cell growth in solid tumours [23]. CD8⁺ T lymphocytes are involved in many pathological processes, for example, in nerve fibre damage in multiple sclerosis [133], cerebral vasculature in cerebral malaria [126], bronchial asthma [95], rheumatoid arthritis [16] and immunopathology in skin leishmaniasis [94]. In the host graft system,

the effect of CD8⁺ T lymphocytes is also crucial for engraftment of the graft [5, 112, 151].

Pregnancy is a unique example of the coexistence of genetically diverse tissues. In this case, the placenta is not an absolute barrier to the cells of the immune system of the mother: there is a mutual penetration of the cells of the mother and foetus – the phenomenon of microchimerism, which can both positively and negatively affect the outcome of pregnancy [101, 108]. T lymphocytes are of great importance for the recognition and elimination of foreign genetic material in the body, however, in the case of physiological pregnancy, there is no attack from the mother's immune system – explained by the immunological tolerance for the foetus. At present, the mechanisms of the development of this tolerance are intensively studied. In the endometrium and decidua, a change in the CD8⁺ T lymphocyte content is observed when pregnancy occurs compared with non-pregnant women and obstetric pathologies compared to the physiological course of pregnancy, but the role of these cells has not been sufficiently studied. It has been established that along with CD8⁺ T lymphocytes possessing cytotoxic action, there are CD8⁺ T lymphocytes with regulatory properties, as well as several subpopulations of memory cells. CD8⁺ T lymphocytes probably play one of the most important roles in the preservation or rejection of the foetus. At the present time, however, the whole spectrum of CD8⁺ T lymphocyte subpopulations is insufficiently characterized and the role of these cells in maintaining a physiological pregnancy is not fully understood.

Phenotype and functional activity of CD8⁺ T lymphocytes

For a long time, CD8⁺ T lymphocytes have been considered a homogeneous population. At present, it has become clear that the diversity of CD8⁺ T lymphocyte subpopulations is determined by their differences both in phenotype, and in functional purpose, and in the characteristics of intercellular interactions. The vast majority of CD8⁺ T lymphocytes express the transcription factors T-bet and STAT4 and secrete the cytokines IFN γ and TNF α [93]. The main factors of the cytotoxic effect of CD8⁺ T lymphocytes are perforin and granzymes [93]. In addition, CD8⁺ T lymphocytes express a rather wide spectrum of receptors characteristic for NK cells: KIR – CD158a/h, CD158bj, CD94, NKG2A, NKG2C [132].

Several different subpopulations of CD8⁺ T lymphocytes are described in the public sources. The earliest classification of these lymphocytes is based on the spectrum of cytokines secreted by them. According to this classification, CD8⁺ T lymphocytes can be

divided into 3 subpopulations: Tc1 – producing IFN γ and not producing IL-4; Tc2 – not producing IFN γ , producing IL-4; and Tc0 – producing IFN γ and IL-4 [90, 138]. The majority of CD8⁺ T lymphocytes of human peripheral blood (80%) belongs to Tc1 [138]. Tc1 secrete IL-2, IFN γ , small amounts of IL-5, IL-13, and express the transcription factors T-bet and Hlx. Tc2 and Tc0 secrete IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 [138]. Tc2 express the transcription factors GATA3 and Hlx [83]. Tc0 and Tc2 are characterized by high expression of CD30, CD40L, CD28, whereas Tc1 have a low expression of these molecules [138]. Tc2 are identified by the expression of the CCRTH2 marker. The cytotoxic activity of the three subpopulations of CD8⁺ T lymphocytes is not different [138]. At the functional level, Tc1 accumulates faster in the lymph nodes and promotes a faster development of the immune response, and they are more apoptotic after activation (the mechanism does not involve changes in Fas and FasL expression) than Tc2 [128, 138]. Cytokine IL-4 stimulates the development of IL-4-producing subpopulations, suppressing production of IFN γ [138]. The effect of IL-4 results in a loss of ability of Tc1 to secrete IL-2, and hence a loss of ability to spontaneously proliferate [111]. IL-12 inhibits the production of IL-5, IL-4 and IL-10, but stimulates the production of IFN γ , stimulates the development of the Tc1 subpopulation [138]. Subpopulations of Tc0 and Tc2 are not affected by IL-12 or IL-4 [138]. Prostaglandin E2 promotes a shift in the equilibrium toward Tc2 [10]. Due to the secretion of various cytokines, Tc can change the direction of differentiation of CD4⁺ T lymphocytes. Currently, there are still studies using this classification.

In the most frequently used classification, CD8⁺ T lymphocytes are divided depending on the expressed markers on naïve (CD45RA⁺CCR7⁺), effector (CD45RA⁺CCR7⁻), effector memory cells (CD45RA⁻CCR7⁻) and memory cells (CD45RA⁻CCR7⁺) [130]. Naïve CD8⁺ T lymphocytes have the phenotype CD44^{low}; when activated, the expression of this marker increases [22]. Depending on the expression of CD28 and CD27, effector cells and memory effector cells are divided into the following subpopulations: EM1 (CD28⁺CD27⁺), EM2 (CD28⁻CD27⁺), EM3 (CD28⁻CD27⁻), and EM4 (CD28⁺CD27⁻) [130].

During the immune response, CD8⁺ T lymphocytes form memory cells, which are divided into three types: resident, effector and central [70]. Resident memory CD8⁺ T lymphocytes are localized in non-lymphoid tissues (mucous membranes and reproductive tract), differ in the inability to leave tissues in circulation and are characterized by the

phenotype CD8⁺CD103⁺CD69⁺ [70, 124]. Effective CD8⁺ T memory lymphocytes can migrate between tissues and secondary lymphoid organs, they do not express homing molecules that determine migration to the lymph nodes [124], are characterized by the CD8⁺CD45RO⁺CD62L⁺CCR7⁻ [70] phenotype, high expression of cytolytic enzymes [130], high expression of transcription factor GATA3, high level of expression of IL-6R α , IL-7R α and increased level of proliferation [74]. Under the *in vitro* conditions, it was shown that after activation (CD3/CD28), these cells also produce cytokines IL-2, IL-5, IL-13 and IFN γ [74]. In the experiment, it was shown that the proliferation of effector CD8⁺ T lymphocytes is stimulated by IFN γ , with the synergistic action of IL-6 and IL-15 [74]. Also, the proliferation of effector CD8⁺ T lymphocytes can support IL-2 (autocrine). Cytokines secreted by effector memory CD8⁺ T lymphocytes are involved in antiviral and antibacterial defence of the body, in addition, there is an increase in the content of these cells in autoimmune processes (bronchial asthma) [74]. Central memory CD8⁺ T lymphocytes are localized in secondary lymphoid organs, they express homing molecules that determine migration to the lymph nodes, have a CD8⁺CD45RO⁺CD62L⁺CCR7⁺ phenotype and a high proliferative potential upon re-encounter with antigens [70, 124].

By analogy with CD4⁺ lymphocytes, Tc17 producing IL-17 are isolated. They are characterized by the phenotype CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CCR5⁺CCR6⁺, secretion of cytokines IL-17, IFN γ [68]. A subpopulation of CD8⁺ non-cytotoxic IL-17-producing T lymphocytes (Tcn17) is also formed, which is formed in the presence of TGF- β and IL-6 [83]. This subpopulation is characterized by the expression of the transcription factor Th17 ROR γ t, reduced expression of the transcription factors GATA3, T-bet, Hlx, the lack of production of IFN γ , granzyme B, IL-10 and the absence of cytolytic activity [83].

CD8⁺ regulatory T lymphocytes (CD8⁺ Treg) are a population of cells newly identified and are currently intensively studied. Along with CD4⁺ Treg, CD8⁺ Treg are important for the formation of immunological tolerance [84]. Their presence in immunologically privileged organs, participation in many pathologies of immune genesis, as well as their key role in the host-transplant reaction have been described. For CD8⁺ Treg, the expression of CTLA-4, CD25, HLA-DR, CD45RA, CCR7, CD62L, CD28, CD101, CD103, CD122, TcR α/β , ICOS, FOXP3 and HELIOS, IL-2ra, CCR4, GARP, IL-10 and TGF- β [2, 7, 37, 55, 75, 84, 119]. Expression of these molecules is important both for maintaining the CD8⁺ Treg population and

for manifesting their functional activity against other cells [55]. According to some data, CD8⁺ Treg does not express CTLA-4, FasL [119]. CD4⁺ T lymphocytes requires the expression of FoxP3 for the implementation of regulatory properties [39, 121, 148]. Depending on the expression of FoxP3 CD8⁺ Treg can be divided into CD8⁺FoxP3⁺ and CD8⁺FoxP3⁻ subpopulations. For CD8⁺FoxP3⁺Treg, CD62L expression is also characteristic. Phenotype CD8⁺ FoxP3⁻ Treg is characterized by the expression of CD103, which is crucial for the formation and implementation of suppressive properties of CD8⁺ Treg lymphocytes, especially for the subpopulation of CD8⁺ FoxP3 cells [75, 84]. There are data on intracellular expression of FoxP3, characteristic of CD8⁺ Treg of lymphocytes [7, 55]. Expression of surface molecules is largely specifically regulated by various microRNAs [55]. Probably, the formation of two subpopulations (CD8⁺FoxP3⁺ and CD8⁺FoxP3⁻ Treg) is associated with the action of TGF- β (in conjunction with the activation of the T cell receptor) and IL-10 [37, 84]. Both subpopulations have a low expression of perforin and granzymes, intracellular expression and secretion of IL-10, and their suppressive effect is not due to cytotoxic effects, but to the production of TGF- β and IL-10 and contact interactions involving the CTLA-4 molecule [55, 84, 119].

Thus, the population of CD8⁺ T lymphocytes is a collection of cells quite diverse in phenotype and function. The conditions for differentiation of CD8⁺ T lymphocytes are also different.

Differentiation of CD8⁺ T lymphocytes

Recent thymic emigrants that have just emerged from the bone marrow are localized in the blood and spleen, and differ from mature naïve cells: they have a decreased secretion of immunoregulatory cytokines, reduced expression of CD62L, CXCR4, granzyme B, reduced cytotoxicity, the ability to rapidly proliferate with an immune response and provide antiviral protection [27]. It is believed that decidual CD8⁺ T lymphocytes refer to such recent thymic emigrants at the periphery, but this issue has not been studied enough.

The antigen-independent differentiation of CD8⁺ T lymphocytes occurs in the thymus, from where the naïve cells exit into the periphery. In addition, naïve CD8⁺ T lymphocytes undergo antigen-dependent differentiation in secondary lymphoid organs: in the lymph nodes [15, 135] and in the spleen [11], naïve CD8⁺ T lymphocytes interact with dendritic cells (DC) via the XCR1⁺ molecule in the presence of secreted IL-15, and also in the presence of CD4⁺ T lymphocytes secreting IL-2 [70]. Naïve CD8⁺ T lymphocytes are located in the paracortical area of the lymph node [63].

In secondary lymphoid organs, CD8⁺ T lymphocytes, along with DC, contribute to the activation of CD4⁺ T lymphocytes [11]. The interaction of CD8⁺ T lymphocytes with CD4⁺ T helper cells is not necessarily accompanied by detachment from DC [11]. Further, the aggregate migrates into the white pulp of the spleen [11].

After activation, CD8⁺ T lymphocytes can differentiate into short-living effector cells that attack infected cells and die as a result of apoptosis after performing their function, or differentiate into circulating central memory cells [9]. About 5-10% of activated CD8⁺ T lymphocytes are transformed into memory cells [9]. Central memory cells are localized mainly in the interfollicular region of the lymph nodes [63]. CD8⁺ T lymphocytes are stored in the lymph nodes due to the expression of the homing receptors CCR7 and CD62L (L-selectin) [131].

Developing the effector properties of CD8⁺ T lymphocytes requires a triple signal: antigen stimulation through TcR, a costimulatory signal from CD28, microenvironment – exposure to cytokines IL-12, IFN α , IFN β [24, 88]. IL-12 and IFN type I cytokines play an important role both for the formation of a pool of effector cells and for the formation of memory cells [147]. These cytokines promote differentiation mainly into the Tc1 subpopulation [90]. The effect of cytokines causes a change in the expression of hundreds of genes responsible for proliferation, cytotoxic lymphocyte effector activity, survivability, migration, a wide range of transcription factors (including T-bet and Blimp-1) [24]. Secreted on the first day after activation of naïve CD8⁺ T lymphocytes, IFN γ via autocrine action activates and differentiates CD8⁺ T lymphocytes into cytotoxic T lymphocytes, stimulates the expression of the transcription factor T-bet, granzyme B production and plays an important role in early activation [22]. The effect of IFN γ is synergistically enhanced by the action of IFN α and IFN β , but it does not matter for the differentiation of naïve CD8⁺ T lymphocytes in the presence of IL-12 [22].

The interaction of CD8⁺ T lymphocytes with activated CD4⁺ T lymphocytes, DC, is important for the formation of a pool of memory CD8⁺ T lymphocytes, as well as the effect of cytokines. The interaction of CD8⁺ T lymphocytes with DC is exercised through the CD70 molecule on the DC and CD27 on the surface of CD8⁺ T lymphocytes, and the interaction of CD40L on activated CD4⁺ T lymphocytes with CD40 on DC is simultaneously observed [50]. The expansion of memory CD8⁺ T lymphocytes depends on the interaction with CD4 T helper cells via CD40/CD40L and minor histocompatibility molecules [109]. The kinetics of cellular interaction remains a debating point [50]. It is believed that there

is also a reserve pathway for maintaining memory cell differentiation, which is relevant in the absence of IL-12 and IFN type I, but it is not yet identified [147].

In the absence of CD4⁺ T lymphocytes, naïve CD8⁺ T lymphocytes cannot activate into effector cells, whereas memory CD8⁺ T lymphocytes can proliferate and differentiate into effector cells [76].

The IL7R, IL2R, IL15R, microRNA (miR)-155 receptors play an important role in determining the direction of differentiation of CD8⁺ T lymphocytes in the direction of the effector or memory cells, as well as the nature of the activation of TcR, in particular, the impact through the molecules of diacylglycerol (DAG), DAG kinase (DGK) α and ζ [8, 60, 113, 131, 150]. Deletion of DGK α and ζ leads to a decrease in the number of memory cells. This effect can be detected by observing a decrease in CD8⁺ expression by T lymphocytes of CD127, CD62L expression, as well as disturbance of the homeostasis of a subpopulation of memory cells and their viability [150]. Also, the deletion of DGK α and ζ causes a decrease in CD8⁺ T lymphocyte expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5 and CXCR3, responsible for migration to the lymph nodes during the immune response [150].

CD8⁺ T regulatory lymphocytes can differentiate from naïve or effector CD8⁺ T lymphocytes in both the thymus and periphery [2]. As in the case of CD4⁺ Treg cells, TGF- β is important in the formation of the CD8⁺ Treg subpopulation: it suppresses the cytotoxic activity of CD8⁺ lymphocytes [127] by inducing microRNAs, leading to suppression of IFN γ production [17, 84]. The effect of TGF- β was also manifested in the increased expression of CTLA-4, ICOS by the CD8⁺ T lymphocytes, and the CD62L on the FoxP3⁺ subpopulation of CD8⁺ T lymphocytes, but molecule CD103 on the subpopulation of CD8⁺FoxP3⁻ T lymphocytes [75, 84]. TGF- β -induced CD8⁺FoxP3⁺ and FoxP3⁻ cells reduce production of IFN γ and do not proliferate in response to IL-2 [84]. The effect of monoclonal anti-CD3 antibodies with *in vitro* conditions leads to the induction of differentiation and expansion of CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg lymphocytes [32]. Mesenchymal stem cells (MSC) of the placenta promote the differentiation of the CD8⁺ Treg lymphocytes (CD8⁺IL-10⁺) with the participation of the PDL2 molecule (anti-programmed death ligand-2) [77]. IFN γ and TNF α stimulate the expression of PDL2 on placental MSC and differentiation of CD8⁺IL-10⁺ lymphocytes [77].

Thus, CD8⁺ T lymphocytes are capable of differentiation both in the thymus and in the periphery. The direction of differentiation depends on the nature of the intercellular interactions within the antigen presentation process in conjunction with the action

of soluble factors. The mechanisms of regulation of differentiation of CD8⁺ T lymphocytes, in particular at the periphery, have not been sufficiently studied. After differentiation, CD8⁺ T lymphocytes acquire the ability to specifically migrate to further their function.

Migration of CD8⁺ T lymphocytes to the decidua

CD8⁺ T lymphocytes are present in peripheral blood, endometrium of non-pregnant women and in the decidua during pregnancy. There is little data on migration mechanisms of CD8⁺ T lymphocytes. However, several specific molecules can be isolated, whose expression promotes selective migration of cytotoxic lymphocytes into the decidua. Migration of CD8⁺ T lymphocytes to the decidua is facilitated by an increase in the expression of CXCR3 [21] and CCR5 [63, 93]. CXCR3 ligands produce decidual stromal cells: CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC) [30]. CXCL9 is expressed in the placenta and in the chorioamniotic membrane, is found in the bloodstream, and the increased production of this molecule is associated with premature delivery and low foetal weight [29, 62, 65, 105, 115]. The increased CXCL11 content in amniotic fluid in the second trimester of pregnancy is associated with premature delivery [30] and may be associated with the involvement of CD8⁺ T lymphocytes by enhancing their migration. CCR5 ligands are CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), RANTES. CCL4 is produced by decidual stromal cells [30], and CCL3 is expressed in the placenta by trophoblast, endothelial cells [1]. RANTES is produced by the decidua [28] and the placenta [47]. Trophoblast produces MIP-1 α and RANTES, CCL3 [54, 99].

The decidua is observed to be the producer of IL-15 [96]. Migration of CD8⁺ memory cells largely depends on the binding of P- and E-selectins, the expression of which increases in the presence of IL-15 [66]. CD8⁺ T lymphocytes are characterized by expression of the CXCR6 receptor, which, through interaction with the chemokine CXCL16 secreted by trophoblast, attracts T lymphocytes to the decidua [52]. CD103 expression can be associated with the migration of CD8⁺ Treg into the inflammation zone [56, 84]. In the placenta, the CD103 ligand – E-cadherin, is expressed by the villous trophoblast and is important for the functioning of the trophoblast itself [14, 78, 81], as well as the decidua [33, 154]. Expression by villous and extravillous trophoblast, endometrial cells of prostaglandin D2 can cause specific migration to the decidua (to the implantation site of the foetal egg) of Tc2 lymphocytes due to their expression of CCR2 [89].

When endometrial cells are differentiated into decidual cells, the expression of CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10), CXCL11 (ITAC) and CCL5 (RANTES) is suppressed, which leads to a decrease

in Tc1 involvement in the decidua compared to the endometrium of non-pregnant women [35]. This can be one of the mechanisms of formation of immunological tolerance in the mother-foetus system.

If there is an infection, the migration of CD8⁺ T lymphocytes to the decidua increases, activation of CD8⁺ T lymphocytes occurs and immunological aggression against the foetus without elimination of the pathogen develops due to the action of CD8⁺ T lymphocytes [21]. Expression of E-cadherin with syncytiotrophoblast during preeclampsia is enhanced in comparison with physiological pregnancy [53, 81], which may contribute to excessive involvement of CD8⁺ T lymphocytes to the placenta.

Cytokine IL-6 plays an important role in the formation and development of pregnancy, is found in significant amounts in the stroma of the decidua, trophoblast and endothelium of the spiral arteries. It has been established that IL-6 promotes the proliferation and differentiation of CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg, an increase of their share in the blood stream and, as a result, an increase in their migration to the decidua [42, 56, 92], which can significantly contribute to the formation of immunological tolerance of mother's immune system in relation to the foetus and the development of the placenta [102], as well as in the process of rejection of the foetal tissues during the delivery [97].

In the endometrium of non-pregnant women, the proportion of IFN γ ⁺CD8⁺ T lymphocytes reaches 25% of all CD8⁺ T lymphocytes; in spontaneous abortions, there is a significant decrease in the content of IFN γ ⁺CD8⁺ T lymphocytes in the decidua compared with the endometrium of non-pregnant women (less than 11% of CD8⁺ T lymphocytes) [31], which indicates the important role of CD8⁺ T lymphocytes in implantation and the establishment of pregnancy.

Currently, there is no consensus on the persistence of the population of cytotoxic lymphocytes in the decidua during pregnancy. Some authors claim that during the pregnancy, the amount of CD8⁺ T lymphocytes in the decidua of women does not change [145] and is 45-75% of the T lymphocytes of the decidua (T lymphocytes constitute 10-20% of decidual leukocytes) [34, 52, 93]. Other authors point out a different content of cytotoxic lymphocytes in the decidua, depending on the period of pregnancy. In the first trimester of pregnancy, the proportion of CD8⁺ T lymphocytes in the decidua is insignificant and is 2-7% of the CD45⁺ cells, while in the third trimester of pregnancy it is up to 30% [21]. Such a difference in the data obtained by the authors on the content of T lymphocytes in the decidua can be associated with the absence of standardized methods for isolating cells from the decidua.

The ratio of T cell populations in the systemic blood stream and decidua is different. In the decidua, the CD8⁺ T lymphocyte count is 62%, and CD4⁺ is 33% [91] of the total number of T lymphocytes, whereas in the peripheral blood, the proportion of CD8⁺ lymphocytes is 21%, and 75% of CD4⁺ lymphocytes [91]. The number of CD8⁺ memory T lymphocytes in the decidua considerably exceeds their number in peripheral blood [134], and the proportion of naïve CD8⁺ T lymphocytes is much lower than in peripheral blood [130], which indicates the presence of predominantly differentiated cells. Decidual CD8⁺ T lymphocytes have a lower degree of expression of perforin and granzyme B compared to CD8⁺ T lymphocytes of peripheral blood, and a small number of CD8⁺ T lymphocytes expressing granzyme B [130] (Table 1).

With pathologies of pregnancy, there is a change in the content of CD8⁺ T lymphocytes in the blood and decidua. Thus, with preeclampsia, a decrease in CD8⁺FoxP3⁺ T lymphocytes (CD8⁺ T regulatory cells) in peripheral blood of women has been

observed [152]. Spontaneous abortion shows an increased CD8⁺ lymphocyte count in the decidua [6]. The development of chronic chorioamnionitis in pregnant women is accompanied by an increase in the cytotoxic activity of CD8⁺ T lymphocytes, characterized by the phenotype CD300a⁺CD8⁺, in the systemic blood flow compared to women with a physiological pregnancy [64].

Thus, CD8⁺ T lymphocytes play one of the decisive roles in the physiological and pathological development of pregnancy. Not only the existence of specific migration mechanisms of various subpopulations of CD8⁺ T lymphocytes in the endometrium and decidua is observed, but their concentration in these tissues in comparison with peripheral blood. At the same time, the ratio of various subpopulations of CD8⁺ T lymphocytes in the decidua at various stages of development of pregnancy is substantive.

Phenotypic and functional features of CD8⁺ T lymphocytes of the decidua

The presence of CD8⁺ T lymphocytes in the endometrium is important for the implantation of the

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF SUBPOPULATIONS OF DECIDUAL CD8⁺ T LYMPHOCYTES

Subpopulation of decidual CD8 ⁺ lymphocytes		Surface markers	Intracellular markers	Secreted cytokines	Share in the decidua
naïve		CD8 ⁺ , CD45RA ⁺ , CCR7 ⁺ , CD62L ⁺ , CD45RO ⁻ [87], CD27 ⁺ , CD28 ⁺ [131], CD44 ^{low} [22]	T-bet and STAT4 [93]	IFN γ , TNF α [93]	3% [131]
Memory cells	Resident memory cells	CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD103 ⁺ CD69 ⁺ [70, 136]			
	Central memory cells	CD8 ⁺ , CD45RO ⁺ , CCR7 ⁺ , CD62L ⁺ , CD45RA ⁻ , CD27 ⁺ , CD28 ⁺ [70]	Eomes ^{low} [87]		2% [131]
	Memory cells (memory effector cells)	CD8 ⁺ , CD45RO ⁺ , CD62L ⁻ , CCR7 ⁻ [70], CD45RA ⁻ [131], IL-6R α ⁺ , IL-7R α ⁺ [41, 74], CD103 ⁺ ICOS ⁺ , CD69 ⁺ , HLA-DR ⁺ [91, 129, 130, 134]	GATA3 [74], Tbet ⁺ , Eomes ⁺ [87]	Contradictory data on the production of cytolytic enzymes (increased [130], reduced expression of granzyme B and perforin [134]) IL-2, IL-5, IL-13, IFN γ [74]	65% [131]
Effector T lymphocytes		CD8 ⁺ , CD45RA ⁺ [131], CD45RO ⁻ [87], CD62L ⁻ , CCR7 ⁻ [41]	T-bet ⁺ [87]	Reduced expression of granzyme B and perforin	13% [131]
CD8-suppressor (regulatory) cells		CD8 ⁺ CD28 ⁻ , CD69 ⁺ , HLA-DR ⁺ [129], CD103 ⁺ CD62L ⁺ , CD25 ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD45RA ⁺ , CCR7 ⁺ , CD28 ⁺ , CD101 ⁺ , CD122 ⁺ , TcR α / β ⁺ , ICOS ⁺ , FOXP3 ⁺ , HELIOS ⁺ , IL-2RA ⁺ , CCR4 ⁺ , GARP ⁺ [2, 7, 37, 55, 75, 84, 119]	FoxP3 ⁺ [41] Vbeta 9 [119]	CCR4, IL-10 and TGF- β [2, 7, 37, 55, 75, 84, 119] IL-10, low expression of perforin and granzyme	
Tc17		CD27 ⁻ , CD28 ⁺ , CD45RA ⁻ , CCR5 ⁺ , CCR6 ⁺ [18]		IL-17, IFN γ [68]	

ovum. Cells of the Tc2 subpopulation predominate in the implantation site. They express CRTH2, which is an additional receptor of prostaglandin D2 and is characteristic of Th2 [89]. The cytolytic activity of CD8⁺ T lymphocytes is hormone-dependent: it is present in the proliferative phase of the menstrual cycle and is absent in the secretory phase [142].

Decidual CD8⁺ T lymphocytes differ in phenotype and functional characteristics from peripheral blood lymphocytes (Table 1). In the bloodstream, naïve CD8⁺ T lymphocytes predominate [131]. Decidual and placental CD8⁺ T lymphocytes in the vast majority are activated effector cells or effector memory T cells [131] (Table 1). Activated effector cells are characterized by the phenotype CD45RA⁺, CD45RO⁻, CD62L⁻, CCR7⁻, expression of Tbet transcription factor [41, 87, 131]. Effector memory cells are characterized by the phenotype CD8⁺CD45RA⁻CCR7⁻CD28⁻CD45RO⁺CD103⁺ICOS⁺, increased expression of CD69 and HLA-DR and lack of perforin. Whereas in the peripheral blood, naïve CD8 T cells (CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁻CCR7⁺) predominate [91, 129, 130, 134]. Also for effector memory T cells, expression of NK cell receptors (KIR – CD158a/h, CD158b/j, CD94, NKG2A, NKG2C) is characteristic [69, 132]. NK receptor expression is controlled by the cytokines IL-2, IL-4, IL-23, TGF-β, IL-15, IL-6, IL-10, IL-21, and also depends on the nature of the antigen (due to the interaction with CD28) [132]. Expression of one of the NK receptors – CD158a/h, is increased in CD8⁺ T lymphocytes of the decidua compared to CD8⁺ T lymphocytes of peripheral blood; the expression of the remaining NK receptors on CD8⁺ T lymphocytes of the decidua and peripheral blood is the same [132]. At the same time, decidual CD8⁺ T lymphocytes are characterized by reduced cytotoxic activity compared with peripheral CD8⁺ T lymphocytes. One of the proposed mechanisms for this phenomenon may be the reduced expression of FasL, as well as perforin and granzyme B. At the same time, high expression of mRNA perforin and granzyme B was established, which indicates a post-translational mechanism of blocking the production of these proteins [130, 134]. Also, reduced cytotoxicity may be associated with the effect of the locus molecules HLA-G and HLA-C expressed by the trophoblast. The functions of NK receptors on CD8⁺ T lymphocytes have not been adequately studied at present.

The decidual CD8⁺ T lymphocytes of the first trimester of pregnancy secrete *in vitro* CSF2, IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, and TNF (especially IFNγ and IL-8), that stimulates trophoblast invasion [91, 114]. A high level of TGF-β provides a high threshold level of cytolytic activity of

CD8⁺ T lymphocytes in the decidua [21], which also contributes to the successful invasion of trophoblast. This effect can be associated with suppression of CD8 molecule expression by cytotoxic T lymphocytes in the presence of TGF-β [98].

An ICOS molecule is expressed on 96% of decidual CD8⁺ T lymphocytes [91], which belongs to the family of CD28-B7 costimulatory molecules. Expression of ICOS is inducible. ICOS binds to ICOSL, expressed on professional APC (B cells, macrophages, DC), epithelial and endothelial cells [143], including on the trophoblast [91]. It was noted that as a result of ICOS binding to ligand, decidual CD8⁺ T lymphocytes secrete more IFNγ and IL-10 than CD8⁺ T lymphocytes of peripheral blood [91]. Such stimulation of secretory activity of CD8⁺ T lymphocytes upon contact with trophoblast through ICOS can be directed to stimulation of trophoblast invasion. It was shown that the ICOS molecule is important for the realization of the immunological response by T helper cells (cell proliferation, activation), T regulatory cells (differentiation, proliferation) [146] and Th17 lymphocytes [61, 91, 143]. The important role of the ICOS molecule expressed by CD8⁺ T lymphocytes in the antigen-dependent response in tissue transplantation has been shown. In particular, in the “graft versus host” system, the deletion of ICOS on CD8⁺ T lymphocytes leads to a fatal outcome, caused by excessive expansion and secretory activity of CD8⁺ T lymphocytes [153]. In peripheral CD8⁺ T lymphocytes, early expression of ICOS results in migration to non-lymphoid organs, increased cytolytic activity and decreased ability of CD8⁺ T lymphocytes to participate in the development of a secondary immune response [82]. Probably, decidual CD8⁺ T lymphocytes thus contribute to the formation of a favourable cytokine microenvironment and a decrease in the cytotoxicity of the cells of the immune system of the mother during the trophoblast implantation. On the other hand, decidual CD8⁺ T lymphocytes of the first trimester of pregnancy *in vitro* have the ability for extracellular cytolysis [114]. When decidual CD8⁺ T lymphocytes are exposed to proinflammatory cytokines and activation of their TcR, their expression of perforin and granzyme B, as well as their degranulation of cytotoxic granules, is enhanced, which distinguishes these cells from decidual NK cells characterized by greatly reduced cytolytic activity [21]. Simultaneously, decidual CD8⁺ T lymphocytes produce more granulin as compared to a similar subpopulation of peripheral blood, which can provide local protection against intracellular and extracellular pathogens [21].

The proteins Tim-3 (T cell immunoglobulin mucin-3) and PD-1 (programmed cell death-1)

are important signalling molecules of CD8⁺ T lymphocytes. Their functions have not been sufficiently studied. The high level of expression of PD-1 and Tim-3 CD8⁺ T lymphocytes correlates with reduced antiviral activity of these cells, reduced proliferative activity of CD8⁺ T lymphocytes and reduced secretion of pro-inflammatory cytokines CD8⁺ T lymphocytes, while their blockade leads to restoration of proliferation and synthetic activity cells [57, 100]. There is also evidence that the interaction of PD-1 and B7-H1 determines the cytotoxic pathway of differentiation of CD8⁺ T lymphocytes [40]. Signals from PD-1 and Tim-3 synergistically reinforce each other [57, 140]. It has been shown that Tim⁺PD-1⁺CD8⁺ T lymphocytes are concentrated in the decidua in a physiological pregnancy and participate in the establishment of pregnancy in the early stages [57, 140, 149]. Tim⁺PD-1⁺CD8⁺ T lymphocytes show an increased level of proliferative activity in comparison with Tim-3-PD-1-CD8⁺ lymphocytes, have greater expression of activation markers CD69 and HLA-DR and greater secretion of Th2 cytokines (in particular, IL-4 and IL-10) [140]. In the case of spontaneous abortions, both the amount of Tim⁺PD-1⁺CD8⁺ T lymphocytes in the decidua, and the production of anti-inflammatory cytokines are reduced. At the same time, increased production of proinflammatory cytokines IFN γ and TNF α is observed [149]. The mouse model shows that the blockade of Tim-3 and PD-1 leads to a significant decrease in the weight of the foetus and the number of offspring, which indicates the important role of these molecules in providing foetal protection and normal pregnancy [140]. In women with spontaneous abortions, an association of a decreased number of decidual CD8⁺ T lymphocytes with the PD-1⁺CD8⁺ phenotype and a decreased proliferative activity has been observed [140]. PD-1L is expressed on syncytiotrophoblast cells directly in contact with the parent cells [137], which is one of the mechanisms of formation of immunological tolerance for trophoblast cells. Expression of PD-1L with trophoblast is stimulated by EGF and IFN γ [48]. It is likely that increased production of IFN γ trophoblast in early pregnancy [3, 4] and its autocrine effect may be one of the mechanisms of survival of a semi-allogenic foetus as a result of the interaction of PD-1 on T lymphocytes and PD-1L on the trophoblast. From the first to the second trimester, the expression of PD-1L in the placenta is increased, the regulation of expression is probably carried out depending on oxygenation (insufficient oxygenation in the uteroplacental blood flow zone causes a decrease in expression of PD-1L) [49]. Decreased expression of PD-1L in the decidua is associated with habitual miscarriage [77].

Thus, Tim and PD-1 are important in establishing the tolerogenic nature of CD8⁺ T lymphocyte differentiation in pregnancy.

Factors secreted by the placenta and decidua, significantly affect the formation of immunological tolerance in pregnancy, in particular, affect the apoptosis of the mother's cells. It was noted that the level of apoptosis of CD3⁺ T lymphocytes in peripheral blood is higher in pregnancy than in non-pregnant women [25]. At the same time, the level of apoptosis of CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes at the onset of pregnancy is lower than in non-pregnant women, and the maximum level of apoptosis of this subpopulation of T lymphocytes is observed in the first trimester of pregnancy [25], which can be aimed at ensuring foetal survival in early pregnancy and elimination of alloreactive cells. The decidua produces significant amounts of glycodelins A (GdA), which inhibits the cytotoxic activity of activated CD8⁺ T lymphocytes and their proliferation [123] using CD7 as a receptor [125]. GdA suppresses the synthesis of IL-2R, which interferes with the action of IL-2 on T lymphocytes and the formation of functionally mature cytotoxic cells [122]. The placenta secretes the preimplantation factor (PIF), which binds to the proteins of the CD8⁺ T lymphocytes cytoskeleton and suppresses the immune response of the mother [12]. Interaction with soluble HLA-C, whose concentration in the peripheral blood rises in pregnancy, causes apoptosis of CD8⁺ T lymphocytes by enhancing its production of FasL [19, 104].

CD8⁺ T lymphocytes active against paternal antigens, including anti-minor histocompatibility antigens (mHag-peptides derived from polymorphic proteins, recognized as heterogenous) have been described in the literature, but they do not exert any influence on the outcome of pregnancy [131]. This may be due to the formation of subpopulations of regulatory CD4 and CD8 lymphocytes, levelling their influence [131].

In pregnancy, virus-specific CD8⁺ T lymphocytes accumulate in the decidua [134]. But since decidual CD8⁺ T lymphocytes acquire more regulatory properties than cytotoxic ones, while retaining the ability to recognize the antigen present in the HLA locus molecule, including the viral antigen – there is no complete elimination of the infected cells [21, 134]. Most likely, the activity of CD8⁺ T lymphocytes can be aimed at resisting a viral infection in the context of maintaining pregnancy.

Thus, decidual CD8⁺ T lymphocytes differ in phenotype, secretory and cytolytic activity from CD8⁺ T lymphocytes of peripheral blood, which is aimed at supporting the invasion of trophoblast in the early stages of development of pregnancy, as well as the

formation of immunological tolerance for the half-allogenic foetus. The disturbance of the homeostasis of decidual CD8⁺ T lymphocytes has serious consequences that affect the outcome of pregnancy. The mechanisms of maintaining the balance of the functioning of CD8⁺ T lymphocytes within the framework of maintaining the physiological course of pregnancy and at the same time effective protection against infectious agents remain insufficiently studied. The diverse interaction of CD8⁺ T lymphocytes with microenvironment cells in the utero-placental blood flow zone has a significant effect on the nature of the functional activity of all interacting cell types.

Intercellular interactions of CD8⁺ T lymphocytes

In pregnancy, trophoblast cells play a central role in the development of immunological tolerance. In the regulation of the cytotoxicity of immune system cells from the trophoblast side, the expression of the locus molecules of the main histocompatibility complex HLA-G and HLA-C is important. Receptors for the molecules of the HLA-G locus on CD8⁺ T lymphocytes are the molecules CD8, LILRB1 and CD160 [72]. HLA-G locus molecules are expressed on the trophoblast in combination with endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1), which generates peptides capable of forming a stable complex with HLA-G [106]. This contributes to the successful invasion of the trophoblast. Expression of this complex on trophoblast cells is enhanced by exposure to LIF and VEGF [106]. The extravillous cytotrophoblast produces both a membrane and a soluble form of HLA-G [59, 67]. The soluble form is found not only in the amniotic fluid, but also in the mother's bloodstream [13, 45, 120]. It was shown that the soluble form of the HLA-G locus molecule promotes immunological tolerance, causing apoptosis of CD8⁺ T lymphocytes [73], including through interaction with the CD8 molecule [72]. HLA-G locus molecules can also inhibit the proliferation of CD4⁺ lymphocytes, thereby reducing the risk of developing a mixed lymphocyte response from both the mother and the foetus. The low level of production of HLA-G by the trophoblast is associated with complications, including the development of preeclampsia [45, 85]. At the same time, some of the latest studies have revealed an increased level of HLA-G mRNA in the decidua in preeclampsia [103].

Prostaglandin E2 (PGE2), indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) and TGF- β also participate in the suppression of proliferation of CD8⁺ lymphocytes [80].

According to the latest data described in the literature, several stages can be distinguished in the interaction of trophoblast and CD8⁺ T lymphocytes. First, direct recognition of HLA-C by the T cell receptor of CD8⁺ T lymphocytes. Further, a peptide

(viral or allogenic) is presented in the MHC I complex, activation of CD8 lymphocytes. The mouse model shows that the presentation of foetal antigens occurs exclusively in an indirect way, due to maternal APC, and antigen presentation occurs only in the late stages of pregnancy, which is associated with the late onset of the expression of MHC I molecules on foetal cells [18, 21, 36]. At the same time, it has been repeatedly shown that macrophages and DC of the placenta and decidua are of a tolerogenic nature [26, 38, 79, 116, 118, 139, 144]. The literature also describes the presentation of minor and major histocompatibility antigens in the maternal APC after the capture of trophoblast debris by CD4⁺ T lymphocytes, which in turn secrete cytokines that affect the differentiation of CD8⁺ T lymphocytes.

Antigen-presenting cells and trophoblast produce significant amounts of IL-27 [20, 43, 107]. In naïve CD8⁺ T cells (CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺), IL-27 enhances the expression of the T-bet transcription factor, which indicates the polarization of CD8⁺ T lymphocytes in the Tc1 direction, stimulates proliferation, IFN γ secretion, granzyme B and cytotoxicity of these cells [117]. However, the mechanisms of influence of IL-27 on the development of pregnancy remain unclear. The IL-27 receptor is expressed on CD8⁺ T lymphocytes to a greater extent than on CD4⁺ lymphocytes, mainly on CD8⁺CD45RO⁺ lymphocytes (i.e., memory cells) [117]. Intracellular expression of the IL-27 receptor (TCCR/gp130) is characteristic of naïve cells, with activation the surface expression of the receptor is enhanced [117]. The mouse model shows that the production of IL-27 by the decidua is enhanced before implantation [86]. In women with habitual miscarriages, much lower expression of IL-27 in the decidua is observed compared to women with spontaneous abortion and the physiological course of pregnancy [141].

The extravillous cytotrophoblast expresses the B7H2 molecule (ICOS ligand). The specific interaction of ICOS/B7H2 contributes to the secretion of T cells by cytokines IFN γ , IL-10 and IL-2 [91]. According to other data, foetal formation causes strong proliferation of CD8⁺ T lymphocytes in the uterine lymph nodes during pregnancy, but they are simultaneously susceptible to clonal deletion [36]. The remaining activated CD8⁺ T lymphocytes are characterized by reduced secretion of IFN γ , IL-2 and IL-4 and inability to cytolytic activity [36]. Previously, it was also noted that IL-4, secreted by Th2, leads to a decrease in the production of IFN γ , TNF α and IL-10 by Tc1 cells [110].

It has been established that trophoblast stimulates the formation of a subpopulation of CD8⁺

T regulatory cells [77, 119]. Since activation of CD8⁺ T lymphocytes involves CD4⁺ T lymphocytes, they will have a significant effect on the functioning of cytotoxic T lymphocytes. CD4⁺ Treg cells by secretion of IL-10 contribute to the formation of CD8⁺ cell memory in viral infection [71]. CD4⁺ Treg lymphocytes suppress CD8⁺ T cell response: CD4⁺ Treg cause apoptosis of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes and reduce their expression of granzymes A and B [44]. CD4⁺ Th1 lymphocytes are involved in the induction and maintenance of viability of CD8⁺ lymphocytes (Tc1), both effector and memory cells, through IL-2 secretion, activation of DC by CD40/CD40L interactions, and also using pMHC I [51]. CD8⁺ Treg stimulate the differentiation of CD4⁺ Treg [75]. Subpopulations of CD8 Tc1 and Tc2 lymphocytes differently influence the differentiation of CD4⁺ T lymphocytes: in the presence of Tc1, Th1-lymphocytes predominate, and in the presence of Tc2, Th2-lymphocytes predominate [138]. It has been shown that CD8⁺ T lymphocytes stimulate the expansion of cells of a specific subset of CD4⁺ Treg expressing the TCR Vβ5 chain whose proliferation regulation mechanism differs significantly from other Tregs and does not depend on IL-2 [58]. The enhancement of the surface expression of TNFα, observed with the activation of CD8⁺ lymphocytes, promotes the expansion of Vβ5⁺ Treg lymphocytes [58]. Simultaneously, the expression of TNFR2 on Vβ5⁺ Treg plays a leading role in inducing the proliferation of these cells [58]. The action of Treg is aimed at limiting the cytotoxic activity of CD8⁺ T lymphocytes, therefore the revealed regulation mechanism is a system of mutual influence of T cell subpopulations during the antiviral response. The results were obtained on a mouse model, but there is reason to assume that such a mechanism exists in humans [58].

The secretory products of decidual CD8⁺ lymphocytes of the first trimester of pregnancy stimulate trophoblast invasion [114], which can be mediated by the action of IFNγ. Secreted by CD8⁺ lymphocytes, IL-8 can play an important role in vascular remodelling in the first trimester of pregnancy by stimulating MMP production. Thus, CD8⁺ lymphocytes contribute to the formation of the placenta in the early stages of pregnancy.

The trophoblast cells (including due to the production of the locus molecules HLA-C and HLA-G), T helper lymphocytes, APC of the placenta and decidua, have a significant effect on the formation of the subpopulation composition of CD8⁺ T lymphocytes of the decidua. In turn, decidual CD8⁺ T lymphocytes affect trophoblast cells and CD4⁺ T lymphocytes; however, the molecular mechanisms of these cell-cell interactions have not been sufficiently studied.

Conclusion

The population of CD8⁺ T lymphocytes is a collection of cells quite diverse in phenotype and function. Great importance is attributed to subpopulations of memory CD8⁺ T lymphocytes and CD8⁺ Treg, identified relatively recently. Differentiation of CD8⁺ T lymphocytes depends on the cytokine environment and antigen presentation involving surface molecules. Not only differentiation is possible in the primary lymphoid organs, but also in the secondary ones; however, the molecular mechanisms for the regulation of differentiation of CD8⁺ T lymphocytes have not been adequately studied. Migration of CD8⁺ T lymphocytes to the decidua is caused both by changes in expression of surface molecules of CD8⁺ T lymphocytes under the action of soluble products in the utero-placental contact zone, and by changes in the production of soluble and surface molecules by cells of the decidua. Molecular mechanisms of specific migration of CD8⁺ T lymphocytes in pregnancy are poorly understood. An important role of the concentration of CD8⁺ T lymphocytes in the endometrium and decidua during the whole pregnancy is distinguished. Violation of the quantitative content or functional activity of CD8⁺ T lymphocytes in the decidua can lead to serious complications of pregnancy. CD8⁺ T lymphocytes in the utero-placental contact zone interact with a wide range of cells. Their functioning in these tissues is aimed at stimulating the invasion of trophoblast and the formation of immunological tolerance, accompanied by a decrease in its own cytotoxic activity and an increase in regulatory function. However, the molecular mechanisms of intercellular interactions are subject to further detailed study.

Список литературы / References

1. Aandahl E.M., Torgersen K.M., Tasken K. CD8⁺ regulatory T cells – a distinct T-cell lineage or a transient T-cell phenotype? *Hum. Immunol.*, 2008, Vol. 69, no. 11, pp. 696-699.
2. Aboagye-Mathiesen G., Toth F.D., Petersen P.M., Gildberg A., Nørskov-Lauritsen N., Zachar V., Ebbesen P. Differential interferon production in human first and third trimester trophoblast cultures stimulated with viruses. *Placenta*, 1993, Vol. 14, no. 2, pp. 225-234.
3. Aboagye-Mathiesen G., Toth F.D., Zdravkovic M., Ebbesen P. Production of interferons in human placental trophoblast subpopulations and their possible roles in pregnancy. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1994, Vol. 1, no. 6, pp. 650-659.

4. Akoglu B., Lafferton B., Kalb S., Yosuf S.E., Herrmann E., Zeuzem S., Gossmann J., Kachel H.G., Scheuermann E.H., Faust D. Rejection quantity in kidney transplant recipients is associated with increasing intracellular interleukin-2 in CD8⁺ T-cells. *Transpl. Immunol.*, 2014, Vol. 31, no. 1, pp. 17-21.
5. Arck P.C. Stress and pregnancy loss: role of immune mediators, hormones and neurotransmitters. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2001, Vol. 46, no. 2, pp. 117-123.
6. Arruvito L., Payaslian F., Baz P., Podhorzer A., Billordo A., Pandolfi J., Semeniuk G., Arribalzaga E., Fainboim L. Identification and clinical relevance of naturally occurring human CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 9, pp. 4469-4476.
7. Bachmann M.F., Wolint P., Walton S., Schwarz K., Oxenius A. Differential role of IL-2R signaling for CD8⁺ T cell responses in acute and chronic viral infections. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, no. 6, pp. 1502-1512.
8. Badovinac V.P., Porter B.B., Harty J.T. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat. Immunol.*, 2002, Vol. 3, no. 7, pp. 619-626.
9. Bao Y.S., Wang M., Zhang P., Zhou Z., Zhai W.J., Wang H., Jiang E.L., Huang Y., Feng S.Z., Han M.Z. Regulation of immunological balance between TH1/TH2 and Tc1/Tc2 lymphocytes by prostaglandin E2. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2010, Vol. 18, no. 2, pp. 431-435.
10. Barinov A., Galgano A., Krenn G., Tanchot C., Vasseur F., Rocha B. CD4/CD8/Dendritic cell complexes in the spleen: CD8⁺ T cells can directly bind CD4⁺ T cells and modulate their response. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 7, e0180644. doi: 10.1371/journal.pone.0180644.
11. Barnea E.R., Hayrabyan S., Todorova K., Almogi-Hazan O., Or R., Guingab J., McElhinney J., Fernandez N., Barder T. PreImplantation factor (PIF⁺) regulates systemic immunity and targets protective regulatory and cytoskeleton proteins. *Immunobiology*, 2016, Vol. 221, no. 7, pp. 778-793.
12. Beneventi F., Locatelli E., de Amici M., Martinetti M., Spinillo A. Soluble HLA-G concentrations in obese women during pregnancy and in cord blood. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 119, pp. 31-37.
13. Blechschmidt K., Mylonas I., Mayr D., Schiessl B., Schulze S., Becker K.F., Jeschke U. Expression of E-cadherin and its repressor snail in placental tissue of normal, preeclamptic and HELLP pregnancies. *Virchows Arch.*, 2007, Vol. 450, no. 2, pp. 195-202.
14. Capece T., Kim M. The role of lymphatic niches in T cell differentiation. *Mol. Cells*, 2016, Vol. 39, no. 7, pp. 515-523.
15. Carvalheiro H., Duarte C., Silva-Cardoso S., da Silva J.A., Souto-Carneiro M.M. CD8⁺ T cell profiles in patients with rheumatoid arthritis and their relationship to disease activity. *Arthritis Rheumatol.*, 2015, Vol. 67, no. 2, pp. 363-371.
16. Chandran P.A., Keller A., Weinmann L., Seida A.A., Braun M., Andreev K., Fischer B., Horn E., Schwinn S., Junker M., Houben R., Dombrowski Y., Dietl J., Finotto S., Wolfl M., Meister G., Wischhusen J. The TGF-beta-inducible miR-23a cluster attenuates IFN-gamma levels and antigen-specific cytotoxicity in human CD8(+) T cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2014, Vol. 96, no. 4, pp. 633-645.
17. Clark D.A., Chaouat G., Wong K., Gorczynski R.M., Kinsky R. Tolerance mechanisms in pregnancy: a reappraisal of the role of class I paternal MHC antigens. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 2, pp. 93-103.
18. Contini P., Ghio M., Merlo A., Poggi A., Indiveri F., Puppo F. Apoptosis of antigen-specific T lymphocytes upon the engagement of CD8 by soluble HLA class I molecules is Fas ligand/Fas mediated: evidence for the involvement of p56lck, calcium calmodulin kinase II, and Calcium-independent protein kinase C signaling pathways and for NF-kappaB and NF-AT nuclear translocation. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 11, pp. 7244-7254.
19. Coulomb-L'Hermine A., Larousserie F., Pflanz S., Bardel E., Kastelein R.A., Devergne O. Expression of interleukin-27 by human trophoblast T cells. *Placenta*, 2007, Vol. 28, no. 11-12, pp. 1133-1140.
20. Crespo A.C., van der Zwan A., Ramalho-Santos J., Strominger J.L., Tilburgs T. Cytotoxic potential of decidual NK cells and CD8⁺ T cells awakened by infections. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 119, pp. 85-90.
21. Curtsinger J.M., Agarwal P., Lins D.C., Mescher M.F. Autocrine IFN-gamma promotes naïve CD8 T cell differentiation and synergizes with IFN-alpha to stimulate strong function. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 2, pp. 659-668.
22. Curtsinger J.M., Gerner M.Y., Lins D.C., Mescher M.F. Signal 3 availability limits the CD8 T cell response to a solid tumor. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 11, pp. 6752-6760.
23. Curtsinger J.M., Mescher M.F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.*, 2010, Vol. 22, no. 3, pp. 333-340.
24. Darmochwal-Kolarz D., Sobczak E., Pozarowski P., Kolarz B., Rolinski J., Oleszczuk J. T CD3⁺CD8⁺ lymphocytes are more susceptible for apoptosis in the first trimester of normal human pregnancy. *J. Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2014, 6705246 9 p. doi: 10.1155/2014/670524.
25. Dauven D., Ehrentauf S., Langwisch S., Zencussen A.C., Schumacher A. Immune modulatory effects of human chorionic gonadotropin on dendritic cells supporting fetal survival in murine pregnancy. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2016, Vol. 7, p. 146.
26. Deets K.A., Berkley A.M., Bergsbaken T., Fink P.J. Cutting edge: Enhanced clonal burst size corrects an otherwise defective memory response by CD8⁺ recent thymic emigrants. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 6, pp. 2450-2455.
27. Denison F.C., Kelly R.W., Calder A.A., Riley S.C. Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. *Hum. Reprod.*, 1998, Vol. 13, no. 12, pp. 3560-3565.

28. Dong S., Kurtis J.D., Pond-Tor S., Kabyemela E., Duffy P.E., Fried M. CXCL9 response to malaria during pregnancy is associated with low-birth-weight deliveries. *Infect. Immun.*, 2012, Vol. 80, no. 9, pp. 3034-3038.
29. Du M.R., Wang S.C., Li D.J. The integrative roles of chemokines at the maternal-fetal interface in early pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.*, 2014, Vol. 11, no. 5, pp. 438-448.
30. Ebina Y., Shimada S., Deguchi M., Maesawa Y., Iijima N., Yamada H. Divergence of helper, cytotoxic, and regulatory T cells in the decidua from miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 76, no. 3, pp. 199-204.
31. Ellis S.D., McGovern J.L., van Maurik A., Howe D., Ehrenstein M.R., Notley C.A. Induced CD8⁺FoxP3⁺ Treg cells in rheumatoid arthritis are modulated by p38 phosphorylation and monocytes expressing membrane tumor necrosis factor alpha and CD86. *Arthritis Rheumatol.*, 2014, Vol. 66, no. 10, pp. 2694-2705.
32. Erden O., Imir A., Guvenal T., Muslehiddinoglu A., Arici S., Cetin M., Cetin A. Investigation of the effects of heparin and low molecular weight heparin on E-cadherin and laminin expression in rat pregnancy by immunohistochemistry. *Hum. Reprod.*, 2006, Vol. 21, no. 11, pp. 3014-3018.
33. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 387-411.
34. Erlebacher A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 1, pp. 23-33.
35. Erlebacher A., Vencato D., Price K.A., Zhang D., Glimcher L.H. Constraints in antigen presentation severely restrict T cell recognition of the allogeneic fetus. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, no. 5, pp. 1399-1411.
36. Eusebio M., Kuna P., Kraszula L., Kupczyk M., Pietruczuk M. Allergy-related changes in levels of CD8⁺CD25⁺FoxP3(bright) Treg cells and FoxP3 mRNA expression in peripheral blood: the role of IL-10 or TGF-beta. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 2014, Vol. 28, no. 3, pp. 461-470.
37. Fang W.N., Shi M., Meng C.Y., Li D.D., Peng J.P. The Balance between conventional DCs and plasmacytoid DCs is pivotal for immunological tolerance during pregnancy in the mouse. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 26984. doi: 10.1038/srep26984.
38. Gavin M.A., Torgerson T.R., Houston E., DeRoos P., Ho W.Y., Stray-Pedersen A., Ocheltree E.L., Greenberg P.D., Ochs H.D., Rudensky A.Y. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 17, pp. 6659-6664.
39. Goldberg M.V., Maris C.H., Hipkiss E.L., Flies A.S., Zhen L., Tudor R.M., Grosso J.F., Harris T.J., Getnet D., Whartenby K.A., Brockstedt D.G., Dubensky T.W., Jr., Chen L., Pardoll D.M., Drake C.G. Role of PD-1 and its ligand, B7-H1, in early fate decisions of CD8 T cells. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 1, pp. 186-192.
40. Golubovskaya V., Wu L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 2016, Vol. 8, no. 3.
41. Gomez-Lopez N., Olson D.M., Robertson S.A. Interleukin-6 controls uterine Th9 cells and CD8(+) T regulatory cells to accelerate parturition in mice. *Immunol. Cell Biol.*, 2016, Vol. 94, no. 1, pp. 79-89.
42. Gringhuis S.I., Kaptein T.M., Wevers B.A., van der Vlist M., Klaver E.J., van Die I., Vriend L.E., de Jong M.A., Geijtenbeek T.B. Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production. *Nat. Commun.*, 2014, Vol. 5, p. 5074.
43. Gu J., Lu L., Chen M., Xu L., Lan Q., Li Q., Liu Z., Chen G., Wang P., Wang X., Brand D., Olsen N., Zheng S.G. TGF-beta-induced CD4⁺Foxp3⁺ T cells attenuate acute graft-versus-host disease by suppressing expansion and killing of effector CD8⁺ cells. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 7, pp. 3388-3397.
44. He Y., Chen S., Huang H., Chen Q. Association between decreased plasma levels of soluble human leukocyte antigen-G and severe pre-eclampsia. *J. Perinat. Med.*, 2016, Vol. 44, no. 3, pp. 283-290.
45. Henson S.M., Lanna A., Riddell N.E., Franzese O., Macaulay R., Griffiths S.J., Puleston D.J., Watson A.S., Simon A.K., Tooze S.A., Akbar A.N. p38 signaling inhibits mTORC1-independent autophagy in senescent human CD8(+) T cells. *J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 124, no. 9, pp. 4004-4016.
46. Hentschke M.R., Krauspenhar B., Guwzinski A., Caruso F.B., Silveira I.D., Antonello I.C., Gadonski G., Poli-de-Figueiredo C.E., da Costa B.E. PP040. Expression of RANTES (CCL5) in maternal plasma, fetal plasma and placenta in pre-eclampsia and normotensive controls. *Pregnancy Hypertens*, 2012, Vol. 2, no. 3, p. 263.
47. Holets L.M., Carletti M.Z., Kshirsagar S.K., Christenson L.K., Petroff M.G. Differentiation-induced post-transcriptional control of B7-H1 in human trophoblast T cells. *Placenta*, 2009, Vol. 30, no. 1, pp. 48-55.
48. Holets L.M., Hunt J.S., Petroff M.G. Trophoblast CD274 (B7-H1) is differentially expressed across gestation: influence of oxygen concentration. *Biol. Reprod.*, 2006, Vol. 74, no. 2, pp. 352-358.
49. Hoyer S., Prommersberger S., Pfeiffer I.A., Schuler-Thurner B., Schuler G., Dorrie J., Schaft N. Concurrent interaction of DCs with CD4(+) and CD8(+) T cells improves secondary CTL expansion: It takes three to tango. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 12, pp. 3543-3559.
50. Huang H., Hao S., Li F., Ye Z., Yang J., Xiang J. CD4⁺ Th1 cells promote CD8⁺ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes. *Immunology*, 2007, Vol. 120, no. 2, pp. 148-159.
51. Huang Y., Zhu X.Y., Du M.R., Li D.J. Human trophoblasts recruited T lymphocytes and monocytes into decidua by secretion of chemokine CXCL16 and interaction with CXCR6 in the first-trimester pregnancy. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 4, pp. 2367-2375.

52. Irtegun S., Tekin M.A., Alpayci R. Increased expression of E-cadherin, endothelin-1, and CD68 in preeclamptic placentas. *Erciyes Medical Journal*, 2016, Vol. 38, no. 4, pp. 149-152.
53. Ishii M., Hayakawa S., Suzuki M.K., Yoshino N., Honda M., Nishinarita S., Chishima F., Nagaishi M., Satoh K. Expression of functional chemokine receptors of human placental cells. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2000, Vol. 44, no. 6, pp. 365-373.
54. Jebbawi F., Fayyad-Kazan H., Merimi M., Lewalle P., Verougstraete J.C., Leo O., Romero P., Burny A., Badran B., Martiat P., Rouas R. A microRNA profile of human CD8(+) regulatory T cells and characterization of the effects of microRNAs on Treg cell-associated genes. *J. Transl. Med.*, 2014, Vol. 12, p. 218.
55. Jenkinson S.E., Whawell S.A., Swales B.M., Corps E.M., Kilshaw P.J., Farthing P.M. The alphaE(CD103)beta7 integrin interacts with oral and skin keratinocytes in an E-cadherin-independent manner*. *Immunology*, 2011, Vol. 132, no. 2, pp. 188-196.
56. Jin H.T., Anderson A.C., Tan W.G., West E.E., Ha S.J., Araki K., Freeman G.J., Kuchroo V.K., Ahmed R. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 33, pp. 14733-14738.
57. Joedicke J.J., Myers L., Carmody A.B., Messer R.J., Wajant H., Lang K.S., Lang P.A., Mak T.W., Hasenkrug K.J., Dittmer U. Activated CD8⁺ T cells induce expansion of Vbeta5⁺ regulatory T cells via TNFR2 signaling. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 6, pp. 2952-2960.
58. Juch H., Blaschitz A., Dohr G., Hutter H. HLA class I expression in the human placenta. *Wien. Med. Wochenschr.*, 2012, Vol. 162, no. 9-10, pp. 196-200.
59. Kaech S.M., Tan J.T., Wherry E.J., Konieczny B.T., Surh C.D., Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.*, 2003, Vol. 4, no. 12, pp. 1191-1198.
60. Kalble F., Mai C., Wagner M., Schober L., Schaier M., Zeier M., Spratte J., Fluhr H., Steinborn A. Aberrant ICOS⁺ T cell differentiation in women with spontaneous preterm labor. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 76, no. 5, pp. 415-425.
61. Karjalainen M.K., Ojaniemi M., Haapalainen A.M., Mahlman M., Salminen A., Huusko J.M., Maatta T.A., Kaukola T., Anttonen J., Ulvila J., Haataja R., Teramo K., Kingsmore S.F., Palotie A., Muglia L.J., Ramet M., Hallman M. CXCR3 polymorphism and expression associate with spontaneous preterm birth. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 5, pp. 2187-2198.
62. Kastenmuller W., Brandes M., Wang Z., Herz J., Egen J.G., Germain R.N. Peripheral prepositioning and local CXCL9 chemokine-mediated guidance orchestrate rapid memory CD8⁺ T cell responses in the lymph node. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 3, pp. 502-513.
63. Kim C.J., Romero R., Chaemsathong P., Kim J.S. Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2015, Vol. 213, no. 4, pp. S53-69.
64. Kim C.J., Romero R., Kusanovic J.P., Yoo W., Dong Z., Topping V., Gotsch F., Yoon B.H., Chi J.G., Kim J.S. The frequency, clinical significance, and pathological features of chronic chorioamnionitis: a lesion associated with spontaneous preterm birth. *Mod. Pathol.*, 2010, Vol. 23, no. 7, pp. 1000-1011.
65. Kim M.T., Harty J.T. Impact of inflammatory cytokines on effector and memory CD8⁺ T cells. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 295.
66. Klitkou L., Dahl M., Hviid T.V., Djurisic S., Piosik Z.M., Skovbo P., Moller A.M., Steffensen R., Christiansen O.B. Human leukocyte antigen (HLA)-G during pregnancy part I: correlations between maternal soluble HLA-G at midterm, at term, and umbilical cord blood soluble HLA-G at term. *Hum. Immunol.*, 2015, Vol. 76, no. 4, pp. 254-259.
67. Kondo T., Takata H., Matsuki F., Takiguchi M. Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8⁺ T cells producing IL-17. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 4, pp. 1794-1798.
68. Kuttruff S., Koch S., Kelp A., Pawelec G., Rammensee H.G., Steinle A. Nkp80 defines and stimulates a reactive subset of CD8 T cells. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 2, pp. 358-369.
69. Laidlaw B.J., Craft J.E., Kaech S.M. The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 2, pp. 102-111.
70. Laidlaw B.J., Cui W., Amezcua R.A., Gray S.M., Guan T., Lu Y., Kobayashi Y., Flavell R.A., Kleinstein S.H., Craft J., Kaech S.M. Production of IL-10 by CD4(+) regulatory T cells during the resolution of infection promotes the maturation of memory CD8(+) T cells. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 8, pp. 871-879.
71. le Bouteiller P. HLAG in human early pregnancy: Control of uterine immune cell activation and likely vascular remodeling. *Biomed. J.*, 2015, no. 38, p. 3238.
72. le Bouteiller P., Pizzato N., Barakonyi A., Solier C. HLA-G, pre-eclampsia, immunity and vascular events. *J. Reprod. Immunol.*, 2003, Vol. 59, no. 2, pp. 219-234.
73. Lee N., You S., Shin M.S., Lee W.W., Kang K.S., Kim S.H., Kim W.U., Homer R.J., Kang M.J., Montgomery R.R., Dela Cruz C.S., Shaw A.C., Lee P.J., Chupp G.L., Hwang D., Kang I. IL-6 receptor alpha defines effector memory CD8⁺ T cells producing Th2 cytokines and expanding in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2014, Vol. 190, no. 12, pp. 1383-1394.

74. Lerret N.M., Houlihan J.L., Kheradmand T., Pothoven K.L., Zhang Z.J., Luo X. Donor-specific CD8⁺ Foxp3⁺ T cells protect skin allografts and facilitate induction of conventional CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Am. J. Transplant.*, 2012, Vol. 12, no. 9, pp. 2335-2347.
75. Li C., Lin Y., Gao C., Qi Z. Function of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell mediated rejection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2014, Vol. 94, no. 34, pp. 2690-2694.
76. Li H., Wang W., Wang G., Hou Y., Xu F., Liu R., Wang F., Xue J., Hu T., Luan X. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha promote the ability of human placenta-derived mesenchymal stromal cells to express programmed death ligand-2 and induce the differentiation of CD4(+)interleukin-10(+) and CD8(+) interleukin-10(+)Treg subsets. *Cytotherapy*, 2015, Vol. 17, no. 11, pp. 1560-1571.
77. Li H.W., Cheung A.N., Tsao S.W., Cheung A.L., O W.S. Expression of e-cadherin and beta-catenin in trophoblastic tissue in normal and pathological pregnancies. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 2003, Vol. 22, no. 1, pp. 63-70.
78. Li M., Piao L., Chen C.P., Wu X., Yeh C.C., Masch R., Chang C.C., Huang S.J. Modulation of decidual macrophage polarization by macrophage colony-stimulating factor derived from first-trimester decidual cells: implication in preeclampsia. *Am. J. Pathol.*, 2016, Vol. 186, no. 5, pp. 1258-1266.
79. Li M., Sun X., Kuang X., Liao Y., Li H., Luo D. Mesenchymal stem cells suppress CD8⁺ T cell-mediated activation by suppressing natural killer group 2, member D protein receptor expression and secretion of prostaglandin E2, indoleamine 2,3-dioxygenase and transforming growth factor-beta. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, Vol. 178, no. 3, pp. 516-524.
80. Li X.L., Dong X., Xue Y., Li C.F., Gou W.L., Chen Q. Increased expression levels of E-cadherin, cytokeratin 18 and 19 observed in preeclampsia were not correlated with disease severity. *Placenta*, 2014, Vol. 35, no. 8, pp. 625-631.
81. Liu D., Burd E.M., Coopersmith C.M., Ford M.L. Retrogenic ICOS expression increases differentiation of KLRG-1hiCD127loCD8⁺ T cells during listeria infection and diminishes recall responses. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 3, pp. 1000-1012.
82. Liu S.J., Tsai J.P., Shen C.R., Sher Y.P., Hsieh C.L., Yeh Y.C., Chou A.H., Chang S.R., Hsiao K.N., Yu F.W., Chen H.W. Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 82, no. 2, pp. 354-360.
83. Liu Y., Lan Q., Lu L., Chen M., Xia Z., Ma J., Wang J., Fan H., Shen Y., Ryffel B., Brand D., Quismorio F., Liu Z., Horwitz D.A., Xu A., Zheng S.G. Phenotypic and functional characteristic of a newly identified CD8⁺ Foxp3⁺ CD103⁺ regulatory T cells. *J. Mol. Cell. Biol.*, 2014, Vol. 6, no. 1, pp. 81-92.
84. Marozio L., Garofalo A., Berchialla P., Tavella A.M., Salton L., Cavallo F., Benedetto C. Low expression of soluble human leukocyte antigen G in early gestation and subsequent placenta-mediated complications of pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2017, Vol. 43, no. 9, pp. 1391-1396.
85. Mas A.E., Petitbarat M., Dubanchet S., Fay S., Ledee N., Chaouat G. Immune regulation at the interface during early steps of murine implantation: involvement of two new cytokines of the IL-12 family (IL-23 and IL-27) and of TWEAK. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2008, Vol. 59, no. 4, pp. 323-338.
86. McLane L.M., Banerjee P.P., Cosma G.L., Makedonas G., Wherry E.J., Orange J.S., Betts M.R. Differential localization of T-bet and Eomes in CD8 T cell memory populations. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 7, pp. 3207-3215.
87. Mescher M.F., Curtsinger J.M., Agarwal P., Casey K.A., Gerner M., Hammerbeck C.D., Popescu F., Xiao Z. Signals required for programming effector and memory development by CD8⁺ T cells. *Immunol. Rev.*, 2006, Vol. 211, pp. 81-92.
88. Michimata T., Tsuda H., Sakai M., Fujimura M., Nagata K., Nakamura M., Saito S. Accumulation of CCR2-positive T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites of human decidua in a prostaglandin D(2)-mediated manner. *Mol. Hum. Reprod.*, 2002, Vol. 8, no. 2, pp. 181-187.
89. Mosmann T.R., Li L., Sad S. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin. Immunol.*, 1997, Vol. 9, no. 2, pp. 87-92.
90. Nagamatsu T., Barrier B.F., Schust D.J. The regulation of T-cell cytokine production by ICOS-B7H2 interactions at the human fetomaternal interface. *Immunol. Cell Biol.*, 2011, Vol. 89, no. 3, pp. 417-425.
91. Nakagawa T., Tsuruoka M., Ogura H., Okuyama Y., Arima Y., Hirano T., Murakami M. IL-6 positively regulates Foxp3⁺CD8⁺ T cells *in vivo*. *Int. Immunol.*, 2010, Vol. 22, no. 2, pp. 129-139.
92. Nancy P., Erlebacher A. T cell behavior at the maternal-fetal interface. *Int. J. Dev. Biol.*, 2014, Vol. 58, no. 2-4, pp. 189-198.
93. Novais F.O., Carvalho A.M., Clark M.L., Carvalho L.P., Beiting D.P., Brodsky I.E., Carvalho E.M., Scott P. CD8⁺ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1beta production. *PLoS Pathog.*, 2017, Vol. 13, no. 2, e1006196. doi: 10.1371/journal.ppat.1006196.
94. O'Sullivan S., Cormican L., Faul J.L., Ichinohe S., Johnston S.L., Burke C.M., Poulter L.W. Activated, cytotoxic CD8(+) T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, Vol. 164, no. 4, pp. 560-564.
95. Okada S., Okada H., Sanezumi M., Nakajima T., Yasuda K., Kanzaki H. Expression of interleukin-15 in human endometrium and decidua. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000, Vol. 6, no. 1, pp. 75-80.

96. Osman I., Young A., Ledingham M.A., Thomson A.J., Jordan F., Greer I.A., Norman J.E. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol. Hum. Reprod.*, 2003, Vol. 9, no. 1, pp. 41-45.
97. Ouellette M.J., St-Jacques S., Lambert R.D. CD8 membrane expression is down-regulated by transforming growth factor (TGF)-beta 1, TGF-beta 2, and prostaglandin E2. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1999, Vol. 41, no. 3, pp. 183-191.
98. Paparini D., Gori S., Grasso E., Scordo W., Calo G., Perez Leiros C., Ramhorst R., Salamone G. Acetylcholine contributes to control the physiological inflammatory response during the peri-implantation period. *Acta Physiol. (Oxf.)*, 2015, Vol. 214, no. 2, pp. 237-247.
99. Penalzoza-MacMaster P. CD8 T-cell regulation by T regulatory cells and the programmed cell death protein 1 pathway. *Immunology*, 2017, Vol. 151, no. 2, pp. 146-153.
100. Peterson S.E., Nelson J.L., Gadi V.K., Gammill H.S. Fetal cellular microchimerism in miscarriage and pregnancy termination. *Chimerism*, 2013, Vol. 4, no. 4, pp. 136-138.
101. Pitman H., Innes B.A., Robson S.C., Bulmer J.N., Lash G.E. Altered expression of interleukin-6, interleukin-8 and their receptors in decidua of women with sporadic miscarriage. *Hum. Reprod.*, 2013, Vol. 28, no. 8, pp. 2075-2086.
102. Prins J.R., van der Hoorn M.L., Keijser R., Ris-Stalpers C., van Beelen E., Afink G.B., Claas F.H., van der Post J.A., Scherjon S.A. Higher decidual EB13 and HLA-G mRNA expression in preeclampsia: Cause or consequence of preeclampsia. *Hum. Immunol.*, 2016, Vol. 77, no. 1, pp. 68-70.
103. Puppo F., Contini P., Ghio M., Brenzi S., Scudeletti M., Filaci G., Ferrone S., Indiveri F. Soluble human MHC class I molecules induce soluble Fas ligand secretion and trigger apoptosis in activated CD8(+) Fas (CD95)(+) T lymphocytes. *Int. Immunol.*, 2000, Vol. 12, no. 2, pp. 195-203.
104. Raman K., Wang H., Troncone M.J., Khan W.I., Pare G., Terry J. Overlap chronic placental inflammation is associated with a unique gene expression pattern. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 7, e0133738. doi: 10.1371/journal.pone.0133738.
105. Reeves E., James E. Tumour and placenta establishment: The importance of antigen processing and presentation. *Placenta*, 2017, Vol. 56, pp. 34-39.
106. Remoli M.E., Gafa V., Giacomini E., Severa M., Lande R., Coccia E.M. IFN-beta modulates the response to TLR stimulation in human DC: involvement of IFN regulatory factor-1 (IRF-1) in IL-27 gene expression. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, no. 12, pp. 3499-3508.
107. Rijnink E.C., Penning M.E., Wolterbeek R., Wilhelmus S., Zandbergen M., van Duinen S.G., Schutte J., Bruijn J.A., Bajema I.M. Tissue microchimerism is increased during pregnancy: a human autopsy study. *Mol. Hum. Reprod.*, 2015, Vol. 21, no. 11, pp. 857-864.
108. Ryu S.J., Jung K.M., Yoo H.S., Kim T.W., Kim S., Chang J., Choi E.Y. Cognate CD4 help is essential for the reactivation and expansion of CD8 memory T cells directed against the hematopoietic cell-specific dominant minor histocompatibility antigen, H60. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 18, pp. 4273-4280.
109. Sad S., Li L., Mosmann T.R. Cytokine-deficient CD8⁺ Tc1 cells induced by IL-4: retained inflammation and perforin and Fas cytotoxicity but compromised long term killing of tumor cells. *J. Immunol.*, 1997, Vol. 159, no. 2, pp. 606-613.
110. Sad S., Mosmann T.R. Interleukin (IL) 4, in the absence of antigen stimulation, induces an anergy-like state in differentiated CD8⁺ TC1 cells: loss of IL-2 synthesis and autonomous proliferation but retention of cytotoxicity and synthesis of other cytokines. *J. Exp. Med.*, 1995, Vol. 182, no. 5, pp. 1505-1515.
111. San Segundo D., Ballesteros M.A., Naranjo S., Zurbano F., Minambres E., Lopez-Hoyos M. Increased numbers of circulating CD8 effector memory T cells before transplantation enhance the risk of acute rejection in lung transplant recipients. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 11, e80601. doi: 10.1371/journal.pone.0080601.
112. Sandau M.M., Kohlmeier J.E., Woodland D.L., Jameson S.C. IL-15 regulates both quantitative and qualitative features of the memory CD8 T cell pool. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 1, pp. 35-44.
113. Scaife P.J., Bulmer J.N., Robson S.C., Innes B.A., Searle R.F. Effector activity of decidual CD8⁺ T lymphocytes in early human pregnancy. *Biol. Reprod.*, 2006, Vol. 75, no. 4, pp. 562-567.
114. Schettini J.A.C., Gomes T.V., Santos Barreto A.K., da Silva Junior C.D., da Matta M., Coutinho I.C.N., de Oliveira M., Torres L.C. High Levels of CXCL8 and low levels of CXCL9 and CXCL10 in women with maternal RhD alloimmunization. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, p. 700.
115. Schliefssteiner C., Peinhaupt M., Kopp S., Logl J., Lang-Olip I., Hiden U., Heinemann A., Desoye G., Wadsack C. Human placental hofbauer cells maintain an anti-inflammatory M2 phenotype despite the presence of gestational diabetes mellitus. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, p. 888.
116. Schneider R., Yaneva T., Beauseigle D., El-Khoury L., Arbour N. IL-27 increases the proliferation and effector functions of human naïve CD8⁺ T lymphocytes and promotes their development into Tc1 cells. *Eur. J. Immunol.*, 2011, Vol. 41, no. 1, pp. 47-59.
117. Schumacher A., Costa S.D., Zenclussen A.C. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 196.
118. Shao L., Jacobs A.R., Johnson V.V., Mayer L. Activation of CD8⁺ regulatory T cells by human placental trophoblasts. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 12, pp. 7539-7547.

119. Shobeiri S.S., Abediankenari S., Lashtoo-Aghaee B., Rahmani Z., Esmaeili-Gorji B. Evaluation of soluble human leukocyte antigen-G in peripheral blood of pregnant women with gestational diabetes mellitus. *Caspian J. Intern. Med.*, 2016, Vol. 7, no. 3, pp. 178-182.
120. Sokolov D.I., Stepanova O.I., Selkov S.I. The role of the different subpopulations of CD4⁺T lymphocytes during pregnancy. *Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 521-536.
121. Soni C., Karande A.A. Glycodelin-A interferes with IL-2/IL-2R signalling to induce cell growth arrest, loss of effector functions and apoptosis in T-lymphocytes. *Hum. Reprod.*, 2012, Vol. 27, no. 4, pp. 1005-1015.
122. Soni C., Karande A.A. Glycodelin A suppresses the cytolytic activity of CD8⁺ T lymphocytes. *Mol. Immunol.*, 2010, Vol. 47, no. 15, pp. 2458-2466.
123. Steinert E.M., Schenkel J.M., Fraser K.A., Beura L.K., Manlove L.S., Igyarto B.Z., Southern P.J., Masopust D. Quantifying memory CD8 T cells reveals regionalization of immunosurveillance. *Cell*, 2015, Vol. 161, no. 4, pp. 737-749.
124. Sundar Raj S., Soni C., Karande A.A. Glycodelin A triggers T cell apoptosis through a novel calcium-independent galactose-binding lectin activity. *Mol. Immunol.*, 2009, Vol. 46, no. 16, pp. 3411-3419.
125. Swanson P.A. 2nd, Hart G.T., Russo M.V., Nayak D., Yazew T., Pena M., Khan S.M., Janse C.J., Pierce S.K., McGavern D.B. CD8⁺ T cells induce fatal brainstem pathology during cerebral malaria via luminal antigen-specific engagement of brain vasculature. *PLoS Pathog.*, 2016, Vol. 12, no. 12, e1006022. doi: 10.1371/journal.ppat.1006022.
126. Thomas D.A., Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 2005, Vol. 8, no. 5, pp. 369-380.
127. Thompson A.W., Lotze M.T. The cytokine handbook. Gulf Professional Publishing, 2003. 1572 p.
128. Tilburgs T., Scherjon S.A., Roelen D.L., Claas F.H. Decidual CD8⁺CD28⁻ T cells express CD103 but not perforin. *Hum. Immunol.*, 2009, Vol. 70, no. 2, pp. 96-100.
129. Tilburgs T., Schonkeren D., Eikmans M., Nagtzaam N.M., Datema G., Swings G.M., Prins F., van Lith J.M., van der Mast B.J., Roelen D.L., Scherjon S.A., Claas F.H. Human decidual tissue contains differentiated CD8⁺ effector-memory T cells with unique properties. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 7, pp. 4470-4477.
130. Tilburgs T., Strominger J.L. CD8⁺ effector T cells at the fetal-maternal interface, balancing fetal tolerance and antiviral immunity. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 69, no. 4, pp. 395-407.
131. Tilburgs T., van der Mast B.J., Nagtzaam N.M., Roelen D.L., Scherjon S.A., Claas F.H. Expression of NK cell receptors on decidual T cells in human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2009, Vol. 80, no. 1-2, pp. 22-32.
132. Tsunoda I., Kuang L.Q., Kobayashi-Warren M., Fujinami R.S. Central nervous system pathology caused by autoreactive CD8⁺ T-cell clones following virus infection. *J. Virol.*, 2005, Vol. 79, no. 23, pp. 14640-14646.
133. van Egmond A., van der Keur C., Swings G.M., Scherjon S.A., Claas F.H. The possible role of virus-specific CD8(+) memory T cells in decidual tissue. *J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 113, pp. 1-8.
134. van Panhuys N. Studying dendritic cell – T cell interactions under *in vivo* conditions. *Methods Mol. Biol.*, 2017, Vol. 1584, pp. 569-583.
135. Vasquez J.C., Huttner A., Zhang L., Marks A., Chan A., Baehring J.M., Kahle K.T., Dhodapkar K.M. SOX2 immunity and tissue resident memory in children and young adults with glioma. *J. Neurooncol.*, 2017, Vol. 134, no. 1, pp. 41-53.
136. Veras E., Kurman R.J., Wang T.L., Shih I.M. PD-L1 Expression in human placentas and gestational trophoblastic diseases. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 2017, Vol. 36, no. 2, pp. 146-153.
137. Vukmanovic-Stejic M., Vyas B., Gorak-Stolinska P., Noble A., Kemeny D.M. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood*, 2000, Vol. 95, no. 1, pp. 231-240.
138. Wang H., He M., Hou Y., Chen S., Zhang X., Zhang M., Ji X. Role of decidual CD14(+) macrophages in the homeostasis of maternal-fetal interface and the differentiation capacity of the cells during pregnancy and parturition. *Placenta*, 2016, Vol. 38, pp. 76-83.
139. Wang S.C., Li Y.H., Piao H.L., Hong X.W., Zhang D., Xu Y.Y., Tao Y., Wang Y., Yuan M.M., Li D.J., Du M.R. PD-1 and Tim-3 pathways are associated with regulatory CD8⁺ T-cell function in decidua and maintenance of normal pregnancy. *Cell Death Dis.*, 2015, Vol. 6, e1738. doi: 10.1038/cddis.2015.112.
140. Wang W.J., Liu F.J., Qu H.M., Hao C.F., Qu Q.L., Xiong W., Bao H.C., Wang X.R. Regulation of the expression of Th17 cells and regulatory T cells by IL-27 in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 99, no. 1-2, pp. 39-45.
141. White H.D., Crassi K.M., Givan A.L., Stern J.E., Gonzalez J.L., Memoli V.A., Green W.R., Wira C.R. CD3⁺ CD8⁺ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. *J. Immunol.*, 1997, Vol. 158, no. 6, pp. 3017-3027.
142. Wikenheiser D.J., Stumhofer J.S. ICOS co-stimulation: friend or foe? *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 304.
143. Wilczynski J.R., Kalinka J., Radwan M. The role of T-regulatory cells in pregnancy and cancer. *Front. Biosci.*, 2008, Vol. 13, pp. 2275-2289.
144. Williams P.J., Searle R.F., Robson S.C., Innes B.A., Bulmer J.N. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2009, Vol. 82, no. 1, pp. 24-31.
145. Wu Q., Gardiner G.J., Berry E., Wagner S.R., Lu T., Clay B.S., Moore T.V., Ferreira C.M., Williams J.W., Luster A.D., Medoff B.D., Cannon J.L., Sperling A.I., Shilling R.A. ICOS-expressing lymphocytes promote

resolution of CD8-mediated lung injury in a mouse model of lung rejection. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 8, e72955. doi: 10.1371/journal.pone.0072955.

146. Xiao Z., Casey K.A., Jameson S.C., Curtsinger J.M., Mescher M.F. Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 5, pp. 2786-2794.

147. Xin L., Ertelt J.M., Rowe J.H., Jiang T.T., Kinder J.M., Chaturvedi V., Elahi S., Way S.S. Cutting edge: committed Th1 CD4⁺ T cell differentiation blocks pregnancy-induced Foxp3 expression with antigen-specific fetal loss. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 7, pp. 2970-2974.

148. Xu Y.Y., Wang S.C., Lin Y.K., Li D.J., Du M.R. Tim-3 and PD-1 regulate CD8⁺ T cell function to maintain early pregnancy in mice. *J. Reprod. Dev.*, 2017, Vol. 63, no. 3, pp. 289-294.

149. Yang J., Zhang P., Krishna S., Wang J., Lin X., Huang H., Xie D., Grentla B., Huang R., Gao J., Li Q.J., Zhong X.P. Unexpected positive control of NFκB and miR-155 by DGKα and zeta ensures effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 23, pp. 33744-33764.

150. Yap M., Boeffard F., Clave E., Pallier A., Danger R., Giral M., Dantal J., Foucher Y., Guillot-Gueguen C., Toubert A., Souillou J.P., Brouard S., Degauque N. Expansion of highly differentiated cytotoxic terminally differentiated effector memory CD8⁺ T cells in a subset of clinically stable kidney transplant recipients: a potential marker for late graft dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2014, Vol. 25, no. 8, pp. 1856-1868.

151. Yu J., Qian L., Wu F., Li M., Chen W., Wang H. Decreased frequency of peripheral blood CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells correlates with IL-33 levels in pre-eclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 2017, Vol. 36, no. 2, pp. 217-225.

152. Yu X.Z., Liang Y., Nurieva R.I., Guo F., Anasetti C., Dong C. Opposing effects of ICOS on graft-versus-host disease mediated by CD4 and CD8 T cells. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 12, pp. 7394-7401.

153. Zhang X.H., Liang X., Liang X.H., Wang T.S., Qi Q.R., Deng W.B., Sha A.G., Yang Z.M. The mesenchymal-epithelial transition during *in vitro* decidualization. *Reprod. Sci.*, 2013, Vol. 20, no. 4, pp. 354-360.

Авторы:

Степанова О.И. — к.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

Баженов Д.О. — младший 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

Хохлова Е.В. — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Коган И.Ю. — д.м.н., член-корр. РАН, профессор, врио директора ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Соколов Д.И. — д.б.н., заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, кафедра иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

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

Bazhenov D.O., Junior Research Associate, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Khokhlova E.V., Research Assistant, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Kogan I.Yu., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Acting Director, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Head, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation; First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, Department of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Поступила 30.11.2017

Принята к печати 04.12.2017

Received 30.11.2017

Accepted 04.12.2017

ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ У БЕРЕМЕННЫХ С АНЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ И ОЖИРЕНИЕМ

**Прохоренко Т.С., Зима А.П., Саприна Т.В., Мусина Н.Н.,
Шахманова Н.С., Васильева О.А., Новицкий В.В.**

*ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Томск, Россия*

Резюме. Цель исследования — установить роль медиаторов воспаления в патогенезе различных видов анемического синдрома у беременных с ожирением. Проведено определение концентрации IL-1, IL-6, TNF α , С-реактивного белка и гепсидина в сыворотке крови беременных с ожирением в зависимости от вида анемического синдрома: при железодефицитной анемии и анемии хронических заболеваний. Показано, что содержание IL-6 в крови у женщин с ожирением превышает значение данного показателя у здоровых беременных ($p < 0,05$) и не зависит от наличия анемического синдрома либо его вида. Установлено, что у беременных с ожирением повышена в крови концентрация С-реактивного белка относительно контрольных значений ($p < 0,05$). При этом содержание С-реактивного белка в сыворотке крови беременных с анемией хронических заболеваний достоверно выше ($p < 0,05$), чем у женщин с железодефицитной анемией. Отличительной особенностью группы беременных с ожирением и анемией хронических заболеваний явилась концентрация в крови гепсидина, значимо повышенная по сравнению с аналогичным показателем у здоровых беременных ($p < 0,05$), беременных с ожирением без анемии ($p < 0,05$), а также в 2 раза превышающая его содержание в сыворотке крови беременных с ожирением и железодефицитной анемией ($p < 0,05$). Только в группе беременных с ожирением и анемией хронических заболеваний была выявлена положительная корреляционная связь концентрации С-реактивного белка с уровнем в крови гепсидина ($r = 0,733$, $p < 0,05$) и IL-6 ($r = 0,679$, $p < 0,05$).

В статье обсуждаются механизмы развития анемии хронических заболеваний на фоне субклинического воспаления у беременных с метаболическими нарушениями. Дается заключение, что риском развития анемии хронических заболеваний у беременных является сочетание ожирения и гестационного сахарного диабета. Указывается на целесообразность проведения исследований по созданию алгоритма дифференциальной диагностики железодефицитной анемии и анемии хронических заболеваний для данной категории пациенток.

Ключевые слова: анемия хронических заболеваний, беременность, ожирение, гестационный сахарный диабет, цитокины, гепсидин

Адрес для переписки:

Прохоренко Татьяна Сергеевна
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел.: 8 (3822) 53-33-09.
E-mail: mmikld.ssmu@gmail.com

Address for correspondence:

Prokhorenko Tatiana S.
Siberian State Medical University
634050, Russian Federation, Tomsk, Moskovsky Tract, 2.
Phone: 7 (3822) 53-33-09.
E-mail: mmikld.ssmu@gmail.com

Образец цитирования:

Т.С. Прохоренко, А.П. Зима, Т.В. Саприна, Н.Н. Мусина,
Н.С. Шахманова, О.А. Васильева, В.В. Новицкий
«Значение определения маркеров воспаления у беременных
с анемическим синдромом и ожирением»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 639–646.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-639-646
© Прохоренко Т.С. и соавт., 2018

For citation:

T.S. Prokhorenko, A.P. Zima, T.V. Saprina, N.N. Musina,
N.S. Shakhmanova, O.A. Vasilyeva, V.V. Novitsky
“Significance of inflammation markers determined in pregnant women with
anemic syndrome and obesity”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 639–646.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-639-646
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-639-646

SIGNIFICANCE OF INFLAMMATION MARKERS DETERMINED IN PREGNANT WOMEN WITH ANEMIC SYNDROME AND OBESITY

Prokhorenko T.S., Zima A.P., Saprina T.V., Musina N.N.,
Shakhmanova N.S., Vasilyeva O.A., Novitsky V.V.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. The purpose of the present study was to specify a role of inflammatory mediators in pathogenesis of various types of anemia in pregnant obese women. We determined IL-1, IL-6, TNF α , C-reactive protein and hepcidin concentrations in blood serum of pregnant women with obesity depending on the type of anemic syndrome, either iron-deficiency anemia, or anemia of chronic diseases. We showed that the content of IL-6 in blood of the obese women exceeds the value of this index in healthy pregnant women ($p < 0.05$), and it does not depend on the presence and type of anemic syndrome. We found that the C-reactive protein concentration in pregnant women with obesity is higher than reference values ($p < 0.05$). Moreover, the contents of C-reactive protein in blood serum of pregnant women with anemia of chronic diseases is significantly higher ($p < 0.05$) than in women with iron deficiency anemia. Heparin concentration in blood of pregnant women with obesity and anemia of chronic disease was a specific feature: its content was significantly higher than in healthy pregnant women ($p < 0.05$), or in pregnant women with anemia-free obesity ($p < 0.05$). Heparin levels also exceeded 2-fold its contents in serum from pregnant women with obesity and iron deficiency anemia ($p < 0.05$). We have found that only pregnant women with obesity and anemia of chronic diseases have shown a positive correlation between the concentrations of C-reactive protein and blood levels of hepcidin ($r = 0.733$, $p < 0.05$), or IL-6 ($r = 0.679$, $p < 0.05$).

The discussion concerns potential mechanisms of evolving anemia of chronic disease combined with subclinical inflammation in pregnant women with metabolic disorders. We conclude that a combination of obesity with gestational diabetes is a risk factor of anemia of chronic diseases in pregnant women. Development of an algorithm for differential diagnosis of iron deficiency anemia and anemia of chronic diseases in this cohort of patients is advisable for future studies in the area.

Keywords: anemia of chronic diseases, pregnancy, obesity, gestational diabetes mellitus, cytokines, hepcidin

Исследование выполнено при финансовой поддержке совета по грантам при Президенте РФ (договор № 14.W01.16.5249-МК); гранта РФФИ p_a № 16-44-700246.

Введение

Проведение исследований по установлению механизмов развития анемического синдрома у беременных на сегодняшний день актуально по ряду причин. При высокой частоте возникновения анемии у беременных этиология и патогенез ее различны [4]. Основная сложность заключается в своевременной дифференциальной диагностике железодефицитной анемии (ЖДА) и анемии хронических заболеваний (АХЗ) [2]. Для этого, с одной стороны, необходимы надежные лабораторные маркеры АХЗ, а с другой — понимание, какие сопутствующие анемическому синдрому заболевания у беременных ставят их в группу риска развития АХЗ.

Доказано, что АХЗ развивается в результате активации иммунной системы, с последующим

повышенным синтезом IL-6 и гепсидина [11]. Известно также, что к числу патологий, характеризующихся избыточной продукцией медиаторов воспаления [1, 7] и часто встречающихся при беременности, относится ожирение. Это явилось предпосылкой к изучению связи развития АХЗ у беременных с наличием субклинического воспаления, вызванного ожирением.

Цель исследования — установить роль медиаторов воспаления в патогенезе различных видов анемического синдрома у беременных с ожирением.

Материалы и методы

Проведено обследование 41 беременной с избыточной массой тела или ожирением, наблюдавшейся у врача-эндокринолога на базе ОГАУЗ «Областной перинатальный центр» г. Томска. На основании комплексного анализа лабораторных данных выявляли наличие анемического синдрома и его вид. Оценивали основные гематологические показатели (количество эритроцитов и ретикулоцитов, концентрацию гемоглобина)

с использованием 5-diff гематологического анализатора Sysmex xs-1000i, Sysmex, Япония; биохимические показатели обмена железа (концентрацию сывороточного железа, трансферрина, ферритина общую железосвязывающую способность, насыщение трансферрина железом) с использованием анализатора Cobas c 311, Roche, Германия. По результатам обследования женщины были разделены на три группы: не имевшие анемического синдрома — 14 человек; имевшие железодефицитную анемию (ЖДА) — 15 пациенток; имевшие анемию хронических заболеваний (АХЗ) — 12 беременных. На момент исследования все пациентки находились на втором триместре беременности. Возраст обследуемых составил от 23 до 44 лет. Группу сравнения составили 12 здоровых беременных сопоставимой группе обследования возраста. Критериями исключения беременных из программы исследования являлись: применение препаратов железа, наличие на момент обследования острых и обострения хронических инфекций, гнойно-некротических заболеваний, наличие в анамнезе или на момент скрининга аллергических заболеваний (бронхиальная астма, атопический дерматит и т.д.), нефрит любой этиологии, псориаз, а также отказ от участия в исследовании. Исследование соответствовало этическим стандартам, и все лица, участвовавшие в исследовании, подписали информированное согласие.

Анемическим синдромом у беременных считали снижение концентрации гемоглобина в крови менее 110 г/л. Железодефицитную анемию верифицировали на основании снижения содержания в крови железа и ферритина, в комплексе с повышенными значениями общей железосвязывающей способности, насыщения трансферрина железом и концентрации трансферрина в сыворотке крови. При сниженных значениях общей железосвязывающей способности, насыщения трансферрина железом, концентрации сывороточного железа и трансферрина, но нормальной или повышенной концентрации ферритина в крови устанавливали диагноз анемии хронических заболеваний.

Предожирением считали индекс массы 25–29,99 кг/м², ожирением — более 30 кг/м². Учитывали наличие у беременных гестационного сахарного диабета (ГСД). Диагноз гестационного сахарного диабета беременным выставлен в соответствии с диагностическими уровнями гликемии (на основании Российского национального консенсуса «Гестационный сахарный диабет: диагностика, лечение, послеродовое наблюдение», 2012), установлен в первом триместре беременности в рамках первого биохимического скрининга. Все беременные женщины с ГСД были

компенсированы на фоне диетотерапии, без применения препаратов инсулина.

Материалом исследования явилась сыворотка венозной крови, взятая утром до приема пищи из локтевой вены в количестве 10 мл в вакуумную пробирку BD Vacutainer с активатором свертывания диоксидом кремния (Becton Dickinson, США). Методом твердофазного иммуноферментного анализа в сыворотке крови определяли концентрацию цитокинов IL-1, IL-6, TNF α (пг/мл) (АО «Вектор-Бест», Россия) и гепсидина (нг/мл) (MyBioSource, США), согласно инструкциям фирм-производителей наборов реагентов. Считывание результатов производилось с помощью автоматического фотометра для микропланшета Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 450 нм. Концентрацию исследуемых маркеров определяли по стандартной калибровочной кривой. Турбидиметрическим методом с латексным усилением в сыворотке крови определяли концентрацию С-реактивного белка (мг/л) с использованием анализатора Cobas c311 (Roche, Германия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ SPSS Statistics 18. Проверка нормальности распределения проводилась по критерию Шапиро–Уилка. Пороговый уровень значимости был принят равным 0,05. Полученные данные не подчинялись нормальному закону распределения и были представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me, Q_{0,25}–Q_{0,75}). В целях установления значимости различий показателей между независимыми группами сравнения была проведена статистическая обработка с помощью критериев Краскела–Уоллиса с учетом поправки Бонферрони для четырех групп исследования, Манна–Уитни — для двух групп. Корреляцию между признаками оценивали с помощью критерия Спирмена для непараметрических данных. Пороговый уровень значимости был принят равным 0,05. Статистическую значимость различий частоты встречаемости качественных признаков в анализируемых группах проверяли с помощью критерия χ^2 Пирсона с критическим уровнем значимости $p < 0,05$. Далее обработка результатов исследований осуществлялась с использованием критерия отношения шансов OR с расчетом 95% доверительного интервала (ДИ).

Результаты

Анализ данных о концентрации цитокинов в сыворотке крови беременных показал, что содержание IL-6 в крови у женщин с ожирением превышает значение данного показателя у здоровых беременных и не зависит от наличия анемического синдрома либо его вида. Статистически

значимых различий в концентрации IL-1 и TNF α у беременных сравниваемых групп наблюдения не обнаруживалось. Также у беременных с ожирением была повышена в крови концентрация С-реактивного белка относительно контрольных значений. Содержание С-реактивного белка в сыворотке крови беременных с анемией хронических заболеваний оказалось достоверно выше, чем у женщин с железодефицитной анемией. Другой отличительной особенностью группы беременных с ожирением и анемией хронических заболеваний явилась концентрация в крови гепсидина, значимо повышенная по сравнению с аналогичным показателем у здоровых беременных, беременных с ожирением без анемии, а также в 2 раза превышающая его содержание в сыворотке крови беременных с ожирением и железодефицитной анемией (табл. 1). Только в группе беременных с ожирением и анемией хронических заболеваний была выявлена положительная корреляционная связь концентрации С-реактивного белка с уровнем в крови гепсидина ($r = 0,733$, $p < 0,05$) и IL-6 ($r = 0,679$, $p < 0,05$).

Для установления клинических факторов, связанных с повышенной продукцией указанных ранее белков воспаления и развитием анемии хронических заболеваний у беременных с ожирением, нами была проведена сравнительная оценка степени ожирения женщин в группах наблюдения (табл. 2). Однако связи степени ожирения с развитием определенного вида анемического синдрома обнаружено не было. При этом обратило на себя внимание наличие у части беременных сочетания ожирения с гестационным сахарным диабетом. Стратификация женщин по данному признаку дала следующие результаты (табл. 3). Среди беременных с ожирением без анемического синдрома наблюдалось примерно равное количество женщин, имеющих ГСД и не имеющих нарушений углеводного обмена. У пациенток с железодефицитной анемией доля лиц, имеющих ГСД, составила пятую часть от общего количества женщин в группе наблюдения. В группе беременных с анемией хронических заболеваний преобладали пациентки с сочетанием ожирения и ГСД, что оценивалось нами как фак-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ С ОЖИРЕНИЕМ С УЧЕТОМ ВИДА АНЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. THE CONCENTRATION OF SERUM INFLAMMATORY MARKERS IN PREGNANT WOMEN WITH OBESITY, TAKING INTO ACCOUNT THE TYPE OF ANEMIA (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Parameter	Обследованные лица Subjects under study			
	Здоровые беременные Healthy pregnant women (n = 12)	Беременные с ожирением без анемии Pregnant women with obesity without anemia (n = 14)	Беременные с ожирением и железодефицитной анемией Pregnant women with obesity and iron deficiency anemia (n = 15)	Беременные с ожирением и анемией хронических заболеваний Pregnant women with obesity and anemia chronic disease (n = 12)
IL-1 (пг/мл) IL-1 (pg/ml)	2,0 (1,2-2,8)	1,1 (1,0-1,2)	1,2 (1,2-2,0)	1,1 (1,1-1,7)
IL-6 (пг/мл) IL-6 (pg/ml)	0,5 (0,0-1,0)	3,6 (3,0-4,2)*	1,7 (1,7-2,6)*	2,7 (1,8-3,0)*
TNF α (пг/мл) TNF α (pg/ml)	2,1 (0,0-4,2)	3,85 (2,9-4,8)	3,5 (3,0-4,1)	3,5 (2,3-3,5)
Гепсидин (нг/мл) Hepcidin (ng/ml)	9,7 (8,3-11,1)	7,1 (5,1-9,1)	6,5 (3,7-6,6)	12,2 (11,6-14,6)* ** #
С-реактивный белок (мг/л) C-reactive protein (mg/l)	1,32 (1,0-1,65)	12,69 (6,37-19,02)*	3,29 (2,66-3,83)*	8,79 (6,32-10,12)* #

Примечание. * – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями здоровых беременных ($p < 0,05$); ** – беременных с ожирением без анемии; # – беременных с ожирением и железодефицитной анемией.

Note. *, the differences are significant against similar indexes of healthy pregnant women ($p < 0.05$); **, against pregnant women with obesity without anemia; #, against pregnant women with obesity and iron deficiency anemia.

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТЕПЕНИ ОЖИРЕНИЯ У ОБСЛЕДОВАННЫХ БЕРЕМЕННЫХ

TABLE 2. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE DEGREE OF OBESITY IN THE EXAMINED PREGNANT WOMEN

Степень ожирения Degree of obesity	Обследованные лица Subjects under study		
	Беременные с ожирением без анемии Pregnant women with obesity without anemia (n = 14)	Беременные с ожирением и железодефицитной анемией Pregnant women with obesity and iron deficiency anemia (n = 15)	Беременные с ожирением и анемией хронических заболеваний Pregnant women with obesity and anemia chronic disease (n = 12)
Предожирение Overweight	35,8%	0%	25%
I степень ожирения I degree of obesity	28,5%	60%	33,3%
II степень ожирения II degree of obesity	7,2%	20%	33,3%
III степень ожирения III degree of obesity	28,5%	20%	8,4%

ТАБЛИЦА 3. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕСТАЦИОННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА У ОБСЛЕДОВАННЫХ БЕРЕМЕННЫХ С ОЖИРЕНИЕМ

TABLE 3. PREVALENCE OF GESTATIONAL DIABETES MELLITUS IN SURVEYED PREGNANT WOMEN WITH OBESITY

Обследованные лица Subjects under study	Беременные с ожирением без анемии Pregnant women with obesity without anemia (n = 14)	Беременные с ожирением и железодефицитной анемией Pregnant women with obesity and iron deficiency anemia (n = 15)	Беременные с ожирением и анемией хронических заболеваний Pregnant women with obesity and anemia chronic disease (n = 12)
Без гестационного сахарного диабета (%) Without gestational diabetes mellitus (%)	57	80	25
С гестационным сахарным диабетом (%) With gestational diabetes mellitus (%)	43	20	75

тор, предрасполагающий в отношении развития АХЗ ($\chi^2 = 4,288$, $p = 0,038$; OR = 5,143, ДИ [1,033-25,602]).

Обсуждение

Жировая ткань является источником продукции широкого спектра медиаторов воспаления, что при ожирении предрасполагает к развитию хронического субклинического воспаления [7]. Повышенное содержание в крови IL-6 и С-реактивного белка у беременных с ожирением всех групп наблюдения подтверждает наличие у них низкоактивного воспалительного

процесса и согласуется с результатами исследования других авторов [9]. Закономерно при этом, что активность воспаления у беременных с АХЗ оказалась выше, чем у беременных с ЖДА, что выражалось различиями в сывороточной концентрации С-реактивного белка. Связующим звеном между воспалением и развитием анемического синдрома является продукция печенью гепсидина [11]. Повышенное содержание в крови данного белка оказалось характерным именно для беременных с анемией, которая по комплексу традиционных клинико-лабораторных показателей была классифицирована нами как АХЗ.

Помимо печени, клетками-продуцентами гепсидина являются адипоциты. В немногочисленных исследованиях по оценке содержания гепсидина в крови беременных было показано следующее. При физиологической беременности, не отягощенной ожирением, с увеличением срока гестации концентрация гепсидина снижалась, что связывают с необходимостью повышения доступности железа для плода [8, 12]. У беременных с ожирением содержание гепсидина в крови превышало его концентрацию у беременных без ожирения, а максимальная концентрация уровня данного белка была обнаружена у беременных с ожирением, принимавших препараты железа [8]. Доказано, что у пациентов с ожирением экспрессия мРНК и продукция самого белка повышаются и положительно коррелируют с уровнем IL-6 и С-реактивного белка [5, 6, 17]. Аналогичные корреляционные связи между концентрацией IL-6, С-реактивного белка и гепсидина были выявлены и в нашем исследовании у беременных. В научных работах, раскрывающих механизмы нарушения метаболизма железа при ожирении, сообщается о значимой роли в данном процессе лептина и адипонектина [7, 10, 18], активации JAK2/STAT3- и BMP-пути [6, 13]. Дискутируется вопрос о влиянии IL-1 и TNF α на продукцию гепсидина и о их роли в развитии АХЗ [14, 15, 16]. В настоящем исследовании не было получено статистически значимых межгрупповых отличий концентрации IL-1 и TNF α в крови беременных. Но можно предположить, что в случае низкоактивного воспаления у беременных с ожирением при исследовании сыворотки крови затруднительно зафиксировать кратковременное и локальное повышение продукции данных цитокинов иммунными клетками и адипоцитами.

Важно отметить, что концентрация IL-6 в крови беременных с ЖДА и АХЗ имела сопоставимые значения, что указывает на наличие дополнительных молекулярных факторов, стимулирующих

продукцию гепсидина, повышение его содержания в крови и способствующих развитию анемии хронических заболеваний. Так, было установлено, что среди обследованных нами беременных АХЗ достоверно чаще развивалась у женщин с сочетанием ожирения и ГСД. Однозначный ответ на вопрос, какие механизмы связывают гестационное нарушение углеводного обмена с повышением продукции гепсидина, в настоящее время дать сложно. Однако ранее нами было показано [3], что при беременности, отягощенной сочетанием ГСД и ожирения, изменения цитокинового профиля носят более выраженный характер, чем у беременных с избыточной массой тела/ожирением или беременных с ГСД, и характеризуются повышенной концентрацией в крови GM-CSF, IFN γ , IL-6, TNF α на фоне низкого содержания IL-2 и IL-10. Предположение о том, что беременных с гестационным диабетом и ожирением можно рассматривать как группу риска по развитию анемии хронических заболеваний, нашло подтверждение в настоящей работе.

Таким образом, проведенное исследование показало, что описанный в научной литературе механизм развития АХЗ с участием гепсидина, IL-6 и С-реактивного белка реализуется не только при заболеваниях, протекающих с выраженным воспалительным ответом (инфекциях, аутоиммунных патологиях и др.), но и при ожирении, сопровождающемся субклиническим воспалением. Сочетание во время беременности ожирения любой степени с ГСД рассматривается нами как фактор повышенного риска развития АХЗ. В условиях отсутствия внедренных в клиническую практику специфичных в отношении АХЗ маркеров при беременности, отягощенной анемией, ожирением и ГСД, целесообразно проводить развернутый лабораторный анализ гематологических показателей и биохимических маркеров метаболизма железа, дополняя его определением концентрации С-реактивного белка.

Список литературы / References

1. Литвинова Л.С., Кириенкова Е.В., Газатова Н.Д., Затолокин П.А., Василенко М.А., Аксенова Н.Н., Симбирцев А.С. Особенности цитокинпродуцирующей способности мононуклеарных клеток периферической крови при метаболическом синдроме // Цитокины и воспаление, 2013. Т. 12, № 3. С. 56-60. [Litvinova L.S., Kirienkova E.V., Gazatova N.D., Zatolokin P.A., Vasilenko M.A., Aksenov N.N., Simbirtsev A.S. Features cytokine mononuclear ability of peripheral blood cells of patients with metabolic syndrome. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, Vol. 12, no. 3, pp. 56-60. (In Russ.)]
2. Прохоренко Т.С., Зима А.П., Саприна Т.В., Мусина Н.Н., Шахманова Н.С., Новицкий В.В. К вопросу о дифференциальной диагностике анемического синдрома у беременных // Бюллетень сибирской медицины, 2017. Т. 16, № 1. С. 140-151. [Prokhorenko T.S., Zima A.P., Saprina T.V., Musina N.N., Shakhmanova N.S., Novitsky V.V. Differential diagnosis of anemia in pregnant women. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2017, Vol. 16, no 1, pp. 140-151. (In Russ.)]
3. Прохоренко Т.С., Зима А.П., Саприна Т.В., Новицкий В.В., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С. Цитокиновый статус беременных с метаболическими нарушениями // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3.

C. 301-306. [Prokhorenko T.S., Zima A.P., Saprina T.V., Novitsky V.V., Todosenko N.M., Litvinova L.S. Cytokine profile in pregnant women with metabolic disorders. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 301-306. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-301-306.

4. Репина М.А., Бобров С.А. Анемический синдром у беременных: вопросы патогенеза, диагноза и лечения // Журнал акушерства и женских болезней, 2010. № 2. С. 3-11. [Repina M.A., Bobrov S.A. Anemic syndrome in pregnancy: pathogenesis questions, diagnosis and treatment. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women Diseases*, 2010, no. 2, pp. 3-11. (In Russ.)]

5. Coimbra S., Catarino C., Santos-Silva A. The role of adipocytes in the modulation of iron metabolism in obesity. *Obes. Rev.*, 2013. Vol. 14, no. 10, pp. 771-779.

6. Dao M.C., Sen S., Iyer C., Klebenov D., Meydani S.N. Obesity during pregnancy and fetal iron status: Is hepcidin the link? *J. Perinatol.*, 2013, no. 33, pp. 177-181.

7. Ellulu M.S., Patimah I., Khaza'ai H., Rahmat A., Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch. Med. Sci.*, 2017, Vol. 13, no. 4, pp. 851-863.

8. Flores-Quijano M.E., Montalvo-Velarde I., Vital-Reyes V.S., Rodriguez-Cruz M., Rendon-Macias M.E., Lopez-Alarcon M. Longitudinal analysis of the interaction between obesity and pregnancy on iron homeostasis: role of hepcidin. *Arch. Med. Res.*, 2016, Vol. 47, no. 7, pp. 550-556.

9. Friis C.M., Paasche Roland M.C., Godang K., Ueland T., Tanbo T., Bollerslev J., Henriksen T. Adiposity-related inflammation: effects of pregnancy. *Obesity (Silver Spring)*, 2013, Vol. 21, no. 1, pp. 124-130.

10. Gabrielsen J.S., Gao Y., Simcox J.A., Huang J., Thorup D., Jones D., Cooksey R.C., Gabrielsen D., Adams T.D., Hunt S.C., Hopkins P.N., Cefalu W.T., McClain D.A. Adipocyte iron regulates adiponectin and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 10, pp. 3529-3540.

11. Ganz T., Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, Vol. 1823, no. 9, pp. 1434-1443.

12. Koenig M.D., Tussing-Humphreys L., Day J., Cadwell B., Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis during pregnancy. *Nutrients*, 2014, Vol. 6, no. 8, pp. 3062-3083.

13. Meli R., Mattace Raso G., Irace C., Simeoli R., Di Pascale A., Paciello O., Pagano T.B., Calignano A., Colonna A., Santamaria R. High fat diet induces liver steatosis and early dysregulation of iron metabolism in rats. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 6, e66570. doi: 10.1371/journal.pone.0066570.

14. Nairz M., Haschka D., Demetz E., Weiss G. Iron at the interface of immunity and infection. *Front. Pharmacol.*, 2014, Vol. 5, p. 152.

15. Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J., Vaughn M.B., Donovan A., Ward D.M., Ganz T., Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 2004, Vol. 306, no. 5704, pp. 2090-2093.

16. Nemeth E., Ganz T. Anemia of inflammation. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, 2014, Vol. 28, no. 4, pp. 671-781.

17. Vuppalanchi R., Troutt J.S., Konrad R.J., Ghabril M., Saxena R., Bell L.N., Kowdley K.V., Chalasani N. Serum hepcidin levels are associated with obesity but not liver disease. *Obesity (Silver Spring)*, 2014, Vol. 22, no. 3, pp. 836-841.

18. Zembala-Szczerba M., Jaworowski A., Huras H., Babczyk D., Jach R. Low-grade metabolically-induced inflammation mediators interleukin-6, adiponectin, and TNF- α serum levels in obese pregnant patients in the perinatal period. *Med. Sci. Monit. Basic. Res.*, 2017, Vol. 23, pp. 1-7.

Авторы:

Прохоренко Т.С. — к.м.н., научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Зима А.П. — д.м.н., профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Саприна Т.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры эндокринологии и диabetологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Мусина Н.Н. — аспирант кафедры эндокринологии и диabetологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Authors:

Prokhorenko T.S., PhD (Medicine), Research Associate, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Zima A.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Saprina T.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Endocrinology and Diabetology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Musina N.N., Postgraduate Student, Department of Endocrinology and Diabetology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Шахманова Н.С. — аспирант кафедры патофизиологии
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Томск, Россия

Васильева О.А. — к.м.н., доцент кафедры
патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Новицкий В.В. — д.м.н., профессор, академик
РАН, заслуженный деятель науки РФ, профессор
кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Shakhmanova N.S., Postgraduate Student, Department
of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk,
Russian Federation

Vasilyeva O.A., PhD (Medicine), Assistant Professor,
Department of Pathophysiology, Siberian State Medical
University, Tomsk, Russian Federation

Novitsky V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member,
Russian Academy of Sciences, Honoured Science Worker of the
Russian Federation, Professor, Department of Pathophysiology,
Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 17.12.2017
Принята к печати 21.12.2017

Received 17.12.2017
Accepted 21.12.2017

СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ НА СОДЕРЖАНИЕ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ПОРОКАМИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА

Глушков А.Н.¹, Красильникова К.С.¹, Поленок Е.Г.¹, Костянко М.В.², Оленникова Р.В.³, Нерсисян С.Л.³

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

² ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

³ ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С.В. Беляева», г. Кемерово, Россия

Резюме. В экспериментах на животных показано, что антитела против химических генотоксикантов окружающей среды и эндогенных стероидных гормонов способны модулировать содержание этих соединений в сыворотке крови и их биологические эффекты. Однако роль таких антител в тератогенезе у человека остается малоизученной. В частности, неизвестно их влияние на концентрации женских половых гормонов в сыворотке крови беременных женщин с врожденными пороками развития плода. Цель исследования – выявить возможные ассоциации антител, специфичных к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону (Вр, Es, Pg) с врожденными пороками развития плода и их влияние на содержание эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови беременных женщин при физиологической беременности и при врожденных пороках развития плода. Обследованы 182 женщины с физиологической беременностью и 101 женщина с врожденными пороками развития плода. Исследование антител к Вр, Es, Pg выполняли с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа с использованием конъюгатов с бычьим сывороточным альбумином в качестве антигенов. Концентрацию Es и Pg в сыворотке определяли с помощью коммерческих тест-систем для иммуноферментного анализа («Иммунотех», Москва). В обеих сравниваемых группах были обнаружены прямые корреляционные связи между уровнями антител классов А и G к Es и Pg с одной стороны и антител к Вр с другой стороны. Частота случаев с высокими и низкими уровнями антител к Вр, Es и Pg оказалась одинаковой у женщин обеих групп. В то же время высокие значения соотношений IgA-Вр/IgA-Es и IgA-Вр/IgA-Pg у женщин с врожденными пороками развития плода встречались значительно чаще, чем при физиологической беременности. При этом показатели отношения шансов (OR) составляли от 2,2 ($p = 0,01$) до 6,8 ($p < 0,0001$). Выявлены положительные корреляционные связи между соотношениями концентраций гормонов Pg/Es с одной стороны и соотношениями уровней IgA-Вр/IgA-Es и IgA-Вр/IgA-Pg у женщин с врожденными пороками развития плода ($r_s = 0,62$, $p < 0,0001$ и $r_s = 0,77$, $p < 0,0001$) с другой. Соотношение гормонов Pg/Es коррелировало с соотношениями уровней IgG-Вр/IgG-Es

Адрес для переписки:

Красильникова Ксения Сергеевна
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук»
650065, Россия, г. Кемерово, Ленинградский пр., 10.
Тел.: 8 (960) 913-99-96.
E-mail: krasilnikovaks@mail.ru

Address for correspondence:

Krasilnikova Kseniya S.
Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences
650065, Russian Federation, Kemerovo, Leningradsky ave, 10.
Phone: 7 (960) 913-99-96.
E-mail: krasilnikovaks@mail.ru

Образец цитирования:

А.Н. Глушков, К.С. Красильникова, Е.Г. Поленок, М.В. Костянко, Р.В. Оленникова, С.Л. Нерсисян «Совместное влияние антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону на содержание половых гормонов в сыворотке крови беременных женщин с пороками развития плода» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 647–656.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-647-656
© Глушков А.Н. и соавт., 2018

For citation:

A.N. Glushkov, K.S. Krasilnikova, E.G. Polenok, M.V. Kostyanko, R.V. Olennikova, S.L. Nersesyan “Combined effect of antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone upon sex hormone concentrations in blood serum of pregnant women with congenital malformations of fetus”, Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 647–656.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-647-656
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-647-656

и IgG-Bp/IgG-Pg у женщин с врожденными пороками развития плода ($r_s = 0,46$, $p = 0,002$ и $r_s = 0,5$, $p < 0,0009$), но не с физиологической беременностью. Впервые выявлены ассоциации антител против экзогенных генотоксикантов и против стероидных гормонов с врожденными патологиями развития плода, а также их совместное влияние на содержание Es и Pg в сыворотке крови беременных женщин.

Ключевые слова: врожденные пороки развития плода, антитела, бензо[а]пирен, эстрадиол, прогестерон

COMBINED EFFECT OF ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE UPON SEX HORMONE CONCENTRATIONS IN BLOOD SERUM OF PREGNANT WOMEN WITH CONGENITAL MALFORMATIONS OF FETUS

Glushkov A.N.^a, Krasilnikova K.S.^a, Polenok E.G.^a, Kostyanko M.V.^b, Olennikova R.V.^c, Nersesyan S.L.^c

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

^b Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

^c Kemerovo S. Belyaev Regional Hospital, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Specific antibodies against environmental chemical gene toxicants and endogenous steroid hormones are shown to modulate concentrations of these compounds in blood serum and their biological effects in experimental models. However, probable hazards of such antibodies in human teratogenesis are still unknown. In particular, potential correlations between specific serum antibodies, sex hormone levels in pregnant women, and congenital malformations in newborns are not clear. The aim of this study was to identify possible associations between occurrence of antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone (Bp, Es and Pg, respectively), and congenital malformations, and effects of these antibodies upon Es and Pg concentrations in blood serum of pregnant women. We have included into the study 182 women with normal pregnancy and 101 females with congenital malformations of fetus. A non-competitive solid phase immunoassay was performed using Bp, Es and Pg conjugated to bovine serum albumin as antigens. Es and Pg serum concentrations were measured using immunoassay test-systems of "Immunotech" (Moscow). Results: strong positive correlations were revealed between the levels of studied antibodies in the both groups. High IgA-Bp/IgA-Es (> 3) and IgA-Bp/IgA-Pg ratios (> 3) were associated with congenital malformations (OR = 2.2, $p = 0.013$ and OR = 6.8, $p < 0.0001$). Positive correlations were revealed between Pg/Es and IgA-Bp/IgA-Es ($r_s = 0.62$, $p < 0.0001$), and IgA-Bp/IgA-Pg ratios ($r_s = 0.77$, $p < 0.0001$) in cases with inborn malformations. Similar correlations were found for the women who had normal pregnancy ($r_s = 0.4$, $p = 0.0001$, and $r_s = 0.23$, $p = 0.026$, respectively). The Pg/Es proportion correlated with IgG-Bp/IgG-Es ($r_s = 0.46$, $p = 0.002$), and with IgG-Bp/IgG-Pg ratio ($r_s = 0.5$, $p = 0.0009$) in cases of malformations, but not in women with normal pregnancy. Conclusion: we have revealed novel associations between congenital malformations of fetus and ratios of IgA-Bp/IgA-Es, as well as IgA-Bp/IgA-Pg, like as positive correlations between hormonal Pg/Es proportions, and ratios of specific antibodies in pregnant women.

Keywords: congenital malformations, antibodies, benzo[a]pyrene, estradiol, progesterone

Введение

Участие полициклических ароматических углеводородов окружающей среды, в частности бензо[а]пирена (Bp), в возникновении врожденных пороков развития плода (ВПРП) убедительно подтверждается результатами эпидемиологических исследований и наличием аддуктов Bp с ДНК в тканях плаценты и плода, в пуповинной

крови, в крови матери и новорожденного ребенка [14, 17, 19, 24, 25, 26]. Bp как низкомолекулярное соединение не распознается иммунной системой организма. Но в составе крупномолекулярных аддуктов он становится гаптеном и приобретает способность индуцировать синтез специфических антител (АТ). АТ класса G к Bp обнаружены ранее в сыворотке крови женщин с физиологической беременностью (ФБ) и с

ВППП [2]. Выявлены прямые корреляционные связи уровней этих АТ с АТ к эстрадиолу (Es) и прогестерону (Pg) [3]. У женщин с привычным невынашиванием беременности были выявлены кожная гиперчувствительность к Es и Pg [1] и АТ к Pg в сыворотке крови [13, 18]. С повышенными уровнями АТ к Es и Pg оказались ассоциированными симптомы, связанные с менструальным циклом [12].

С другой стороны, в многочисленных экспериментах показано, что иммунизация животных против половых стероидных гормонов приводит к образованию специфических АТ, значительно повышению в крови концентрации гормонов и изменениям их биологических функций, в том числе связанных с беременностью [5, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 23].

На основании известных клинических и экспериментальных данных предположили, что АТ, специфичные к Es и Pg, способны влиять на содержание этих гормонов в сыворотке крови беременных женщин, а АТ к Вр способны модулировать эти эффекты.

Цель настоящей работы — выявить предполагаемое совместное влияние антител к Вр, Es и Pg на содержание этих гормонов в сыворотке крови женщин при физиологической беременности и беременности с врожденными пороками развития плода.

Материалы и методы

Описание исследуемых групп

Материалом для исследования послужили 283 образца сывороток крови женщин на 13-27 неделях беременности (II триместр). По результатам УЗИ женщины были разделены на 2 группы. 182 женщины имели физиологическую беременность. Средний возраст в группе составил $27,5 \pm 5,2$ лет. 101 женщина вынашивала беременность с ВППП. Преобладали пороки сердечно-сосудистой (23,4%), мочевыделительной (20,6%), центральной нервной (18,3%), костно-мышечной систем (15,8%), а также множественные ВППП (12%). Средний возраст — $26,4 \pm 2,1$ лет. УЗИ (скрининговое на сроке 10-13 и 20-24 недель) проводилось на базах лечебно-профилактических учреждений II и III типов: Городской клинической больницы № 1 г. Кемерово, Городского и Областного перинатальных центров г. Кемерово.

Исследование антител

АТ к Вр, Es и Pg определяли методом неконкурентного ИФА в собственной модификации с использованием конъюгатов Вр, Es и Pg с бычьим сывороточным альбумином (BSA) в качестве антигена [4]. В лунки полистирольных иммунологических планшетов вносили по 100 мкл

конъюгата гаптен-BSA в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали при температуре 25 °С в течение ночи. Для оценки фонового связывания с белком в отдельные лунки вносили неконъюгированный BSA. Для определения IgA-Вр, IgA-Es и IgA-Pg сыворотку крови разводили 1:20 блокирующим раствором с BSA и вносили на полистероловый планшет в дублях с последующим вычислением среднего значения. Связавшиеся АТ выявляли с помощью кроличьих АТ против IgA человека, меченных пероксидазой хрена (Sigma, Германия). Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ, США), на фотометре (Пикон, Россия) при длине волны 450 нм. Аналогичным образом выполняли иммуноанализ IgG к указанным соединениям, разводя сыворотку 1:100.

Уровни АТ, специфичных к Вр и стероидным гормонам, определяли по формуле:

$$\text{IgA-X} = (\text{OD}_{(\text{X-BSA})} - \text{OD}_{(\text{BSA})}) / \text{OD}_{(\text{BSA})},$$

где $\text{OD}_{(\text{X-BSA})}$ — значение оптической плотности связывания с конъюгатом Вр-, Es-, Pg-BSA; $\text{OD}_{(\text{BSA})}$ — значение оптической плотности связывания с BSA.

Исследование гормонов

Определение концентрации Es и Pg в сыворотках крови беременных женщин проводилось при помощи коммерческих наборов ИФА («Иммунотех», Москва) согласно инструкции по применению.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0. С использованием критерия Шапиро—Уилка был выявлен ненормальный характер распределения выборки, и в дальнейшем оценку статистической значимости различий между группами проводили при помощи непараметрического U-критерия Манна—Уитни и критерия χ^2 с поправкой Йетса для непрерывной вариации. Диагностические границы — пороговый уровень АТ между нормой и патологией — определяли при помощи ROC-анализа [11]. Для определения вероятности возникновения ВППП рассчитывали величину отношения шансов (OR) [22]. Взаимосвязи между уровнями АТ и гормонами выявляли с помощью ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

Взаимосвязи антител к Вр, Es и Pg у беременных женщин

Между уровнями IgA-Вр с одной стороны и уровнями IgA-Es и IgA-Pg с другой стороны выявлены прямые корреляционные связи в обе-

их сравниваемых группах (табл. 1). При этом у женщин с ВПРП коэффициент a в уравнении линейной регрессии, описывающим зависимость уровней IgA-Pg (y) от уровней IgA-Bp (x), оказался равным 0,39, а у женщин с ФБ $a = 0,65$. Это означает, что возрастание уровней IgA-Bp у женщин с ВПРП сопровождается менее выраженным ростом IgA-Pg, чем у женщин с ФБ.

Аналогичные взаимосвязи выявлены для АТ класса G. При этом возрастание уровней IgG-Es при росте IgG-Bp при ФБ оказалось более выраженным, чем при ВПРП (коэффициенты a в уравнениях регрессии составили, соответственно, 0,94 и 0,38).

Кроме этого, выявлены высокодостоверные взаимосвязи между уровнями АТ одной специфичности, но принадлежащих к разным классам. При этом увеличение уровней IgG-Bp при возрастании уровней IgA-Bp при ВПРП оказалось более выраженным, чем при ФБ (коэффициенты a в уравнениях регрессии составили, соответственно, 0,87 и 0,49).

Ассоциации антител к Bp, Es и Pg с ВПРП

С помощью ROC-анализа рассчитали пограничные значения уровней исследуемых антител и их соотношений, по которым сравниваемые группы имели наибольшие различия (cutt-of). Результаты представлены в таблице 2. Выяснилось, что по удельному весу случаев (%) с низкими и высокими уровнями АТ группы не имели статистически значимых различий.

Значительные различия между группами обнаружены при анализе соотношения уровней исследуемых АТ. Превышение уровней IgA-Bp над уровнями IgA-Es (> 3) у женщин с ВПРП выявлялось чаще, чем при ФБ (22,8% против 11,0%; $p = 0,013$) с возрастанием OR до 2,4. Еще более выраженными ассоциации с ВПРП оказались при анализе соотношения IgA-Bp/IgA-Pg (48,5% и 12,1% соответственно, $p < 0,0001$). Превышению IgA-Bp/IgA-Pg > 3 соответствовало значение OR = 6,8. Удельный вес случаев с IgA-Es/IgA-Pg > 2 у женщин с ВПРП был также значимо выше, чем при ФБ (30,7% против 13,2%, $p = 0,0006$) с возрастанием OR до 2,9.

Повышение уровней IgG-Bp над уровнями IgG-Es в 2 раза и над уровнями IgG-Pg в 3 раза имело место при ВПРП значимо чаще, чем при ФБ с возрастанием OR до 3,5 и 2,2 соответственно. Однако высокие значения соотношения IgG-Es/IgG-Pg оказалось ассоциированным с низким показателем OR (0,4) в отличие от IgA-Es/IgA-Pg (OR = 2,9).

Взаимосвязи антител к Bp, Es и Pg с содержанием Es и Pg в сыворотке крови беременных женщин

В таблицах 3 и 4 приведены результаты регрессионного анализа взаимосвязей содержания Es и Pg, а также их соотношения (Pg/Es) с уровнями исследуемых АТ и их соотношений в сравниваемых группах.

У женщин с ФБ искомые взаимосвязи содержания гормонов с IgA-Bp и IgA-Pg отсутствовали.

ТАБЛИЦА 1. ВЗАИМОСВЯЗИ УРОВНЕЙ АНТИТЕЛ КЛАССА А И G К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ (IgA-Bp, IgA-Es, IgA-Pg И IgG-Bp, IgG-Es, IgG-Pg) У ЖЕНЩИН С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ (ФБ) И С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА (ВПРП)

TABLE 1. INTERRELATIONS OF LEVELS OF ANTIBODIES OF A CLASS A AND CLASS G TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE (IgA-Bp, IgA-Es, IgA-Pg AND IgG-Bp, IgG-Es, IgG-Pg) AT WOMEN WITH THE PHYSIOLOGICAL PREGNANCY (PhP) AND WITH THE CONGENITAL MALFORMATIONS OF FETUS (CMF)

x	y	ФБ PhP		ВПРП CMF	
		$r_s; (p)$	$y = a \times x + b$	$r_s; (p)$	$y = a \times x + b$
IgA-Bp	IgA-Es	0,72; (0,001)	$y = 0,85x + 0,2$	0,69; (< 0,0001)	$y = 0,7x - 0,1$
IgA-Bp	IgA-Pg	0,79; (< 0,0001)	$y = 0,65x + 0,3$	0,51; (< 0,0001)	$y = 0,39x + 0,3$
IgA-Es	IgA-Pg	0,84; (0,001)	$y = 0,53x + 0,8$	0,84; (< 0,0001)	$y = 0,6x + 0,2$
IgG-Bp	IgG-Es	0,76; (0,001)	$y = 0,94x + 0,4$	0,74; (< 0,0001)	$y = 0,38x + 0,8$
IgG-Bp	IgG-Pg	0,7; (< 0,0001)	$y = 0,39x + 0,4$	0,75; (< 0,0001)	$y = 0,25x + 0,5$
IgG-Es	IgG-Pg	0,77; (0,001)	$y = 0,42x + 0,3$	0,88; (0,001)	$y = 0,59x + 0,1$
IgA-Bp	IgG-Bp	0,39; (< 0,0001)	$y = 0,49x + 1,1$	0,64; (< 0,0001)	$y = 0,87x + 0,2$
IgA-Es	IgG-Es	0,65; (< 0,0001)	$y = 0,67x + 0,9$	0,77; (< 0,0001)	$y = 0,65x + 0,63$
IgA-Pg	IgG-Pg	0,58; (< 0,0001)	$y = 0,38x + 0,6$	0,77; (< 0,0001)	$y = 0,46x + 0,7$

Примечание. Здесь и далее жирным шрифтом отмечены только статистически достоверные различия между сравниваемыми группами.

Note. Hereinafter the bold print is a statistically reliable differences between the compared groups.

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) СЛУЧАЕВ С НИЗКИМИ ($\leq$) И ВЫСОКИМИ ($>$) УРОВНЯМИ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ И СООТНОШЕНИЙ ЭТИХ АНТИТЕЛ У ЖЕНЩИН С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ (ФБ) И С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА (ВППР), ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ РИСКИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ВППР (OR)

TABLE 2. QUANTITY (n) AND SPECIFIC WEIGHT (%) OF CASES WITH LOW ($\leq$) AND HIGH ($>$) LEVELS OF ANTIBODIES TO BENZO[А]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE AND RATIOS OF THESE ANTIBODIES AT WOMEN WITH THE PHYSIOLOGICAL PREGNANCY (PhP) AND WITH THE CONGENITAL MALFORMATIONS OF FETUS (CMF), THE RELATIVE RISK OF EMERGENCE OF CMF (OR)

Антитела и их соотношения Antibodies and their ratios	ФБ PhP n (%)	ВППР CMF n (%)	χ^2 (p)	OR (95% CI)
1.1. IgA-Bp ≤ 3 > 3	60 (32,9) 122 (67,1)	39 (38,6) 62 (61,4)	0,68 (0,4)	
1.2. IgA-Es ≤ 3 > 3	130 (71,4) 52 (28,6)	78 (77,2) 23 (22,8)	0,84 (0,35)	
1.3. IgA-Pg ≤ 3 > 3	140 (76,9) 42 (23,1)	88 (87,1) 13 (12,9)	3,7 (0,05)	
1.4. IgG-Bp ≤ 3 > 3	140 (76,9) 42 (23,1)	76 (75,2) 25 (24,8)	0,03 (0,86)	
1.5. IgG-Es ≤ 3 > 3	128 (70,3) 54 (29,7)	76 (75,2) 25 (24,8)	0,56 (0,4)	
1.6. IgG-Pg ≤ 2 > 2	145 (79,6) 37 (20,4)	81 (80,2) 20 (19,8)	0,002 (0,9)	
2.1. IgA-Bp/IgA-Es ≤ 3 > 3	162 (89) 20 (11)	78 (77,2) 23 (22,8)	6,11 (0,013)	0,40 (0,20-0,80) 2,40 (1,20-4,60)
2.2. IgA-Bp/IgA-Pg ≤ 3 > 3	160 (87,9) 22 (12,1)	52 (51,5) 49 (48,5)	43,9 (< 0,0001)	0,15 (0,08-0,26) 6,80 (3,80-12,40)
2.3. IgA-Es/IgA-Pg ≤ 2 > 2	158 (86,8) 24 (13,2)	70 (69,3) 31 (30,7)	11,6 (0,0006)	0,30 (0,20-0,60) 2,90 (1,60-5,30)
2.4. IgG-Bp/IgG-Es ≤ 2 > 2	162 (89) 20 (11)	70 (69,3) 31 (30,7)	15,7 (0,0001)	0,30 (0,10-0,50) 3,50 (1,60-6,70)
2.5. IgG-Bp/IgG-Pg ≤ 3 > 3	146 (80,2) 36 (19,8)	65 (64,4) 36 (35,6)	7,8 (0,0052)	0,40 (0,30-0,80) 2,20 (1,30-3,90)
2.6. IgG-Es/IgG-Pg ≤ 3 > 3	141 (77,5) 41 (22,5)	90 (89,1) 11 (10,9)	5,1 (0,02)	2,40 (1,20-4,80) 0,40 (0,20-0,80)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ли (коэффициенты корреляции r_s статистически недостоверны). Слабая отрицательная взаимосвязь обнаружена только между значениями Pg/Es и уровнями IgA-Pg ($r_s = -0,2$, $p = 0,038$). Корреляция IgA-Es с концентрацией Es оказалась слабоположительной, а с концентрацией Pg слабоотрицательной ($r_s = 0,22$ и $r_s = -0,26$ соответственно), равно как и с соотношением Pg/Es ($r_s = -0,3$).

В то же время высокодостоверные взаимосвязи средней силы обнаружены между содержанием гормонов и соотношением IgA-Bp/IgA-Es: с концентрацией Es отрицательные ($r_s = -0,45$),

с концентрацией Pg и Pg/Es — положительные ($r_s = 0,43$ и $r_s = 0,4$ соответственно). Аналогичные, но менее слабые корреляции выявлены между соотношениями IgA-Bp/IgA-Pg и Es ($r_s = -0,33$) и с Pg/Es ($r_s = 0,23$). Таким образом, совместное влияние IgA-Bp и IgA-Es на содержание половых гормонов в сыворотке крови женщин с ФБ оказалось значительным по сравнению с влиянием каждого из них по отдельности.

Аналогичные взаимосвязи выявлены и у женщин с ВППР: содержание Es и Pg, а также значения Pg/Es не коррелировали с IgA-Bp и IgA-Es по отдельности, однако концентрация Es пони-

ТАБЛИЦА 3. ВЗАИМОСВЯЗИ СОДЕРЖАНИЯ ЭСТРАДИОЛА, ПРОГЕСТЕРОНА И ИХ СООТНОШЕНИЯ (Es, Pg, Pg/Es) С УРОВНЯМИ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ И С ИХ СООТНОШЕНИЯМИ У ЖЕНЩИН С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ (ФБ)

TABLE 3. INTERRELATIONS OF CONTENTS OF ESTRADIOL, PROGESTERONE AND THEIR RATIO (Es, Pg, Pg/Es) WITH LEVELS OF ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE AND WITH THEIR RATIOS AT WOMEN WITH THE PHYSIOLOGICAL PREGNANCY (PhP)

Антитела и их соотношения (x) Antibodies and their ratios (x)	Es (y)	Pg (y)	Pg/Es (y)
	$y = a \times \ln(x) + b$ $r_s; (p)$	$y = a \times \ln(x) + b$ $r_s; (p)$	$y = a \times \ln(x) + b$ $r_s; (p)$
1.1. IgA-Bp	$y = 0,19\ln(x) + 4,8$ -0,03; (0,67)	$y = -2,3\ln(x) + 137,7$ -0,02; (0,8)	$y = -4,6\ln(x) + 75$ -0,08; (0,45)
1.2. IgA-Es	$y = 1,16\ln(x) + 4,5$ 0,22; (0,033)	$y = -12,8\ln(x) + 141$ -0,26; (0,007)	$y = -29\ln(x) + 84$ -0,3; (0,0027)
1.3. IgA-Pg	$y = 1,05\ln(x) + 4,4$ 0,2; (0,069)	$y = -1,6\ln(x) + 136,2$ -0,08; (0,39)	$y = -21,5\ln(x) + 83$ -0,2; (0,038)
1.4. IgG-Bp	$y = 1,6\ln(x) + 4$ 0,33; (0,001)	$y = -18\ln(x) + 148,6$ -0,32; (0,0008)	$y = -40,8\ln(x) + 103,6$ -0,4; (0,0002)
1.5. IgG-Es	$y = 1,3\ln(x) + 4,3$ 0,35; (0,0005)	$y = -12,9\ln(x) + 144,5$ -0,37; (0,0002)	$y = -30\ln(x) + 94,5$ -0,4; (< 0,0001)
1.6. IgG-Pg	$y = 1,3\ln(x) + 5,4$ 0,33; (0,006)	$y = -7,3\ln(x) + 139$ -0,25; (0,01)	$y = -37,6\ln(x) + 77,4$ -0,35; (0,0004)
2.1. IgA-Bp/IgA-Es	$y = -3,13\ln(x) + 5,5$ -0,45; (< 0,0001)	$y = 38,5\ln(x) + 128,2$ 0,43; (< 0,0001)	$y = 76,7\ln(x) + 63,7$ 0,4; (< 0,0001)
2.2. IgA-Bp/IgA-Pg	$y = -2,3\ln(x) + 5,3$ -0,33; (0,001)	$y = 0,42\ln(x) + 137,1$ 0,06; (0,56)	$y = 52,7\ln(x) + 70,4$ 0,23; (0,026)
2.3. IgA-Es/IgA-Pg	$y = 1,3\ln(x) + 5,1$ 0,13; (0,23)	$y = -39,2\ln(x) + 133,8$ -0,34; (0,0004)	$y = -22,6\ln(x) + 78,7$ -0,16; (0,13)
2.4. IgG-Bp/IgG-Es	$y = -1,33\ln(x) + 4,9$ -0,18; (0,08)	$y = 22,4\ln(x) + 137,2$ 0,23; (0,021)	$y = 24,4\ln(x) + 80,8$ 0,18; (0,08)
2.5. IgG-Bp/IgG-Pg	$y = 0,32\ln(x) + 4,8$ 0,01; (0,9)	$y = -25,5\ln(x) + 152,9$ -0,18; (0,07)	$y = -14,3\ln(x) + 84,3$ -0,06; (0,6)
2.6. IgG-Es/IgG-Pg	$y = 0,7\ln(x) + 4,7$ 0,12; (0,24)	$y = -24,8\ln(x) + 150$ -0,28; (0,003)	$y = -16,4\ln(x) + 83,8$ -0,14; (0,17)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

жалась, а Pg возрастала при повышении соотношения IgA-Bp/IgA-Es ($r_s = -0,4$ и $r_s = 0,3$ соответственно). Положительная средней силы взаимосвязь выявлена между соотношением Pg/Es и IgA-Bp/IgA-Es ($r_s = 0,62$, $p < 0,0001$). Положительная сильная взаимосвязь обнаружена между соотношением Pg/Es и IgA-Bp/IgA-Pg ($r_s = 0,77$, $p < 0,0001$). Таким образом, у беременных женщин с ВПП совместное влияние IgA-Bp с IgA-Es и с IgA-Pg на гормональный баланс Pg/Es оказалось значительным в отличие от каждого из них по отдельности. Вместе с тем повышение соотношений IgA-Bp/IgA-Es и IgA-Bp/IgA-Pg у женщин с ФБ сопровождалось более выраженным ростом значений Pg/Es в сыворотке крови, чем у женщин с ВПП. Об этом свидетельству-

ет разница коэффициентов регрессии: $a = 76,7$ для IgA-Bp/IgA-Es и $a = 52,7$ для IgA-Bp/IgA-Pg при ФБ против $a = 39,5$ и $a = 30,2$ при ВПП соответственно. Эта разница наглядно представлена на рисунке 1.

В отличие от АТ класса А IgG-Bp, IgG-Es и IgG-Pg каждое по отдельности коррелировали с содержанием гормонов с высокой степенью достоверности при ФБ. С Es эти взаимосвязи оказались положительными (r_s от 0,33 до 0,35), а с Pg — отрицательными (r_s от -0,25 до -0,37). Искомые корреляции соотношений исследуемых IgG-АТ с содержанием гормонов были слабыми (IgG-Bp/IgG-Es с Pg $r_s = 0,23$, $p = 0,02$), а во всех остальных случаях отсутствовали.

При ВПРП в отличие от ФБ уровни каждого из исследуемых АТ класса G не коррелировали с содержанием гормонов в сыворотке крови. В то же время соотношение IgG-Bp/IgG-Es оказалось взаимосвязанным с концентрацией Es ($r_s = -0,5$, $p = 0,0008$) и с соотношением Pg/Es ($r_s = 0,46$, $p = 0,002$). Соотношение IgG-Bp/IgG-Pg коррелировало с соотношением Pg/Es ($r_s = 0,5$, $p = 0,0009$).

Обсуждение

Участие химических генотоксикантов окружающей среды в тератогенезе не вызывает сомнений. С целью защиты организма от соединений, подобных Bp, предлагается стратегия индукции специфических, в первую очередь секреторных IgA-АТ [6, 20, 21]. Развитие этой стратегии, основанной на экспериментальных данных, оценка возможностей ее применения в клинике возможны только путем изучения функций АТ против

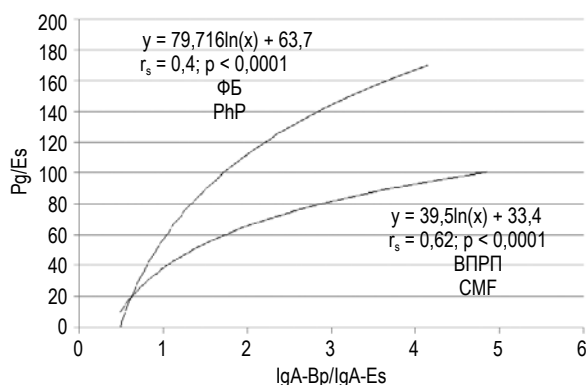


Рисунок 1. Зависимость соотношения концентрации гормонов (Pg/Es) от соотношения антител IgA-Bp/IgA-Es в сыворотке крови женщин с физиологической беременностью (ФБ) и с врожденными пороками развития плода (ВПРП)

Figure 1. Dependence of hormones ratio (Pg/Es) on IgA-Bp/IgA-Es ratio in blood serum of women with the physiological pregnancy (PhP) and with the congenital malformations of a fetus (CMF)

ТАБЛИЦА 4. ВЗАИМОСВЯЗИ СОДЕРЖАНИЯ ЭСТРАДИОЛА, ПРОГЕСТЕРОНА И ИХ СООТНОШЕНИЯ (Es, Pg, Pg/Es) С УРОВНЯМИ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ И С ИХ СООТНОШЕНИЯМИ У ЖЕНЩИН С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА (ВПРП)

TABLE 4. INTERRELATIONS OF CONTENTS OF ESTRADIOL, PROGESTERONE AND THEIR RATIO (Es, Pg, Pg/Es) WITH LEVELS OF ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE AND WITH THEIR RATIOS AT WOMEN WITH THE CONGENITAL MALFORMATIONS OF FETUS (CMF)

Антитела и их соотношения (x) Antibodies and their ratios (x)	Es (y) $y = a \times \ln(x) + b$ $r_s; (p)$	Pg (y) $y = a \times \ln(x) + b$ $r_s; (p)$	Pg/Es (y) $y = a \times \ln(x) + b$ $r_s; (p)$
1.1. IgA-Bp	$y = -1,5\ln(x) + 7,9$ -0,3; (0,08)	$y = 4,02\ln(x) + 135,3$ 0,02; (0,87)	$y = 12,9\ln(x) + 32,5$ 0,29; (0,07)
1.2. IgA-Es	$y = 0,12\ln(x) + 6,4$ -0,12; (0,4)	$y = -9,7\ln(x) + 146,7$ -0,16; (0,27)	$y = 3,9\ln(x) + 55,1$ -0,03; (0,86)
1.3. IgA-Pg	$y = 2,2\ln(x) + 6$ 0,14; (0,4)	$y = -2,8\ln(x) + 144,1$ -0,09; (0,52)	$y = -14,6\ln(x) + 61,7$ -0,32; (0,037)
1.4. IgG-Bp	$y = -0,9\ln(x) + 7,3$ -0,15; (0,34)	$y = -4,7\ln(x) + 144$ -0,17; (0,24)	$y = 3,3\ln(x) + 39,8$ 0,07; (0,67)
1.5. IgG-Es	$y = 1,15\ln(x) + 6,2$ 0,09; (0,54)	$y = -9,3\ln(x) + 143,8$ -0,2; (0,13)	$y = -12,9\ln(x) + 62,7$ -0,25; (0,11)
1.6. IgG-Pg	$y = 1,5\ln(x) + 7$ 0,19; (0,25)	$y = -3,2\ln(x) + 143,3$ -0,17; (0,23)	$y = -12,4\ln(x) + 58,4$ -0,29; (0,07)
2.1. IgA-Bp/IgA-Es	$y = -5,03\ln(x) + 7,8$ -0,4; (0,009)	$y = 22,3\ln(x) + 128,3$ 0,3; (0,043)	$y = 39,5\ln(x) + 33,4$ 0,62; (0,00004)
2.2. IgA-Bp/IgA-Pg	$y = -3,7\ln(x) + 8,3$ -0,5; (0,0004)	$y = 16,6\ln(x) + 129$ 0,25; (0,08)	$y = 30,2\ln(x) + 29,7$ 0,77; (< 0,0001)
2.3. IgA-Es/IgA-Pg	$y = -2,2\ln(x) + 7,1$ -0,4; (0,019)	$y = -6,2\ln(x) + 139,4$ -0,01; (0,9)	$y = 37,7\ln(x) + 50,6$ 0,55; (< 0,0001)
2.4. IgG-Bp/IgG-Es	$y = -5,2\ln(x) + 7,4$ -0,5; (0,0008)	$y = 13,4\ln(x) + 135,3$ 0,18; (0,18)	$y = 23,3\ln(x) + 54$ 0,46; (0,002)
2.5. IgG-Bp/IgG-Pg	$y = -2,2\ln(x) + 8$ -0,3; (0,07)	$y = 17,4\ln(x) + 125,8$ 0,19; (0,18)	$y = 26,1\ln(x) + 42,5$ 0,5; (0,0009)
2.6. IgG-Es/IgG-Pg	$y = 1,1\ln(x) + 6,1$ 0,075; (0,64)	$y = -11,1\ln(x) + 150,4$ -0,05; (0,7)	$y = 15,6\ln(x) + 50,5$ 0,2; (0,2)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

химических мутагенов у человека при различных заболеваниях, в том числе при ВПРП. В настоящей работе впервые показано, что образование IgA-Bp взаимосвязано с образованием IgA-Es и IgA-Pg у беременных женщин. Уровни сывороточных IgA-Bp (предшественников секреторных IgA-Bp) положительно коррелировали с таковыми IgA-Pg и IgA-Es с высокой степенью достоверности ($p < 0,0001$). Кроме того, содержание АТ класса А было взаимосвязано с содержанием АТ класса G к указанным гаптенам в обеих сравниваемых группах.

Сами по себе IgA-Bp, IgA-Es и IgA-Pg не были ассоциированы с ВПРП. В то же время высокие значения соотношений IgA-Bp/IgA-Es и IgA-Bp/IgA-Pg встречались в 2-4 раза чаще при ВПРП ($OR = 2,4$ и $6,8$ соответственно). Аналогичные ассоциации с ВПРП обнаружены при исследовании АТ класса G к указанным гаптенам. Высокие уровни IgG-Bp, IgG-Es и IgG-Pg встречались при ФБ с такой же частотой, как при ВПРП. Высокие значения соотношений IgG-Bp/IgG-Es и IgG-Bp/IgG-Pg были ассоциированы с высоким риском ВПРП ($OR = 3,5$ и $2,2$ соответственно). Это означает, что АТ-Вр принимают участие в тератогенезе, но только в определенной комбинации с АТ к женским половым гормонам.

Сами по себе IgA-Bp и IgA-Pg не были связаны с содержанием Es и Pg, а также с соотношением Es/Pg в сыворотке крови женщин с ФБ. Впервые выявлены слабые положительные связи IgA-Es с количеством Es в сыворотке крови, отрицательные с Pg и отрицательные с соотношением Pg/Es. В то же время взаимосвязи IgA-Bp/IgA-Es с гормонами оказались средней силы и высокодостоверными ($p < 0,0001$). Кроме того, выявлены слабые отрицательные корреляционные взаимосвязи IgA-Bp/IgA-Pg с Es и положительные с соотношением Pg/Es.

У женщин с ВПРП наблюдались аналогичные взаимосвязи. При этом коэффициенты корреляции Pg/Es и IgA-Bp/IgA-Es и IgA-Bp/IgA-Pg составили $0,62$ и $0,77$ соответственно. Характерной

особенностью иммунно-эндокринных ассоциаций оказался менее выраженный рост соотношений Pg/Es в сыворотке крови при увеличении IgA-Bp/IgA-Es у женщин с ВПРП по сравнению с ФБ.

Для АТ класса G к указанным гаптенам, в отличие от АТ класса А, оказались достоверными взаимосвязи с Es (положительные) и с Pg (отрицательные) при ФБ, но не при ВПРП. В то же время соотношения IgG-Bp/IgG-Es и IgG-Bp/IgG-Pg коррелировали с соотношением Pg/Es в сыворотке крови у женщин с ВПРП ($r_s = 0,46$ и $r_s = 0,5$), но не при ФБ.

Таким образом, одним из путей участия АТ-Вр в патогенезе ВПРП является их влияние на содержание половых гормонов, которое становится возможным только при определенных сочетаниях уровней АТ-Вр с уровнями АТ-Es и АТ-Pg. Разнонаправленный характер такого взаимодействия на эти гормоны (снижение концентрации Es и повышение концентрации Pg при повышении соотношений АТ-Вр/АТ-Es и АТ-Вр/АТ-Pg) приводит к сдвигу баланса Pg/Es в пользу Pg.

Выявленные закономерности позволяют предположить, что индукция секреторных АТ против химических мутагенов окружающей среды для профилактики генотоксических эффектов может сопровождаться образованием АТ классов А и G, специфичных к эндогенным стероидным гормонам. Совместное образование такого комплекса АТ может приводить к существенным сдвигам гормонального статуса с непредсказуемыми последствиями. Полученные знания необходимо учитывать при дальнейшей разработке стратегии иммунологической защиты человека от химических мутагенов.

Практическое значение результатов настоящего исследования состоит в расширении возможностей лабораторных методов прогнозирования возникновения ВПРП с помощью совместного иммуноанализа АТ к Вр, Es и Pg у беременных женщин.

Список литературы / References

1. Гладкова К.А., Менжинская И.В., Сухих Г.Т., Сидельникова В.М. Роль сенсibilизации к прогестерону в клинике привычного невынашивания беременности // Проблемы репродукции, 2007. № 6. С. 95-98. [Gladkova K.A., Menzhinskaya I.V., Sukhikh G.T., Sidelnikova V.M. Sensitization role of progesterone in the clinical presentation of miscarriage. *Problemy reproduksii = Problems of Reproduction*, 2007, no. 6, pp. 95-98. (In Russ.)]
2. Глушков А.Н., Красильникова К.С., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Аносов М.П., Гордеева Л.А., Попова О.С., Шаталина И.В., Шутров А.Е., Костянко М.В. Антитела к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону и генетический полиморфизм CYP1A2*1F, GST T1 и GST M1 у беременных женщин с врожденными пороками развития плода // Российский иммунологический журнал, 2012. Т. 6 (15), № 2. С.162-169. [Glushkov A.N., Krasilnikova K.S., Polenok E.G., Anosova T.P., Anosov M.P., Gordeeva L.A., Popova O.S., Shatalina I.V., Shutrov A.E., Kostyanko M.V. Antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone and polymorphisms CYP1A2*1F, GST

T1 and GST M1 in pregnant women with congenital malformation of the fetus. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2012, Vol. 6 (15), no. 2, pp. 162-169. (In Russ.)]

3. Глушков А.Н., Красильникова К.С., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А. Взаимосвязи специфических иммунных реакций на химические канцерогены и стероидные гормоны у беременных женщин // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 8 (9), № 1. С. 60-67. [Glushkov A.N., Krasilnikova K.S., Polenok E.G., Gordeeva L.A. Interrelations of specific immune reactions on the chemical carcinogens and steroid hormones in pregnant women. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 8 (9), no. 1, pp. 60-67. (In Russ.)]

4. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А., Баканова М.Л., Минина В.И., Мун С.А., Ларин С.А., Костянко М.В. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия // Российский иммунологический журнал, 2011. Т. 5 (14), № 1. С. 39-44. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Anosova T.P., Savchenko Ya.A., Bakanova M.L., Minina V.I., Mun S.A., Larin S.A., Kostyanko M.V. Serum antibodies to benzo[a]pyrene and chromosomal aberrations in lymphocytes peripheral blood at the workers of coal processing enterprise. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2011, Vol. 5 (14), no. 1, pp. 39-44. (In Russ.)]

5. Bourtourault M., Shacoori V., Guerin J., Saiag B., Rault B. Effects of simultaneous active immunization against 17 beta-estradiol and testosterone on pituitary and ovarian activity in rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1991, Vol. 72, no. 3, pp. 273-284.

6. Černohorská H., Klimešová S., Lepša L., Jinoch P., Milcová A., Schmuczerová J., Topinka J., Lábaj J. Influence of immunization with non-genotoxic PAH-KLH conjugates on the resistance of organisms exposed to benzo[a]pyrene. *Mut. Res.*, 2012, Vol. 742, no. 1-2, pp. 2-10.

7. Chang, C.F., Roberts, A.J., Reeves, J.J. Increased luteinizing hormone secretion and ovarian function in Heifers actively immunized against estrogen and progesterone. *J. Anim. Sci.*, 1987, Vol. 65 (3), pp. 771-776.

8. D'Occhio M.J., Gifford D.R., Hoskinson R.M., Weatherly T., Flavel P.F., Mattner P.E., Setchell B.P. Reproductive hormone secretion and testicular growth in bull calves actively immunized against testosterone and oestradiol-17β. *J. Reprod. Fert.*, 1987, no. 79, pp. 315-324.

9. Dray F, Csapo A., Erdos T. Effects of antibodies to estradiol-17beta and to progesterone on the placental weight and pregnancy in rats – a quantitative study. *J. Steroid Biochem.*, 1975, Vol. 6, no. 3-4, pp. 547-548.

10. Elsaesser F. Effects of active immunization against oestradiol-17 beta, testosterone or progesterone on receptivity in the female rabbit and evaluation of specificity. *J. Reprod. Fert.*, 1980, Vol. 58, no. 1, pp. 213-218.

11. Hajian-Tilaki K. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Caspian J. Intern. Med.*, 2013, Vol. 4, no. 2, pp. 627-635.

12. Hillier S.G., Groom G.V., Boyns A.R., Cameron E.H. Effects of active immunisation against steroids upon circulating hormone concentrations. *J. Steroid Biochem.*, 1975, Vol. 6, no. 3-4, pp. 529-535.

13. Itsekson A.M., Seidman D.S., Zolti M., Alesker M., Carp H.J. Steroid hormone hypersensitivity: Clinical presentation and management. *Fertil. Steril.*, 2011, Vol. 95, no. 8, pp. 2571-2573.

14. Karttunen V., Myllynen P., Prochazka G., Pelkonen O., Segerbäck D., Vähäkangas K. Placental transfer and DNA binding of benzo(a)pyrene in human placental perfusion. *Toxicol Lett.*, 2010, Vol. 197, no. 2, pp. 75-81.

15. Kaushansky A., Bauminger S., Koch Y., Lindner H.R. Endocrine and reproductive repercussions of immunization against progesterone and oestradiol in female rats. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 1977, Vol. 84, no. 4, pp. 795-803.

16. Land R.B., Morris B.A., Baxter G., Fordyce M., Forster J. Improvement of sheep fecundity by treatment with antisera to gonadal steroids. *J. Reprod. Fert.*, 1984, Vol. 66, pp. 625-634.

17. Perera F., Tang D., Whyatt R., Lederman S.A., Jedrychowski W. DNA damage from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo[a]pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from Northern Manhattan, the World Trade Center Area, Poland, and China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2005, Vol. 14, no. 3, pp. 709-714.

18. Roby R.R., Richardson R.H., Vojdani A. Hormone allergy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2006, Vol. 55, no. 4, pp. 307-313.

19. Sanyal M.K., Mercan D., Belanger K., Santella R.M. DNA adducts in human placenta exposed to ambient environment and passive cigarette smoke during pregnancy. *Birth Defects Res. A: Clin. Mol. Teratol.*, 2007, Vol. 79, no. 4, pp. 289-294.

20. Schellenberger M.T., Farinelle S., Willième S., Muller C.P. Evaluation of adjuvants for a candidate conjugate vaccine against benzo[a]pyrene. *Hum. Vaccin.*, 2011, Vol. 7, no. 1, pp. 166-173.

21. Silbart L.K., Rasmussen M.V., Oliver A.R. Immunoprophylactic intervention in chemical toxicity and carcinogenicity. *Vet. Hum. Toxicol.*, 1997, Vol. 39, no. 1, pp. 37-43.

22. Viera A.J. Odds ratios and risk ratios: what's the difference and why does it matter? *South. Med. J.*, 2008, Vol. 101, no. 7, pp. 730-734.

23. Wise T.H., Schanbacher B.D. Reproductive effects of immunizing heifers against androstenedione and oestradiol-17 β . *J. Reprod. Fert.*, 1983, no. 69, pp. 605-612.
24. Whyatt R.M., Jedrychowski W., Hemminki K., Santella M.R., Tsai W.-Y., Yang K., Perera F.P. Biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA damage and cigarette smoke exposures in paired maternal and newborn blood samples as a measure of differential susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers and Prev.*, 2001, Vol. 10, pp. 581-588.
25. Yi D., Yuan Y., Jin L., Zhou G., Zhu H., Finnell G.H., Ren A. Levels of PAH-DNA adducts in cord blood and cord tissue and the risk of fetal neural tube defects in a Chinese population. *Neurotoxicology*, 2015, Vol. 46, pp. 73-78.
26. Yuan Y., Jin L., Wang L., Li Z., Zhang L., Zhu H., Finnell R.H., Zhou G., Ren A. Levels of PAH-DNA adducts in placental tissue and the risk of fetal tube defects in a Chinese population. *Reprod. Toxicol.*, 2013, Vol. 37, pp. 70-75.

Авторы:

Глушков А.Н. — д.м.н., профессор, директор Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Красильникова К.С. — научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Поленок Е.Г. — к.фарм.н., заведующая лабораторией иммунохимии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

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

Оленникова Р.В. — врач-генетик, Медико-генетическая консультация ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С.В. Беляева», г. Кемерово, Россия

Нерсисян С.Л. — врач-генетик, Медико-генетическая консультация ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С.В. Беляева», г. Кемерово, Россия

Authors:

Glushkov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Krasilnikova K.S., Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

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

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

Olennikova R.V., Clinical Geneticist, Medical Genetics Consulting Center, Kemerovo S. Belyaev Regional Hospital, Kemerovo, Russian Federation

Nersesyan S.L., Clinical Geneticist, Medical Genetics Consulting Center, Kemerovo S. Belyaev Regional Hospital, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 24.10.2017

Отправлена на доработку 25.10.2017

Принята к печати 08.11.2017

Received 24.10.2017

Revision received 25.10.2017

Accepted 08.11.2017

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ В ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ У ЖЕНЩИН, ПРОХОДЯЩИХ ЛЕЧЕНИЕ ПО ПРОГРАММЕ ЭКО

Андреева Е.А.¹, Хонина Н.А.¹, Тихонова М.А.¹, Баторов Е.В.¹,
Пасман Н.М.², Черных Е.Р.¹

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

² ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Данная работа посвящена исследованию различных субпопуляций FoxP3⁺ регуляторных Т-клеток (Трег) в фолликулярной жидкости (ФЖ) женщин, проходивших лечение методом ЭКО, и взаимосвязи Трег с параметрами фолликуло-/оогенеза, качеством эмбрионов и исходом ЭКО. В исследование были включены 53 женщины, участвующие в программе стимуляции суперовуляции в возрасте от 25 до 46 лет. Содержание Трег в ФЖ определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител. Исследования ФЖ выявили наличие в ней FoxP3⁺Т-клеток как в популяции CD4⁺ (CD4⁺FoxP3⁺), так и CD4⁻ (CD4⁻FoxP3⁺) лимфоцитов. При этом FoxP3-клетки определяли в популяциях CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁻ лимфоцитов. Женщины с наименьшим числом фолликулов и ооцитов характеризовались наибольшим содержанием в ФЖ CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ и CD4⁻FoxP3⁺ клеток соответственно. Ретроспективный анализ также выявил сопряженность между относительным содержанием Трег и качеством ооцитов и эмбрионов. Высокий индекс оплодотворения (ИО 0,75-1,0) ассоциировался с более высоким содержанием в ФЖ CD4⁻FoxP3⁺ клеток, а высокое качество blastocyst на 5 сутки в сравнении с оппозитной группой характеризовалось более высоким содержанием в ФЖ не только CD4⁻FoxP3⁺, но и CD4⁺FoxP3⁺ клеток. При этом наступление и прогрессирование беременности также регистрировалось у женщин с наибольшим числом CD4⁻FoxP3⁺ клеток. Полученные данные свидетельствуют о наличии различных субпопуляций FoxP3⁺Т-клеток в ФЖ и их возможном участии в регуляции ранних этапов репродуктивного процесса. Особую роль среди различных субпопуляций Трег, по-видимому, играют CD4⁻FoxP3⁺Т-клетки, количество которых прямо сопряжено с эффективностью оогенеза, blastulation и наступлением клинической беременности.

Ключевые слова: бесплодие, регуляторные Т-клетки, ЭКО, фолликулярная жидкость, ооциты, беременность

Адрес для переписки:

Андреева Евгения Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru; evga_91@mail.ru

Address for correspondence:

Andreeva Evgeniya A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 228-21-01.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru; evga_91@mail.ru

Образец цитирования:

Е.А. Андреева, Н.А. Хонина, М.А. Тихонова,
Е.В. Баторов, Н.М. Пасман, Е.Р. Черных
«Регуляторные Т-клетки в фолликулярной жидкости
у женщин, проходящих лечение по программе ЭКО»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5.
С. 657-666. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-657-666
© Андреева Е.А. и соавт., 2018

For citation:

E.A. Andreeva, N.A. Khonina, M.A. Tikhonova, E.V. Batorov,
N.M. Pasman, E.R. Chernykh "Regulatory T cells in follicular
fluid of women undergoing IVF treatment", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 5,
pp. 657-666. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-657-666

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-657-666

REGULATORY T CELLS IN FOLLICULAR FLUID OF WOMEN UNDERGOING IVF TREATMENT

Andreeva E.A.^a, Khonina N.A.^a, Tikhonova M.A.^a, Batorov E.V.^a,
Pasman N.M.^b, Chernykh E.R.^a

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

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to evaluate FoxP3⁺ regulatory T cell (Treg) subsets in the follicular fluid (FF) of the women undergoing *in vitro* fertilization (IVF), and their relationships with features of folliculogenesis and oogenesis, as well as quality of embryos and retrospective assessment of IVF outcomes. The study included 53 women at the age of 25 to 46 years stimulated by superovulation. The count of Tregs in the FF samples was determined by flow cytometry using appropriate monoclonal antibodies. The FF examination revealed of FoxP3⁺ T cells from both CD4⁺ (CD4⁺FoxP3⁺) and CD4⁻ (CD4⁻FoxP3⁺) T lymphocyte subsets. Moreover, the FoxP3⁺ cells were registered in CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T lymphocyte subsets. Follicular fluid of women with a relatively small number of follicles contained higher numbers of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells, whereas a reduced number of oocytes was associated with the highest count of CD4⁻FoxP3⁺ T cells in FF. Retrospective analysis showed the a relationship between percentage of Tregs, and quality of oocytes and embryos. High fertilization index (0.75-1.0), reflecting maturity of the oocytes was associated with higher count of CD4⁻FoxP3⁺ T cells in the FF. Better quality of blastocysts was associated with a higher count of both CD4⁻FoxP3⁺ and CD4⁺FoxP3⁺ T cells. Onset and progression of pregnancies was also registered in women with relatively high counts of CD4⁻FoxP3⁺ T cells. The obtained data showed presence of different FoxP3⁺ T cell subtypes in follicular fluid, and its possible role in controlling early stages of reproductive process. CD4⁻FoxP3⁺ T cells seem to be the most important subpopulation; their counts are associated with efficacy of oogenesis, blastulation and pregnancy occurrence.

Keywords: infertility, regulatory T cells, IVF, follicular fluid, oocytes, pregnancy

Введение

За последние два десятилетия стало очевидным, что иммунная система принимает активное участие в регуляции функций яичников, контролируя стероидогенез, фолликулогенез, овуляцию, формирование и атрезию желтого тела. Ткани яичника и фолликулярная жидкость (ФЖ) содержат различные субпопуляции лейкоцитов [7], которые экспрессируют рецепторы к половым гормонам, подвержены гормональной регуляции и количественно меняются в процессе менструального цикла [1]. Среди различных популяций лимфоцитов особый интерес представляют регуляторные Т-клетки (Treg), играющие важную роль в формировании толерантности к аллоантигенам плода. При неосложненной беременности количество Treg повышено, а их снижение сопряжено с угрозой самопроизвольного прерывания беременности [2, 24] и развитием преэклампсии [27]. Наряду с важной функцией индукции и поддержания толерантности, Treg участвуют в регуляции инвазии трофобласта и ремоделировании сосудов плаценты [11]. Однако их причастность к контролю над фолликулогенезом до настоящего времени остается неизученной.

Одним из доступных источников для изучения Treg и их роли в регуляции самых ранних этапов репродуктивной функции является ФЖ, образцы которой получают при трансвагинальной пункции яичников у женщин, проходящих лечение бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). ФЖ содержит различные субпопуляции иммунокомпетентных клеток и растворимые факторы (цитокины, факторы роста, микровезикулы и ДНК), непосредственно влияющие на созревание ооцитов [3, 16, 28]. Несмотря на то, что ЭКО признается одним из наиболее успешных методов лечения бесплодия, даже в этом случае его эффективность не превышает 30-40%. Исходы ЭКО во многом зависят от степени зрелости ооцитов, эффективности оплодотворения и качества эмбрионов. С этой точки зрения анализ содержания Treg в ФЖ женщин, различающихся по данным параметрам и исходам ЭКО, может представлять интерес как в плане осмысления роли этих клеток в регуляции ранних этапов репродуктивного процесса, так и в аспекте поиска новых прогностических маркеров эффективности ЭКО.

Исследование Treg представляет определенные сложности в связи с отсутствием спец-

и физических маркеров и гетерогенностью данной популяции клеток. Treg идентифицируют как CD4⁺T-клетки с высокой экспрессией α -цепи рецептора IL-2 (CD25) [23] и внутриклеточным содержанием транскрипционного фактора FoxP3 [8, 18, 21, 25]. Однако у человека указанные маркеры не являются строго специфичными для Treg и могут экспрессироваться активированными T-клетками [22]. Рядом авторов показано, что CD4⁺FoxP3⁺ клетки, не экспрессирующие CD25-молекулы, также могут обладать супрессорной активностью [25]. Кроме того, транскрипционный фактор FoxP3 может экспрессироваться не только CD4⁺, но и CD8⁺T-клетками, которые во многом схожи с CD4⁺FoxP3⁺Treg, и их супрессорная активность нивелируется при «выключении» FoxP3⁺ [9, 15].

Учитывая вышесказанное, целью настоящей работы явилось исследование содержания различных субпопуляций FoxP3⁺T-клеток в ФЖ женщин, проходящих лечение бесплодия методом ЭКО, и анализ их взаимосвязи с параметрами фолликулогенеза, качеством эмбрионов и исходом ЭКО.

Материалы и методы

Исследуемая группа включала 53 женщины с бесплодием, проходивших лечение методом ЭКО в 2015-2017 гг. Все женщины подписывали информированное согласие на участие в иммунологических исследованиях. Возраст женщин варьировал от 25 до 42 лет, длительность бесплодия — от 0,5 года до 18 лет (табл. 1). Первичное бесплодие было диагностировано у 52%, вторичное — у 48% женщин. Причиной бесплодия в 36% случаев являлся трубно-перитонеальный фактор, в 13% — эндокринный фактор, в 15% — мужской фактор. В 36% случаев бесплодие было обусловлено сочетанием факторов. Процедура ЭКО была проведена у 47% женщин, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (IntraCytoplasmic Sperm Injection, ICSI, ИКСИ) — у 53%.

Сбор образцов ФЖ из доминантных фолликулов проводили во время трансвагинальной пункции яичников. В случае видимой контаминации образцов ФЖ кровью исследование не проводили. Образцы ФЖ центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 минут. Содержащиеся в осадке клетки криоконсервировали и хранили при температуре -80 °С. Относительное содержание субпопуляций T-клеток (CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) оценивали методом проточной цитометрии, используя анти-CD25 (FITC, BD Biosciences, США), анти-CD4 (PerCP, BD Biosciences, США), анти-FoxP3 (PE, BD Biosciences) моноклональные антитела. Фиксацию и пермеабиллизацию

клеток для оценки внутриклеточной экспрессии FoxP3 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов (CD25 и CD4); использовали коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences). Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (PerCP), (BD FACSCalibur, CellQuest Software, США) (рис. 1). В тексте относительное содержание CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺FoxP3⁺T-клеток представлено в виде процента от количества лимфоцитов, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ — в виде процента от CD4⁺T-клеток.

Индекс оплодотворения (ИО) рассчитывали по формуле: ИО = количество оплодотворенных ооцитов/количество полученных ооцитов. Оценка качества эмбриона проводилась морфологически по принятой классификации Gardner D.K. [12].

Биохимическая беременность регистрировалась при значениях хорионического гонадотропина более 5 Ед/мл на 14 день после эмбриотрансфера; клиническая — при визуализации плодного яйца в полости матки методом УЗИ на пятой неделе гестации. Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена (r_s).

Результаты

При исследовании ФЖ у женщин со стимулированной суперовуляцией выявлено наличие в ней FoxP3⁺ клеток как в популяции CD4⁺ (CD4⁺FoxP3⁺), так и CD4⁺ (CD4⁺FoxP3⁺) T-клеток. При этом FoxP3⁺ клетки выявляли среди CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁺T-лимфоцитов (рис. 1). Относительное содержание CD4⁺FoxP3⁺T-клеток составило 2,0% (1,0-3,7%), CD4⁺FoxP3⁺T-клеток — 3,0% (1,3-5,0%). Относительное количество CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-клеток составило 4,0% (2,0-6,7%) и 6,0% (3,5-8,0%) соответственно.

Сравнение относительного количества CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-клеток в группах женщин, различающихся по возрасту (< 35 и ≥ 35 лет), продолжительности бесплодия (< 3 лет, 3-6 и > 6 лет) и овариальному резерву (антимюллеров гормон < 1,0; 1-6 и > 6 нг/мл), не выявило значимых

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМОЙ ГРУППЫ (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE STUDY GROUP (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Параметры Parameters	Исследуемая группа Study group (n = 53)	Параметры Parameters	Исследуемая группа Study group (n = 53)
Возраст (лет) Age (years)	34,0 (32,0-36,5)	ФСГ (МЕ/л) на 2-4 д.ц. FSH (IU/l) by 2-4 d.c.	6,9 (5,4-9,2)
Менархе (лет) Menarche (years)	13,5 (13,0-14,0)	ЛГ (МЕ/л) by 2-4 д.ц. LH (IU/l) by 2-4 d.c.	5,0 (3,6-7,6)
Продолжительность цикла (дни) Duration of the cycle (days)	28,0 (28,0-30,0)	E₂ (пмоль/л) на 2-4 д.ц. E ₂ (pmol/l) by 2-4 d.c.	115,0 (70,5-207,0)
Длительность бесплодия (лет) Duration of infertility (years)	6,0 (3,0-10,0)	АМГ (нг/мл) AMG (ng/ml)	1,9 (1,2-3,5)
Аборты Abortions	0 (0-1,0)	ТТГ (мМЕ/л) TTG (mIU/l)	1,3 (0,9-1,7)
Количество попыток ЭКО Number of IVF attempts	1,0 (1,0-1,0)	Св. Т4 (нмоль/л) Free T4 (nmol/l)	12,4 (11,6-13,4)
Количество рожденных детей Number of children born (n = 9)	1,0 (1,0-1,0)	17-ОН прогестерон (нмоль/л) 17-OH progesterone (nmol/l)	2,7 (1,9-3,2)
М-эхо в день переноса (мм) M-echo on the day of transfer (mm)	10,7 (10,0-12,0)	Тестостерон (нмоль/л) Testosterone (nmol/l)	1,2 (0,9-2,5)
Количество фолликулов Number of follicles	9,0 (6,0-13,0)	Пролактин (мМЕ/мл) Prolactin (mIU/ml)	278 (190,0-390,0)
Количество ооцитов Number of oocytes	7,0 (4,5-10,5)		

различий в содержании исследуемых субпопуляций. Содержание CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-клеток у женщин с трубно-перитонеальным, эндокринным, мужским и сочетанным факторами бесплодия было также сопоставимо и значимо не различалось (табл. 2). Поэтому в дальнейшем изучение взаимосвязи между количеством Treg и параметрами, характеризующими созревание ооцитов, качество эмбрионов и исходы ЭКО, проводилось в общей группе пациенток.

Учитывая выраженные вариации в количестве созревших фолликулов при стимуляции суперовуляции, все женщины были разделены на 3 группы: с количеством фолликулов менее 6 (груп-

па 1), от 6 до 12 (группа 2) и более 12 (группа 3). Анализ различных субпопуляций Treg в выделенных группах показал, что образцы ФЖ женщин с наименьшим количеством фолликулов отличались более высоким содержанием CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-клеток, доля которых в группе 1 составляла 6,0% (6,0-19,0%) и была значимо выше, чем в группах 2 и 3: 5,0% (3,3-9,0%), p_u = 0,04, и 4,6% (3,3-6,0%), p_u = 0,03 соответственно (рис. 2А).

Для анализа возможной взаимосвязи Treg с количеством ооцитов, полученных при трансвагинальной пункции яичников, все женщины также были разделены на 3 группы – с числом ооцитов менее 4 (группа 1), от 4 до 8 (группа 2) и более 8 (группа 3). Образцы ФЖ женщин из груп-

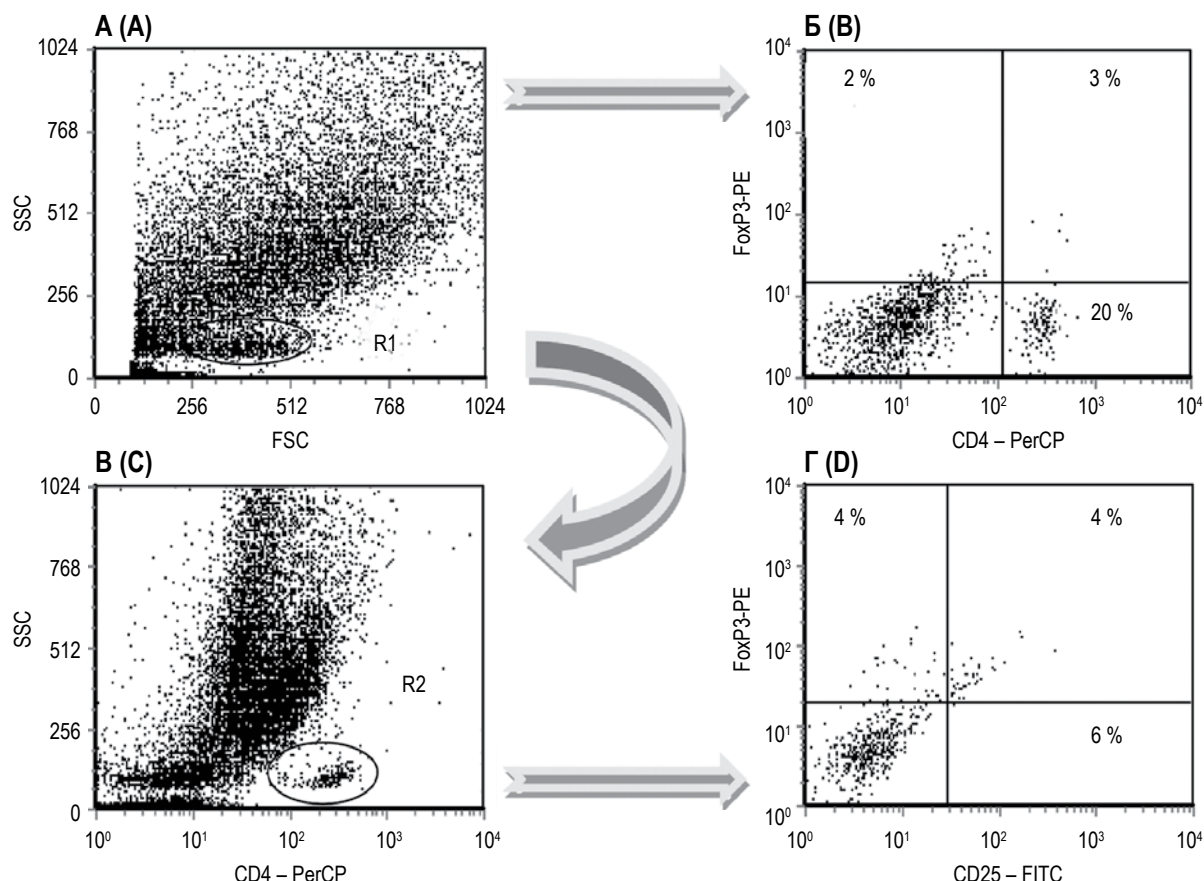


Рисунок 1. Цитометрическая характеристика популяций FoxP3⁺Т-клеток в фолликулярной жидкости женщин, проходивших лечение методом ЭКО

Примечание. На рисунке А представлено общее лимфоцитарное облако, из которого выделены: (Б) CD4⁺FoxP3⁺Т-клетки, (В) популяция CD4⁺Т-клеток и (Г) популяции CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Т-клеток. Представлены данные репрезентативной пациентки.

Figure 1. Cytometric characteristics of FoxP3⁺ T cell subtypes in the follicular fluid of women undergoing IVF treatment

Note. Figure A shows the total lymphocyte gate from which: (B) CD4⁺FoxP3⁺ T cells, (C) CD4⁺ T cell population, and (D) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cell subsets are selected. The data of a representative patient are presented.

ТАБЛИЦА 2. РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ В ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ ЖЕНЩИН С РАЗЛИЧНЫМ ГЕНЕЗОМ БЕСПЛОДИЯ (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. REGULATORY T CELLS IN THE FOLLICULAR FLUID OF WOMEN WITH INFERTILITY BY DIFFERENT ORIGIN (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Параметры Parameters	Фактор бесплодия Infertility factor			
	Группа 1 МФ Group 1 MF (n = 8)	Группа 2 ТП Group 2 TP (n = 19)	Группа 3 Эндокринный Group 3 Endocrine (n = 7)	Группа 4 Сочетанный Group 4 Combined (n = 19)
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	3,0 (1,1-3,2)	2,0 (1,0-4,0)	1,5 (1,0-4,0)	2,0 (1,0-1,4)
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	4,0 (3,0-6,0)	3,0 (1,2-7,0)	1,0 (1,0-4,0)	2,1 (1,1-4,5)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	3,0 (1,5-5,5)	5,9 (3,0-7,0)	5,0 (3,0-6,0)	4,0 (2,0-8,0)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	6,0 (3,3-9,0)	5,0 (3,5-7,0)	6,0 (4,0-7,0)	6,0 (3,4-10,0)

Примечание. Используемые сокращения: МФ – мужской фактор бесплодия; ТП – трубно-перитонеальный. Статистически значимых различий между группами не выявлено.

Note. Abbreviations used: MF, male factor of infertility; TP, tubular/peritoneal factors. Statistically significant differences between groups were not revealed.

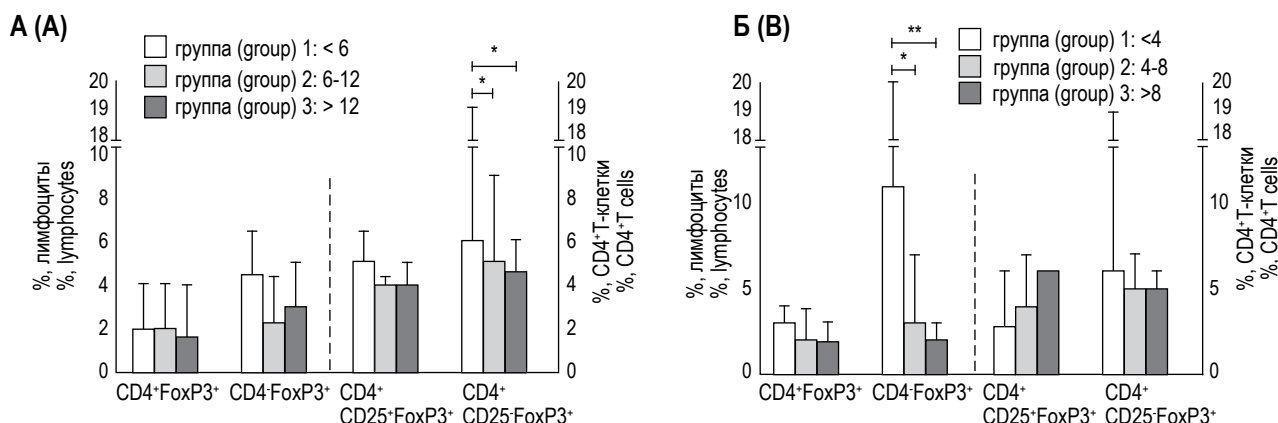


Рисунок 2. Регуляторные Т-клетки в фолликулярной жидкости женщин, проходивших лечение методом ЭКО, в группах с различным количеством фолликулов и ооцитов

Примечание. Дана характеристика относительного содержания субпопуляций Treg в фолликулярной жидкости в зависимости от количества созревших фолликулов при стимуляции суперовуляции (А): группа 1 – менее 6; группа 2 – от 6 до 12; группа 3 – более 12, и от количества ооцитов, полученных при трансвагинальной пункции яичников (Б): группа 1 – менее 4; группа 2 – от 4 до 8; группа 3 – более 8 ооцитов.

Данные представлены в виде медиан и интерквартильного диапазона. Статистическая значимость различий: * – $p_u < 0,05$, ** – $p_u < 0,01$ по U-критерию Манна-Уитни.

Figure 2. Regulatory T cells in the follicular fluid of women who underwent IVF treatment in groups with various amounts of follicles and oocytes

Note. (A) The relative counts of Treg subsets in the follicular fluid are presented depending on the number of mature follicles during stimulation of superovulation: Group 1, less than 6; Group 2, from 6 to 12; Group 3, > 12. (B) Relative counts of Treg subsets in follicular fluid are presented in dependence on the number of oocytes obtained by transvaginal ovarian puncture: Group 1, less than 4; Group 2, 4 to 8; Group 3, > 8 oocytes. The data are presented as median and interquartile range. Statistical significance of the differences: *, $p_u < 0.05$; **, $p_u < 0.01$, according to Mann-Whitney U-test.

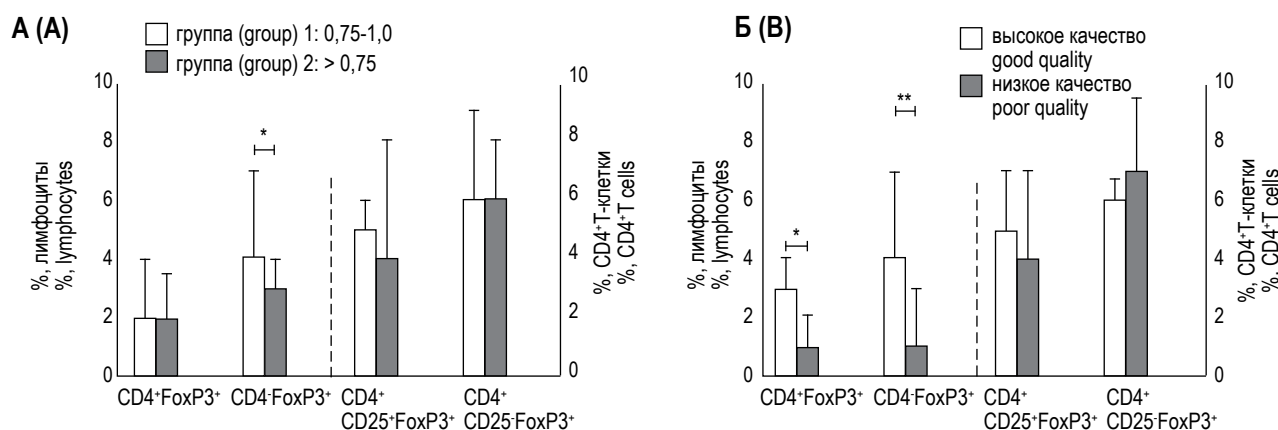


Рисунок 3. Регуляторные Т-клетки в фолликулярной жидкости женщин, проходивших лечение методом ЭКО, в зависимости от индекса оплодотворения и качества бластоцист

Примечание. Дана характеристика относительного содержания субпопуляций Treg в фолликулярной жидкости в зависимости от значения индекса оплодотворения (А): группа 1 – от 1,0 до 0,75; 2 – менее 0,75, и от качества бластоцист (Б): группа 1 – с высоким качеством; группа 2 – с низким качеством. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона. Статистическая значимость различий: * – $p_u < 0,05$, ** – $p_u < 0,01$ по U-критерию Манна-Уитни.

Figure 3. Regulatory T cells in follicular fluid of the women subjected to IVF treatment, depending on fertilization index and blastocyst quality

Note. (A) Relative counts of Treg subsets in follicular fluid are compared against the values of fertilization index: Group 1, from 1.0 to 0.75; Group 2, < 0.75. (B) Relative counts of Treg subsets in follicular fluid are presented depending and on the blastocyst quality: Group 1, with high blastocyst quality; Group 2, with low quality.

The data are presented as a median and interquartile range. Statistical significance of the differences: *, $p_u < 0.05$; **, $p_u < 0.01$, according to Mann-Whitney U-test.

ТАБЛИЦА 3. РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ В ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ ЖЕНЩИН С РАЗНЫМИ ИСХОДАМИ ЦИКЛА ЭКО (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. REGULATORY T CELLS IN FOLLICULAR FLUID OF THE WOMEN WITH VARIOUS OUTCOMES OF IVF PROCEDURE (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Параметры Parameters	Клиническая беременность Clinical pregnancy (n = 15)	Биохимическая беременность + эктопическая Biochemical pregnancy + ectopic (n = 18)	Отрицательный исход Negative outcome (n = 16)	Значимость (p _u) Statistical significance
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	2,0 (1,0-3,7)	3,0 (1,0-4,0)	1,6 (1,0-3,0)	p ₁₋₂ = 0,46 p ₁₋₃ = 0,98 p ₂₋₃ = 0,52
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	4,2 (1,6-7,0)	3,0 (2,0-4,0)	1,0 (1,0-3,0)	p ₁₋₂ = 0,83 p ₁₋₃ = 0,04 p ₂₋₃ = 0,92
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	4,0 (2,0-6,0)	4,5 (2,0-7,0)	4,5 (2,5-6,0)	p ₁₋₂ = 0,66 p ₁₋₃ = 0,74 p ₂₋₃ = 0,23
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	3,2 (2,4-4,0)	6,5 (4,0-9,0)	6,0 (4,5-9,5)	p ₁₋₂ = 0,09 p ₁₋₃ = 0,10 p ₂₋₃ = 0,72

пы 1 и 2 содержали значимо большее количество CD4⁺FoxP3⁺ клеток по сравнению с группой 3, что составило: 11,0% (2,0-20,0) vs 2,0% (1,0-3,0), p_u = 0,006 и 3,0% (1,0-7,0) vs 2,0% (1,0-3,0), p_u = 0,03 соответственно (рис. 2Б).

Поскольку полученные при пункции ооциты различались по степени зрелости и способности к оплодотворению, мы также сравнили содержание Treg в группах женщин с высоким и средним индексом оплодотворения (ИО): 0,75-1,0 и < 0,75 соответственно. Как следует из рисунка 3А, у женщин с высоким ИО по сравнению с оппозиционной группой регистрировали значимо большее число CD4⁺FoxP3⁺ клеток, что составило: 4,1% (2,0-7,0) vs 3,0% (1,0-4,0), p_u = 0,04. Количество клеток в других исследуемых субпопуляциях было сопоставимо.

На следующем этапе был проведен ретроспективный анализ содержания Treg в ФЖ в зависимости от эмбриологических показателей, то есть от качества 3-суточного и 5-суточного эмбриона. Значимых различий в содержании Treg при разном качестве эмбрионов на 3 сутки обнаружено не было. Известно, что до стадии морулы эмбрионы развиваются за счет функционирования органелл яйцеклетки, затем на 3-4 сутки происходит активация собственного генома эмбриона [17]. Данный процесс является критической точкой, так как на этой стадии от 10 до 50% эмбрионов останавливаются в дроблении. Поэтому

получение бластоцисты на пятые сутки развития дает право говорить об успешном запуске генома эмбриона. На основании показателей качества бластоцист женщины были разделены на 2 группы — с высоким качеством (классы А и В) и низким (класс С). Женщины с высоким качеством бластоцист характеризовались более высоким содержанием в ФЖ CD4⁺FoxP3⁺ и CD4⁺FoxP3⁺ клеток по сравнению с оппозиционной группой, что составило: 4,1% (2,0-7,0) vs 1,0% (1,0-3,0), p_u = 0,04 и 3,0% (1,0-4,1) vs 1,0% (1,0-2,0), p_u = 0,04 соответственно (рис. 3Б).

Качество бластоцисты является одним из основных факторов, влияющих на имплантацию эмбриона и наступление беременности. На заключительном этапе мы провели ретроспективный анализ взаимосвязи между содержанием Treg в ФЖ и исходами ЭКО в группах женщин с клинической беременностью, биохимической беременностью и отрицательными исходами (табл. 3). Относительное содержание CD4⁺FoxP3⁺ клеток в ФЖ женщин с наступившей и прогрессирующей беременностью было значимо выше, чем в ФЖ женщин с отрицательными исходами ЭКО. В то же время отсутствие биохимической и клинической беременности было ассоциировано с более высоким содержанием в ФЖ CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-клеток, хотя различия в содержании этих клеток в ФЖ женщин с клинической беременностью проявлялись в виде тренда.

Обсуждение

Известно, что регуляторные Т-клетки присутствуют во всех органах репродуктивной системы, включая яичники и эндометриальную ткань, и их количество в циркуляции меняется в динамике менструального цикла [1], свидетельствуя о возможной вовлеченности Treg в регуляцию функций яичников. Одним из доступных для исследований источников иммунных клеток в яичниках является ФЖ, содержащая различные субпопуляции лимфоцитов и моноцитов [7]. Вместе с тем данные о содержании Treg в ФЖ практически отсутствуют. В настоящей работе мы исследовали различные фенотипы FoxP3-позитивных Т-клеток и продемонстрировали присутствие в ФЖ не только CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg, но и CD4⁺FoxP3⁺Treg, не экспрессирующих молекулу CD25, а также CD4-FoxP3⁺ клеток.

Поскольку в исследование были включены женщины со стимулированной овуляцией, которые существенно различались по количеству фолликулов и ооцитов, у нас была возможность проанализировать взаимосвязь между содержанием в ФЖ различных субпопуляций Treg и фолликуло-/оогенезом. Наибольшие различия были выявлены в отношении CD4⁺FoxP3⁺T-клеток, максимальное число которых, наряду с CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-клетками, регистрировалось в группе женщин с наименьшим числом фолликулов и ооцитов, что, возможно, связано с участием данных субпопуляций Treg в контроле над созреванием ооцитов и выбраковкой незрелых клеток. Это предположение нашло подтверждение при анализе взаимосвязи между содержанием Treg и индексом оплодотворения ооцитов, отражающим зрелость ооцита и способность к оплодотворению. Так, наибольшее число CD4⁺FoxP3⁺Treg регистрировалось у женщин, ооциты которых имели высокий индекс оплодотворения. Более того, ретроспективный анализ выявил взаимосвязь между качеством 5-суточных бластоцист и содержанием в ФЖ Treg. Высокое качество бластоцист было ассоциировано с более высоким содержанием в ФЖ субпопуляций CD4⁺FoxP3⁺ и CD4-FoxP3-клеток.

Имплантация эмбриона является одним из наиболее уязвимых моментов при проведении ЭКО. Данный процесс во многом зависит от качества бластоцист и индукции толерантности к аллоантигенам плода, в формировании которой непосредственное участие принимают Treg. Учитывая при этом выявленную нами связь между качеством бластоцист и численностью Treg, мы предположили, что содержание Treg в ФЖ может в определенной степени отражать и эффективность ЭКО. Действительно, анализ между содержанием Treg в ФЖ и исходами ЭКО выявил

взаимосвязь клинической беременности с более высоким содержанием в ФЖ CD4⁺FoxP3⁺ клеток. В свою очередь, отсутствие беременности было сопряжено с более высоким содержанием в ФЖ CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-клеток.

CD4⁺FoxP3⁺T-клетки, представляющие, по всей видимости, субпопуляцию CD8⁺T-клеток с супрессорной активностью, так же как и CD4⁺FoxP3⁺Treg, экспрессируют CTLA-4, ICOS, CD25 и способны супрессировать эффекторные Т-клетки [13]. Процесс овуляции рассматривается как воспалительная реакция, при которой возрастает продукция провоспалительных цитокинов, в том числе IL-2 [20]. Поскольку CD8⁺FoxP3⁺T-клетки, в отличие от CD4⁺FoxP3⁺T-клеток, способны отвечать на низкие дозы IL-2 [6], они могут иметь пролиферативное преимущество и первыми накапливаться в ФЖ к моменту овуляции. Что же касается CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-клеток, возрастание данной субпопуляции у человека выявлено при некоторых аутоиммунных заболеваниях, и мнения исследователей в отношении природы этих клеток расходятся [14, 29]. Yang и соавт. полагают, что CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ не являются Treg и представляют недавно активированные Т-лимфоциты, транзиторно экспрессирующие FoxP3 [26]. Bonelli и соавт., напротив, полагают, что CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ клетки представляют Treg с нарушенной супрессорной активностью, так как способны ингибировать только пролиферацию Т-клеток, но не продукцию IFN γ [5]. Однако, учитывая, что активированные Т-клетки и Treg обычно экспрессируют CD25, остается неясным, чем объясняется отсутствие данной молекулы. Miyaga и соавт. при анализе коэкспрессии CD45RA предположили, что CD4⁺FoxP3⁺T-клетки включают две субпопуляции Treg, одни из которых (CD25-негативные) являются наивными клетками, а другие (CD25-позитивные) относятся к Т-клеткам памяти [19]. Возможно, что присутствующие в ФЖ CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-клетки представлены наивными Treg, обладающими меньшей супрессорной активностью [4, 10]. При таком рассмотрении можно полагать, что возрастание их численности в ФЖ компенсирует недостаточность супрессорной активности на этапе фолликулогенеза и оогенеза, однако является недостаточной для обеспечения полноценной толерантности при прогрессировании беременности.

Полученные в целом данные свидетельствуют о наличии различных субпопуляций FoxP3⁺T-клеток в ФЖ и их взаимосвязи с ранними этапами репродуктивного процесса. Различные субпопуляции Treg могут вовлекаться в регуляцию различных процессов. При этом важную роль в контроле ранних этапов репродук-

ции играют Treg, сосредоточенные в популяции CD4⁺T-клеток, которые, по-видимому, регулируют созревание ооцитов, наряду с CD4⁺FoxP3⁺-клетками детерминируют эффективную бластуляцию и участвуют в поддержании беременности.

В свою очередь, возрастание в ФЖ CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-клеток, возможно, связанное с блоком их дифференцировки в Treg с высокой супрессорной активностью, ассоциировано с отрицательными исходами ЭКО.

Список литературы / References

1. Arruvito L., Sanz M., Banham A.H., Fainboim L. Expansion of CD4⁺CD25⁺ and FOXP3⁺ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 4, pp. 2572-2578.
2. Bao S.H., Wang X.P., De Lin Q., Wang W.J., Yin G.J., Qiu L.H. Decidual CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-} regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2011, Vol. 55, pp. 94-98.
3. Basuino L., Silveira C.F. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assist. Reprod.*, 2016, Vol. 20, no. 1, pp. 38-40.
4. Bedke T., Pretsch L., Karakhanova S., Enk A.H., Mahnke K. Endothelial cells augment the suppressive function of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Regulatory T cells: Involvement of programmed death-1 and IL-10. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, pp. 5562-5570.
5. Bonelli M., Savitskaya A., Steiner C.W., Rath E., Smolen J.S., Scheinecker C. Phenotypic and functional analysis of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 3, pp. 1689-1695.
6. Boyman O., Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, pp. 180-190.
7. Bukulmez O., Arici A. Leukocytes in ovarian function. *Hum. Reprod. Update*, 2000, Vol. 6, no. 1, pp. 1-15.
8. Chakraborty S., Panda A.K., Bose S., Roy D., Kajal K., Guha D., Sa G. Transcriptional regulation of FOXP3 requires integrated activation of both promoter and CNS regions in tumor-induced CD8⁺ Treg cells. *Sci Rep.*, 2017, no. 7, Article number 1628. doi:10.1038/s41598-017-01788-z.
9. Chaput N., Darrasse-Jèze G., Bergot A.S., Cordier C., Ngo-Abdalla S., Klatzmann D., Azogui O. Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 8, pp. 4969-4978.
10. Chen W.J., Hu X.F., Yan M. Human umbilical vein endothelial cells promote the inhibitory activation of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells via PD-L1. *Atherosclerosis*, 2016, Vol. 244, pp. 108-112.
11. Du M.R., Guo P.F., Piao H.L., Wang S.C., Sun C., Jin L.P., Tao Y., Li Y.H., Zhang D., Zhu R., Fu Q. Embryonic trophoblasts induce decidual regulatory T cell differentiation and maternal-fetal tolerance through thymic stromal lymphopoietin instructing dendritic cells. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 192 (4), pp. 1502-1511.
12. Gardner D.K., Schoolcraft W.B. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 1999, Vol. 11, no. 3, pp. 307-311.
13. Churlaud G., Pitoiset F., Jebbawi F., Lorenzon R., Bellier B., Rosenzweig M., Klatzmann D. Human and mouse CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells at steady state and during interleukin-2 therapy. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, p. 171.
14. Horwitz D.A. Identity of mysterious CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells in SLE. *Arthritis Res. Ther.*, 2010, Vol. 12, no. 1, p. 101.
15. Kuniwa Y., Miyahara Y., Wang H.Y., Peng W., Peng G., Wheeler T.M., Thompson T.C., Old L.J., Wang R.F. CD8⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2007, Vol. 13, no. 23, pp. 6947-6958.
16. Kollmann Z., Schneider S., Fux M., Bersinger N.A., Wolff M. Gonadotrophin stimulation in IVF alters the immune cell profile in follicular fluid and the cytokine concentrations in follicular fluid and serum. *Hum. Reprod.*, 2017, Vol. 32, no. 4, pp. 820-831.
17. Martins W.P., Natri C.O., Rienzi L., Poel S.Z., Gracia C., Racowsky C. Blastocyst vs cleavage-stage embryo transfer: systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 2017, Vol. 49, no. 5, pp. 583-591.
18. Mei S., Tan J., Chen H., Chen Y., Zhang J. Changes of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil. Steril.*, 2010, Vol. 94, no. 6, pp. 2244-2247.
19. Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A., Parizot C., Taflin C., Heike T., Valeyre D., Mathian A., Nakahata T., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., Amoura Z., Gorochoff G., Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 2009, Vol. 30, no. 6, pp. 899-911.
20. Oakley O.R., Kim H.Y., El-Amouri I., Lin P.P., Cho J., Bani-Ahmad M., Ko C. Periovulatory leukocyte infiltration in the rat ovary. *Endocrinology*, 2010, Vol. 151, no. 9, pp. 4551-4559.
21. Ohkura N., Kitagawa Y., Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 3, pp. 414-423.
22. Rudensky A.Y. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 241, no. 1, pp. 260-268.

23. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 531-562.
24. Woidacki K., Meyer N., Schumacher A., Goldschmidt A., Maurer M., Zenclussen A.C. Transfer of regulatory T cells into abortion-prone mice promotes the expansion of uterine mast cells and normalizes early pregnancy angiogenesis. *Sci Rep.*, 2015, Report 5, 13938. doi:10.1038/srep13938.
25. Yagi H., Nomura T., Nakamura K. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int. Immunol.*, 2004, Vol. 16, no. 11, pp. 1643-1656.
26. Yang H.X., Zhang W., Zhao L.D., Li Y., Zhang F.C., Tang F.L., He W., Zhang X.: Are CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells in untreated new-onset lupus patients regulatory T cells? *Arthritis Res. Ther.*, 2009, Vol. 11, no. 5, p. R153.
27. Yu J., Qian L., Wu F., Li M., Chen W., Wang H. Decreased frequency of peripheral blood CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells correlates with IL-33 levels in pre-eclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 2017, Vol. 36, no. 2, pp. 217-225.
28. Zamah A.M., Hassis M.E., Albertolle M.E., Williams K.E. Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. *Clin. Proteomics*, 2015, Vol. 12, no. 1, p. 5.
29. Zóka A., Barna G., Somogyi A., Múzes G., Oláh Á., Al-Aissa Z., Hadarits O., Kiss K., Firneisz G. Extension of the CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺(-)/low regulatory T-cell subpopulation in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*, 2015, Vol. 48, no. 5, pp. 289-297.

Авторы:

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

Хонина Н.А. — д.м.н., врач клинический иммунолог, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Тихонова М.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

Пасман Н.М. — д.м.н., профессор, врач акушер-гинеколог, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии медицинского факультета ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет», 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:

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

Khonina N.A., PhD, MD (Medicine), Immunologist, Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Tikhonova M.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Batorov E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Pasman N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Clinical Obstetrician/Gynecologist, Head, Obstetrics and Gynecology Department, Faculty of Medicine, Novosibirsk State University, 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 04.10.2017

Отправлена на доработку 10.10.2017

Принята к печати 12.10.2017

Received 04.10.2017

Revision received 10.10.2017

Accepted 12.10.2017

ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ТРОЙНЫМ НЕГАТИВНЫМ ФЕНОТИПОМ: СВЯЗЬ С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ХИМИОТЕРАПИИ

**Черткова А.И., Славина Е.Г., Шоуа Э.К., Жукова Л.Г.,
Окружнова М.А., Нуртдинова В.А., Борунова А.А., Джгамадзе Н.Т.,
Кадагидзе З.Г.**

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

Резюме. Химиотерапия является одним из основных методов лечения распространенных форм рака молочной железы. Установлено, что клиническая эффективность различных химиопрепаратов во многих случаях зависит не только от их прямого цитостатического и/или цитотоксического действия на опухолевые клетки, но и от их способности модулировать фенотип опухолевых клеток и воздействовать на противоопухолевый иммунный ответ. При этом решающее значение имеет исходное состояние иммунной системы организма и ее реакция на проводимое лечение. В ответе на опухоль участвуют клетки врожденного и адаптивного иммунитета (NK-, NKT-, Т-клетки). Эти популяции являются гетерогенными и содержат в своем составе как клетки с противоопухолевой активностью, так и регуляторные (супрессорные) клетки, подавляющие иммунный ответ и способствующие опухолевой прогрессии. Целью настоящей работы явилось определение связи исходного состояния клеточного иммунитета больных с местно-распространенным раком молочной железы с тройным негативным фенотипом и клиническим эффектом химиотерапии (цисплатин + доксорубицин/паклитаксел), а также изучение влияния проведенного лечения на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови пациенток. Отмечался момент наступления прогрессирования заболевания, определялись общая выживаемость и выживаемость без прогрессирования. У 25 из 53 (47,2%) включенных в исследование пациенток в течение периода наблюдения (35,5 месяцев) заболевание прогрессировало. У 28 из 53 (52,8%) прогрессирования заболевания не наблюдалось. Иммунологическое обследование пациенток включало иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови и определение цитотоксической активности NK-клеток до и после химиотерапии. Определяли процентное содержание эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов. Полученные результаты показали, что до начала лечения отмечались различия в отклонениях процентного содержания клеток некоторых популяций лимфоцитов от контроля между группами без прогрессирования и с прогрессированием заболевания. Наиболее значительные различия касались NKT-клеток и лимфоцитов, экспрессирующих активационный маркер CD25. Снижение количества NKT-клеток и акти-

Адрес для переписки:

Кадагидзе Заира Григорьевна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ
115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.
Тел.: 8 (495) 324-94-74.
E-mail: kad-zaira@yandex.ru

Address for correspondence:

Kadagidze Zaira G.
N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology,
115478, Russian Federation, Moscow,
Kashirskoye highway, 24.
Phone: 7 (495) 324-94-74.
E-mail: kad-zaira@yandex.ru

Образец цитирования:

А.И. Черткова, Е.Г. Славина, Э.К. Шоуа, Л.Г. Жукова, М.А. Окружнова, В.А. Нуртдинова, А.А. Борунова, Н.Т. Джгамадзе, З.Г. Кадагидзе «Основные параметры клеточного иммунитета у больных раком молочной железы с тройным негативным фенотипом: связь с эффективностью химиотерапии» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 667–680.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-667-680

© Черткова А.И. и соавт., 2018

For citation:

A.I. Chertkova, E.G. Slavina, E.K. Shoua, L.G. Zhukova, M.A. Okruzhnova, V.A. Nurtidinova, A.A. Borunova, N.T. Dzhgamadze, Z.G. Kadagidze “The main parameters of cellular immunity in patients with triple-negative breast cancer: relationship with efficiency of chemotherapy”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 667–680. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-667-680
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-667-680

вированных CD25⁺ лимфоцитов до начала химиотерапии ассоциировалось с повышением вероятности прогрессирования заболевания. Снижение процента НКТ-клеток по отношению к контролю отмечалось у 56% больных в группе с прогрессированием заболевания (ПЗ) и только у 21,4% в группе без прогрессирования болезни (БПЗ). Отношение шансов (ОШ) = 4,6 (95% ДИ 1,4-15,4). Процент CD25⁺ лимфоцитов был снижен у 68,2% пациенток с ПЗ и у 28,6% БПЗ. ОШ = 5,4 (95% ДИ 1,6-18,1). У 26 из 53 пациенток до лечения исследовалась взаимосвязь общей выживаемости (ОВ) с процентом перфоринсодержащих НК-, НКТ- и Т-клеток и плотностью экспрессии перфорина (MFI) в этих лимфоцитах. Обнаружена положительная статистически значимая корреляция ОВ с плотностью экспрессии перфорина в клетках всех трех изученных популяций. У эффективно леченных больных после химиотерапии наблюдалась нормализация измененных до лечения показателей и повышение количества Т-клеток.

Ключевые слова: рак молочной железы (РМЖ), химиотерапия, субпопуляции лимфоцитов периферической крови, прогрессирование заболевания, общая выживаемость, выживаемость без прогрессирования

THE MAIN PARAMETERS OF CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER: RELATIONSHIP WITH EFFICIENCY OF CHEMOTHERAPY

Chertkova A.I., Slavina E.G., Shoua E.K., Zhukova L.G., Okruzhnova M.A., Nurtdinova V.A., Borunova A.A., Dzhgamadze N.T., Kadagidze Z.G.

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

Abstract. Chemotherapy is among the primary methods of treating advanced breast cancer. It was shown that clinical efficacy of various chemotherapeutic agents in many cases depends not only on their direct cytostatic and/or cytotoxic effect upon tumor cells, but also on their ability to modulate phenotype of the tumor cells and to influence anti-tumor immune response. Initial state of the immune system and its response to treatment is crucial. Antitumor response involves cells of innate and adaptive immunity (NK, NKT, T cells). These populations are heterogeneous and contain, e.g., cells with antitumor activity and regulatory (suppressor) cells that suppress immune response and promote tumor progression. The aim of this work was to determine the relationship between the initial state of cellular immunity of patients suffering from locally advanced breast cancer with triple negative phenotype, and clinical effect of chemotherapy (cisplatin + doxorubicin/paclitaxel), and studying effects of the therapy upon subpopulation profiles of peripheral blood lymphocytes in the patients. We registered the terms of the disease progression as well as overall survival and progression-free survival. The disease progressed in 25 of 53 cases (47.2%) whereas 28 of 53 patients (52.8%) remained progression-free. The observation period was 35.5 months. Laboratory examination of the patients included immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes and determination of NK cell cytotoxic activity before and after chemotherapy. Percentages of effectors and regulatory lymphocyte populations were determined. The results obtained showed that, for some lymphocyte subsets, the pre-treatment differences of cell percentage deviations from control were found between the progression-free groups and patients with progression of the disease. The differences in percentages of NKT cells and lymphocytes expressing CD25 activation marker proved to be most significant. Decreased number of NKT cells and activated CD25⁺ lymphocytes prior to chemotherapy was associated with increased probability of disease progression. Reduced percentage of NKT cells against control was observed in 56% of patients from the progression group (PD), and only 21.4% in the group free of disease progression (DF). [OR = 4.6 (95% CI 1.4 to 15.4)]. Percentage of CD25⁺ lymphocytes was decreased from 68.2% in the PD group, and 28.6% for DF patients [OR = 5.4 (95% CI 1.6-18.1)]. We studied relationships between the overall survival (OS) and percentage of perforin-containing NK, NKT, and T cells, and mean perforin fluorescence density (PFD) in these lymphocyte subsets in 26 of the 53 patients before treatment. A statistically significant positive correlation was revealed between OS and perforin PFD in all the three cell populations under study. Normalization of the parameters altered before treatment, and an increase of T cell numbers was observed in the disease-free patients.

Keywords: triple negative breast cancer, chemotherapy, peripheral lymphocyte subpopulations, disease progression, overall survival, progression-free survival

Введение

Химиотерапия является одним из основных методов лечения распространенных форм рака молочной железы (РМЖ). Установлено, что клиническая эффективность различных химиопрепаратов во многих случаях зависит не только от их прямого цитостатического и/или цитотоксического действия на опухолевые клетки, но и от их способности модулировать фенотип опухолевых клеток и воздействовать на противоопухолевый иммунный ответ. Решающее значение при этом имеет исходное состояние иммунной системы организма и ее реакция на проводимое лечение [11, 14]. В ответе на опухоль участвуют клетки врожденного и адаптивного иммунитета (NK-, NKT-, Т-клетки). Эти популяции являются гетерогенными и содержат в своем составе как клетки с противоопухолевой активностью, так и регуляторные (супрессорные) клетки, подавляющие иммунный ответ и способствующие опухолевой прогрессии [2]. В настоящее время многочисленные клинические исследования направлены на определение прогностической значимости различных популяций иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих опухоль [6, 19, 26]. В то же время иммунофенотипирование клеток периферической крови также является высокоинформативным методом и может использоваться как для анализа исходного состояния иммунитета, так и для мониторинга иммунологических показателей у пациентов в процессе лечения и при прогрессировании заболевания [22].

Целью настоящего исследования явилось определение связи между состоянием клеточного звена иммунитета (эффекторными и регуляторными лимфоцитами периферической крови) больных трижды негативным РМЖ (ТН РМЖ) и эффективностью химиотерапии цисплатином в сочетании с доксорубицином или паклитаксолом. Задачи исследования включали:

1. Определение связи между исходным количеством эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов периферической крови и отдаленными результатами лечения: прогрессированием заболевания и общей выживаемостью.

2. Определение влияния проведенной химиотерапии на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови пациенток с ТН РМЖ.

Предпринятое в работе определение взаимосвязи между состоянием иммунной системы больных ТН РМЖ до и после лечения и эффективностью противоопухолевой терапии является актуальным и может послужить основой для установления прогностических и предиктив-

ных иммунологических маркеров и для определения целесообразности введения иммунотерапии в стандартную схему лечения больных местнораспространенным ТН РМЖ.

Материалы и методы

Характеристика больных

В исследование были включены пациентки с местно-распространенным ТН РМЖ ($n = 53$) в возрасте от 21 до 69 лет (медиана 48,5 лет). Все пациентки после 4-6 курсов химиотерапии (паклитаксел 80 мг/м² 1, 8, 15 дни + цисплатин 75 мг/м², 1 день, цикл 28 дней или доксорубицин 50 мг/м² + цисплатин 60-75 мг/м², 1 день, цикл 21 день) подвергались оперативному лечению. Период наблюдения составил 35,5 месяцев.

Иммунологическое обследование

Иммунологическое обследование включало иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови (ПК) и определение цитотоксической активности NK-клеток больных ТН-РМЖ до и после химиотерапии (х/т). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом многопараметрового цитометрического анализа с использованием панели моноклональных антител, конъюгированных с FITC, PE, PC5, направленных против поверхностных и внутриклеточных маркеров лимфоцитов (BD Biosciences Becton Coulter, США; «Сорбент», Россия и eBioscience, США). Проточно-цитофлуориметрический анализ проводили на 5-параметровом проточном цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur производства компании Becton Dickinson (США). Лимфоциты выделяли по параметрам светорассеяния и экспрессии CD45. Определяли процентное содержание следующих популяций лимфоцитов: Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD8⁺CD28⁺, CD8⁺CD28⁻), активированных Т-клеток (CD3⁺HLA-DR⁺, CD4⁺CD25⁺ CD3⁺CD38⁺), естественных киллерных Т-клеток (NKT – CD3⁺CD16⁺CD56⁺), естественных киллеров (NK – CD3⁻CD16⁺CD56⁺), В-клеток, а также регуляторных CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-клеток (Treg). Оценивалось количество перфорин-содержащих NKT (CD3⁺CD16/56⁺Perforin⁺), NK (CD3⁻CD16/56⁺Perforin⁺) и Т-клеток (CD3⁺CD16/CD56⁺Perforin⁺) и плотность экспрессии перфорина в этих популяциях (средняя интенсивность флуоресценции – Mean fluorescence intensity-MFI). Определялась цитотоксическая активность (ЦТА) естественных киллеров (NK-клеток) с помощью МТТ-теста в отношении клеток К-562 [18]. Контролем (К) служили практически здоровые женщины ($n = 26$). Все паци-

ентки дали информированное согласие на проведение иммунологического обследования.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием прикладных статистических пакетов Statistica и SPSS. Характер распределения показателей определяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова (при $n \geq 50$) или критерия Шапиро–Уилка (при $n < 50$). В случае нормального распределения показателей результаты представлены в виде среднего значения и 95% доверительного интервала для среднего значения: $\bar{x}$ (95% ДИ). При распределении показателей, отличном от нормального — в виде Ме (95% ДИ). Для определения 95% ДИ для Ме использовалась «Таблица рангов ДИ для медианы» [4]. В случае нормального распределения показателей в сравниваемых группах статистическую значимость различий средних значений оценивали с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента (St) и 95% ДИ для разности средних значений. Если одна из сравниваемых групп имела распределение показателей, отличное от нормального, использовали непараметрический двусторонний U-критерий Манна–Уитни (U). В этом случае показатели в сравниваемых группах представлены в виде Ме (95% ДИ). Для установления связи между показателями в зависимости от характера распределения данных проводили корреляционный анализ Пирсона (коэффициент корреляции r) или Спирмена (коэффициент корреляции ρ). Вычисляли коэффициент детерминации и долю вариабельности переменной отклика, объясняемую вариабельностью предикторной переменной ($r^2 \times 100$). 95% ДИ для разности медиан и коэффициентов корреляции рассчитывали с помощью программы Excel в соответствии с рекомендациями Бююль А. и Цёфель П. [1]. Для анализа различия частот в группах использовали двусторонний точный критерий Фишера. Вычисляли отношение шансов (ОШ) и 95% ДИ ОШ [1]. Уровень статистической значимости был принят равным 0,05.

Результаты

Определение связи между субпопуляционным составом лимфоцитов периферической крови пациенток с ТН РМЖ до лечения и эффективностью химиотерапии

В течение периода наблюдения (35,5 мес.) из 53 включенных в исследование пациенток прогрессирование заболевания (ПЗ) диагностировано у 25 (47,2%) (группа В — ПЗ), у 28 (52,8%) прогрессирования заболевания не наблюдалось (группа А — без прогрессирования заболевания — БПЗ). Медиана ОВ составила 20,0 месяцев. Медиана ВБП — 15,3 месяца. Наблюдалась

умеренная положительная корреляция между общей выживаемостью (ОВ) и выживаемостью без прогрессирования (ВБП) [$\rho = 0,514$ (95% ДИ 0,277-0,692); $p = 0,000$]. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов ПК до начала лечения показало, что у пациенток обеих групп отмечались статистически значимые отклонения процентного содержания некоторых популяций лимфоцитов по сравнению с контролем (табл. 1 и 2). У пациенток группы А (БПЗ) был повышен процент активированных $CD3^+HLA-DR^+$ Т-клеток и $CD3^+CD16^+CD56^+NKT$ -клеток. Количество NKT-клеток в группе А было статистически значимо выше и по сравнению с группой В (ПЗ): разность между средними 4,3% (95% ДИ 1,1-7,2%), $p = 0,009$ (St). В группе А и в группе В отмечалось снижение процента $CD8^+CD28^+$ Т-лимфоцитов. У пациенток группы В отмечался также сниженный по сравнению с контролем процент активированных $CD25^+$ и $CD4^+CD25^+$ Т-клеток. Процент $CD25^+$ лимфоцитов был снижен и по сравнению с группой А: разность между медианами 3,2% (95% ДИ 0,6-5,7%), $p = 0,012$ (U). Процент регуляторных $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Т-клеток также был несколько ниже в группе с ПЗ, чем в группе БПЗ: разность между медианами 0,4% (95% ДИ 0,0-0,9%), $p = 0,040$ (U). В то же время количество этих клеток в обеих группах не отличалось от контроля. Наиболее существенные различия между группами БПЗ и с ПЗ касались NKT-клеток и активированных $CD25^+$ лимфоцитов (табл. 1 и 2). Изучение процентного содержания NKT-клеток индивидуально у каждой пациентки в обеих группах выявило снижение этого показателя по отношению к контролю у 14 из 25 (56%) больных в группе с ПЗ и только у 6 из 28 (21,4%) в группе БПЗ. Различие частот в группах было статистически значимо ($p = 0,012$). Отношение шансов (ОШ) = 4,6 (95% ДИ 1,4-15,4). Процент $CD25^+$ лимфоцитов определяли у 50 пациенток. Он был снижен у 15 из 22 (68,2%) пациенток с ПЗ и у 8 из 28 (28,6%) БПЗ. Р для различия частот = 0,000. ОШ = 5,4 (95% ДИ 1,6-18,1).

Корреляционный анализ Спирмена выявил сильную обратную корреляцию между процентом NK-клеток и процентом $CD3^+$ Т-лимфоцитов ($\rho = -0,757$ (95% ДИ от -0,855 до -0,608); $p = 0,000$; $r^2 \times 100 = 57,3\%$) и умеренную обратную корреляцию с процентом $CD3^+CD4^+$ Т-клеток [$\rho = -0,557$ (95% ДИ от -0,722 до -0,332); $p = 0,000$; $r^2 \times 100 = 31,03\%$]. Отмечалась также сильная прямая корреляция процента $CD3^+CD16^+CD56^+NK$ -клеток и $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов ($\rho = 0,766$ (95% ДИ от 0,621 до 0,860); $p = 0,000$; $r^2 \times 100 = 58,7\%$). Была обнаружена также слабая статистически значимая корреляция количества $CD38^+$ лим-

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДО ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ТН РМЖ БЕЗ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 1. PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE POPULATIONS BEFORE TREATMENT IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER PATIENTS WITHOUT DISEASE PROGRESSION

Маркеры лимфоцитов Lymphocyte markers	БПЗ Disease-free patients (n = 28)	Контроль Controls (n = 26)	95% ДИ для разности медиан или средних значений* 95% CI for difference between medians or means*	p
	Me (95% ДИ) или $\bar{x}$ (95% ДИ)* Me (95% CI) or $\bar{x}$ (95% CI)*			
	%			
CD3 ⁺	76,3 (71,5-78,7)	76,4 (69,8-78,1)	-3,0 – 4,8	0,687 U
CD4 ⁺	45,6 (42,2-49,2)*	44,3 (40,0-48,5)*	-4,2 – 6,7*	0,637 st
CD3 ⁺ CD4 ⁺	45,2 (41,6-48,8)*	43,9 (39,6-48,2)*	-4,2 – 6,7*	0,640 st
CD8 ⁺	26,9 (23,8-33,4)	23,0 (19,8-34,9)	-4,5 – 6,5	0,542 U
CD3 ⁺ CD8 ⁺	20,7 (14,4-26,8)	19,1 (14,4-21,1)	-4,7 – 5,9	0,811 U
CD3 ⁺ CD8 ⁺	5,6 (3,6-8,4)	5,4 (3,4-7,3)	-1,8 – 2,7	0,640 U
CD4/CD8	1,8 (1,3-1,9)	1,9 (1,3-2,6)	-0,6 – 0,4	0,738 U
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	9,0 (7,1-11,9)	5,9 (4,5-7,8)	0,6 – 5,4	0,013 U
CD3 ⁺ CD38 ⁺	12,5 (7,7-17,3)	9,7 (4,4-15,7)	-4,4 – 5,6	0,508 U
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	13,4 (11,4-17,7)	8,8 (6,0-10,8)	1,6 – 7,6	0,005 U
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	14,4 (108-18,3)	13,6 (10,0-21,6)	-4,3 – 4,6	0,993 U
CD19 ⁺	6,5 (5,5-9,3)	4,8 (3,4-11,8)	-2,3 – 3,2	0,424 U
CD95	58,4 (53,0-63,9)*	49,8 (43,7-56,0)*	0,6 – 16,6*	0,036 st
CD8 ⁺ CD28 ⁺	8,0 (5,9-10,2)	9,9 (8,1-13,5)	-5,3 – -0,1	0,043 U
CD8 ⁺ CD28 ⁻	15,1 (12,6-20,9)	14,4 (7,6-19,9)	-2,3 – 3,2	0,577 U
CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD8 ⁺ CD28 ⁻	0,53 (0,36-0,64)	0,71 (0,36-1,37)	-0,6 – 0,0	0,135 U
CD25 ⁺	9,3 (7,7-12,1)	10,7 (7,7-13,5)	-4,7 – 1,3	0,272 U
CD4 ⁺ CD25 ⁺	7,0 (5,9-7,9)	8,8 (6,4-11,1)	-4,3 – 0,2	0,070 U
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	0,84 (0,37-1,42)	0,38 (0,24-1,0)	-0,1 – 0,9	0,112 U
Цитотоксическая активность НК-клеток Cytotoxic activity of NK cells	42,6 (27,6-54,9)	37,5 (31,6-51,5)	-10,0 – 13,2	0,772 U

Примечание. * – $\bar{x}$ (95% ДИ); ** – 95% ДИ для разности средних значений.

Note. *, $\bar{x}$ (95% CI); **, 95% CI for difference between means.

ТАБЛИЦА 2. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДО ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ТН РМЖ С ПРОГРЕССИРОВАНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 2. PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE POPULATIONS IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER PATIENTS WITH DISEASE PROGRESSION BEFORE TREATMENT

Маркеры лимфоцитов Lymphocytes markers	ПЗ Patients with disease progression (n = 25)	Контроль Controls (n = 26)	95% ДИ для разности медиан или средних значений* 95% CI for Difference between medians or means*	P
	Me (95% ДИ) или $\bar{x}$ (95% ДИ)* Me (95% CI) or $\bar{x}$ (95% CI)*			
	%			
CD3 ⁺	74,4 (70,5-78,3)*	74,6 (72,2-77,1)*	-4,76 – 4,2*	0,905 st
CD4 ⁺	44,7 (39,8-49,6)*	44,3 (40,0-48,5)*	-5,8 – 6,8*	0,877 st
CD3 ⁺ CD4 ⁺	44,3 (39,3-49,2)*	43,9 (39,6-48,2)*	-6,0 – 6,7*	0,911 st
CD8 ⁺	22,9 (20,1-30,5)	23,0 (19,8-34,9)	-7,2 – 5,9	0,702 U
CD3 ⁺ CD8 ⁺	18,5 (13,2-25,1)	19,1 (14,4-21,1)	-5,5 – 5,9	0,893 U
CD3 ⁺ CD8 ⁺	4,5 (2,1-6,9)	5,4 (3,4-7,3)	-2,7 – 1,1	0,397 U
CD4/CD8	2,0 (1,2-2,4)	1,9 (1,3-2,6)	-0,6 – 0,57	0,939 U
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	8,2 (6,5-9,8)*	6,4 (5,3-7,5)*	-0,10 – 3,7*	0,065 st
CD3 ⁺ CD38 ⁺	9,6 (6,5-12,6)	9,7 (4,4-15,7)	-5,6 – 5,1	0,889 U
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	8,5 (6,0-11,7)	8,8 (6,0-10,8)	-3,0 – 2,8	0,948 U
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	12,1 (7,3-17,8)	13,6 (10,0-21,6)	-6,0 – 2,2	0,384 U
CD19 ⁺	6,5 (3,2-9,4)	4,8 (3,4-11,8)	-2,7 – 3,0	0,918 U
CD95	57,3 (50,4-64,2)*	49,8 (43,7-56,0)*	-1,5 – 16,5*	0,102 st
CD8 ⁺ CD28 ⁺	7,2 (5,5-9,8)	9,9 (8,1-13,5)	-5,7 – -0,5	0,029 U
CD8 ⁺ CD28 ⁻	12,6 (10,0-15,6)	14,4 (7,6-19,9)	-5,3 – 4,5	0,889 U
CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD8 ⁺ CD28 ⁻	0,47 (0,32-1,22)	0,71 (0,36-1,37)	-0,51 – 0,12	0,265 U
CD25 ⁺	6,2 (4,7-7,7)*	11,3 (9,3-13,3)*	-7,5 – -2,7*	0,000 st
CD4 ⁺ CD25 ⁺	5,0 (3,7-6,4)*	9,2 (7,5-10,8)*	-6,2 – -2,1*	0,000 st
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	0,38 (0,13-0,76)	0,38 (0,24-1,0)	-0,26 – 0,21	0,569 U
Цитотоксическая активность НК-клеток Cytotoxic activity of NK cells	44,1 (33,3-54,8)*	40,8 (33,5-48,2)*	-9,5 – 15,9*	0,608 st

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ ОБЩЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ И ВЫЖИВАЕМОСТИ БЕЗ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ С ОСНОВНЫМИ ЭФФЕКТОРНЫМИ И РЕГУЛЯТОРНЫМИ ПОПУЛЯЦИЯМИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С ТН РМЖ, А ТАКЖЕ СОДЕРЖАНИЕМ ПЕРФОРИНА В КЛЕТКАХ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ НК-КЛЕТОК

TABLE 3. CORRELATION BETWEEN OVERALL SURVIVAL AND PROGRESSION-FREE SURVIVAL, AND MAJOR EFFECTOR AND REGULATORY POPULATIONS OF LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER, AS WELL AS PERFORIN CONTENT IN THE CELLS, AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF NK CELLS

Показатель до лечения Parameter before treatment	n	Общая выживаемость Overall survival				Выживаемость без прогрессирования Disease-free survival			
		r/ρ*	95% ДИ 95% CI	r ² × 100 (%)	p	ρ*	95% ДИ 95% CI	r ² × 100 (%)	p
Положительная корреляция Positive correlation									
CD4 ⁺ , %	53	0,278	0,008 – 0,510	7,73	0,044	0,294	0,026 – 0,523	8,64	0,032
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	53	0,276	0,006 – 0,503	7,62	0,045	0,284	0,015 – 0,515	8,07	0,040
CD3 ⁺ CD16 ⁺ /CD56 ⁺ , %	53					0,279	0,009 – 0,511	7,78	0,043
Цитотоксическая активность НК-клеток, % Cytotoxic activity of NK cells, %	35	0,364	0,035 – 0,622	13,2	0,032				
Плотность экспрессии перфорина (MFI) в НК-клетках Mean fluorescence intensity (MFI) of perforin in NK cells	26	0,458	0,086 – 0,718	20,9	0,019				
Плотность экспрессии перфорина (MFI) в НКТ-клетках Mean fluorescence intensity (MFI) of perforin in NKT cells	26	0,601	0,278 – 0,802	36,1	0,001				
Плотность экспрессии перфорина (MFI) в CD3 ⁺ Т-клетках Mean fluorescence intensity (MFI) of perforin in CD3 ⁺ T cell subset	26	0,540	0,193 – 0,767	29,2	0,004				
Отрицательная корреляция Negative correlation									
CD3 ⁺ CD38 ⁺ , %	53	-0,456	-0,653 – -0,223	20,8	0,001				
CD8 ⁺ CD28 ⁻ , %	53	-0,404	-0,608 – -0,150	16,3	0,003				

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

Показатель до лечения Parameter before treatment	n	Общая выживаемость Overall survival				Выживаемость без прогрессирования Disease-free survival			
		r/ρ*	95% ДИ 95% CI	r ² × 100 (%)	p	ρ*	95% ДИ 95% CI	r ² × 100 (%)	p
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	50	-0,395	-0,616 – -0,131	15,6	0,005				
CD3 ⁺ CD16 ⁺ /CD56 ⁺ , %	53	-0,278	-0,510 до 0,008	7,73	0,044				
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	53	-0,536	-0,704 – -0,311	28,7	0,000	-0,272	-0,505 – -0,002	7,4	0,048

Примечание. * r – коэффициент корреляции Пирсона, ρ – коэффициент корреляции Спирмена.

Note. * r, Pearson correlation quotient; ρ, Spearman correlation quotient.

ТАБЛИЦА 4. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ТН РМЖ БЕЗ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 4. PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBSETS FREE TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER PATIENTS AFTER TREATMENT

Маркеры лимфоцитов Lymphocyte markers	БПЗ Disease free patients (n = 17)	Контроль Controls (n = 26)	95% ДИ для разности медиан или средних значений*	p
	Me (95% ДИ) или $\bar{x}$ (95% ДИ)* Me (95% CI) or $\bar{x}$ (95% CI)*		95% CI for difference between medians or means*	
	%			
CD3 ⁺	82,3 (79,5-85,2)	76,4 (69,8-78,1)	2,3 – 10,3	0,006 U
CD4 ⁺	51,4 (46,8-56,1)*	44,3 (40,0-48,5)*	0,9 – 13,5*	0,026 st
CD3 ⁺ CD4 ⁺	50,6 (45,6-55,6)*	43,9 (39,6-48,2)*	0,24 – 13,1*	0,042 st
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	6,5 (4,7-8,2)*	6,4 (5,3-7,5)*	-1,8 – 2,0*	0,936 st
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	8,6 (6,7-14,7)	8,8 (6,0-10,8)	-2,6 – 4,6	0,722 U
CD19 ⁺	3,3 (1,9-5,0)	4,8 (3,4-11,8)	-6,8 – -0,2	0,022 U
CD95	55,1 (45,3-65,0)*	49,8 (43,7-56,0)*	-5,3 – 15,9*	0,320 st
CD8 ⁺ CD28 ⁺	10,8 (6,7-12,7)	9,9 (8,1-13,5)	-4,3 – -2,3	0,632 U
CD25 ⁺	11,1 (8,5-13,8)*	11,3 (9,3-13,3)*	-3,3 – 3,0	0,934 st
CD4 ⁺ CD25 ⁺	9,1 (6,9-11,3)*	9,2 (7,5-10,8)*	-2,6 – 2,5	0,969 st

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 5. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ТН РМЖ С ПРОГРЕССИРОВАНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 5. PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE POPULATIONS IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER PATIENTS WITH DISEASE PROGRESSION AFTER TREATMENT

Маркеры лимфоцитов Lymphocyte markers	ПЗ Patients with disease progression (n = 14)	Контроль Controls (n = 26)	95% ДИ для разности медиан или средних значений* 95% CI for difference between medians or means*	p
	Ме (95% ДИ) или $\bar{x}$ (95% ДИ)* Me (95% CI) or $\bar{x}$ (95% CI)*			
	%			
CD3 ⁺	83,8 (59,2-88,9)	76,4 (69,8-78,1)	-1,2 – 12,5	0,063 U
CD4 ⁺	47,8 (41,4-54,0) *	44,3 (40,0-48,5)*	-3,7 – 10,6	0,329 st
CD3 ⁺ CD4 ⁺	47,4 (41,0-53,8)*	43,9 (39,6-48,2)*	-3,7 – 10,7	0,336 st
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	8,8 (6,2-11,4)*	6,4 (5,3-7,5)*	-0,32 – 5,2	0,080 st
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	7,4 (5,8-17,0)	8,8 (6,0-10,8)	-3,0 – 2,5	0,922 U
CD19 ⁺	4,3 (3,0-9,0)	4,8 (3,4-11,8)	-6,4 – 1,7	0,566 U
CD95	52,7 (42,4-63,0)*	49,8 (43,7-56,0)*	-8,0 – 13,7	0,595 st
CD8 ⁺ CD28 ⁺	6,9 (4,3-10,8)	9,9 (8,1-13,5)	-6,4 – -0,6	0,014 U
CD25 ⁺	7,8 (5,2-10,5)*	11,3 (9,3-13,3)*	-6,6 – -0,26	0,035 st
CD4 ⁺ CD25 ⁺	6,6 (4,3-8,9)*	9,2 (7,5-10,8)*	-5,2 – 0,035	0,053 st

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

фоцитов с CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регуляторными Т-клетками [$p = 0,480$ (95% ДИ от 0,233 до 0,669); $p = 0,000$; $r^2 \times 100 = 23,0\%$].

Определение значения исходного уровня изученных иммунологических показателей для ОВ пациенток с ТН РМЖ выявило умеренную статистически значимую отрицательную корреляцию между ОВ и исходным процентом CD3⁺CD38⁺Т-клеток и CD3⁺CD8⁺НК-клеток, а также процентом регуляторных CD8⁺CD28⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ популяций лимфоцитов (табл. 3). У 26 из 53 пациенток проанализирована взаимосвязь ОВ с процентом перфоринсодержащих НК-, НКТ- и Т-клеток и плотностью экспрессии перфорина (MFI) в этих лимфоцитах. Обнаружена положительная статистически значимая корреляция ОВ с плотностью экспрессии перфорина в клетках всех трех изученных популяций. Результаты представлены в таблице 3. Различий в процентном содержании пер-

форин-позитивных клеток в составе НК-, НКТ- и Т-лимфоцитов между группами больных БПЗ, с ПЗ и контролем обнаружено не было. Статистически значимой корреляции ОВ и ВБП с этими показателями также не наблюдалось (данные не представлены). Цитотоксическая активность НК-клеток в обеих группах не отличалась от контроля (табл. 1 и 2).

Влияние химиотерапии на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови больных ТН РМЖ

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов ПК после химиотерапевтического лечения проводилось у 31 пациентки (17 пациенток БПЗ – группа С и 14 с ПЗ – группа D). Несмотря на меньшее число пациенток, включенных в эту часть исследования, полученные результаты показали, что в группах С и D до лечения отмечались статистически значимые отклонения от контроля процентного содержания клеток

практически тех же популяций, что и в группах А и В. До лечения у пациенток в группе С (БПЗ, $n = 17$), как и в группе А ($n = 29$), было повышено количество НКТ-клеток как по сравнению с контролем, так и по сравнению с группой D [Ме (95% ДИ) гр. С: 13,2% (11,3-18,2%); К: 8,8% (6,0-10,8%); $p_{с,к} = 0,033$; гр. D: 6,8% (3,6-16,9%); $p_{с,д} = 0,040$], и снижено количество $CD8^+CD28^+$ -клеток [Ме (95% ДИ); гр. С: 7,6% (5,2-9,7%), К: 9,9% (8,1-13,5%); $p = 0,014$]. У больных группы D (с ПЗ; $n = 14$), как и в группе В ($n = 25$), наблюдалось снижение процента $CD8^+CD28^+$ -клеток [Ме (95% ДИ) гр. D: 7,3% (4,3-10,8%); К: 9,9% (8,1-13,5%); $p = 0,048$] и активированных $CD25^+$ [$\bar{x}$ (95% ДИ) гр. D: 5,7% (3,7-7,8%), К: 11,3% (9,3-13,3%); $p = 0,000$] и $CD4^+CD25^+$ лимфоцитов [$\bar{x}$ (95% ДИ) гр. D: 4,8% (2,9-6,7%), К: 9,2% (7,5-10,8%); $p = 0,001$]. После проведенной химиотерапии у пациенток БПЗ (гр. С) статистически значимо повысилось количество $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD3^+CD4^+$ -клеток по сравнению с контролем. Наблюдалась также нормализация процентного содержания НКТ- и $CD8^+CD28^+$ -лимфоцитов: количество НКТ-клеток снизилось, а $CD8^+CD28^+$ -лимфоцитов повысилось до контрольного уровня. Снизилось также количество В-клеток (табл. 4). У больных в группе с ПЗ (гр. D) после лечения процент $CD4^+CD25^+$ -клеток повысился до нормы, в то же время количество активированных $CD25^+$ лимфоцитов и $CD8^+CD28^+$ -клеток и после лечения было статистически значимо ниже, чем в контроле (табл. 5). Количество клеток всех остальных определявшихся в работе популяций не отличалось от контроля ни до, ни после лечения.

Обсуждение

Проведенные исследования показали, что у включенных в исследование больных местно-распространенным ТН РМЖ еще до начала лечения наблюдались статистически значимые отклонения процентного содержания некоторых популяций лимфоцитов от контроля. При этом они в основном были различны у пациенток БПЗ и с ПЗ. Наиболее значительные различия касались НКТ-клеток и активированных $CD25^+$ лимфоцитов, процент которых был статистически значимо выше у больных БПЗ, чем в контрольной группе и чем у пациенток с ПЗ. Снижение количества НКТ-клеток до лечения имело неблагоприятное прогностическое значение: у пациенток со сниженным до лечения процентом НКТ-клеток вероятность прогрессирования заболевания оказалась в 4,6 выше (95% ДИ 1,4-15,4), чем у больных с повышенным или нормальным количеством этих лимфоцитов. Наблюдалась также слабая положительная корреляция

количества НКТ-клеток с ВБП: $\rho = 0,279$ (95% ДИ 0,009-0,511); $p = 0,043$ и средняя положительная корреляция плотности экспрессии перфорина в этих лимфоцитах с ОВ: $\rho = 0,601$ (95% ДИ 0,278-0,802); $p = 0,001$; ($r^2 \times 100 = 36,1\%$). Таким образом, благоприятным фактором являлось не только повышение количества НКТ-клеток ПК до лечения, но и уровень экспрессии перфорина в каждой НКТ-клетке. После химиотерапии количество НКТ-клеток у пациенток БПЗ снизилось до контрольных значений.

В настоящее время определяют два основных типа НКТ-клеток: НКТ-клетки I типа и НКТ-клетки II типа. Оба типа НКТ-клеток играют важную регуляторную роль при аутоиммунных заболеваниях, воспалении и опухолевом росте и могут оказывать как стимулирующее, так и ингибиторное влияние на эти процессы [27]. Согласно современным представлениям о функционировании НКТ-клеток, при злокачественных новообразованиях, НКТ-клетки I типа (iNKT — инвариантные) в большей степени проявляют противоопухолевую активность, а НКТ-клетки II типа участвуют в стимуляции опухолевого роста. [9, 27]. Наиболее хорошо изучены НКТ-клетки I типа. В клинических исследованиях было установлено, что исходное количество iNKT-клеток ПК при некоторых злокачественных опухолях может коррелировать с прогнозом заболевания. По данным Metelitsa и соавт. [16] и Schneiders и соавт. [23], повышение количества этих клеток в ПК до лечения имеет положительное значение для клинической эффективности противоопухолевой терапии и может ассоциироваться с увеличением общей выживаемости, по сравнению с больными с исходно низким уровнем показателя. В то же время снижение количества iNKT-клеток может иметь неблагоприятное прогностическое значение при некоторых формах рака [17]. В экспериментальных исследованиях и при некоторых опухолях человека было обнаружено, что НКТ-клетки II типа могут подавлять противоопухолевый иммунный ответ, используя различные механизмы, включающие взаимодействие с другими популяциями клеток-супрессоров [9].

В данной работе мы определяли популяцию НКТ-клеток по экспрессии основных, наиболее часто используемых при исследовании этих лимфоцитов, маркеров: $CD3$, $CD16$ и $CD56$ ($CD3^+CD16^+CD56^+$), которые не дают возможности установить их тип (I или II). Причины обнаруженного в настоящем исследовании повышения количества НКТ-клеток ПК и характер их функционирования у части пациенток с ТН РМЖ до лечения не ясны. Однако оно являлось благоприятным фактором: количество НКТ-клеток

было повышено главным образом у больных БПЗ. Ранее мы обнаружили у пациенток с первично операбельным раком молочной железы зависимость процента $CD3^+CD16^+CD56^+NKT$ -клеток от стадии заболевания: у больных с 1 и 2 стадиями процент этих клеток был статистически значимо выше по сравнению с донорами и больными с 3 стадией [3]. В то же время обнаруженное в данном исследовании снижение этого показателя до лечения, имело неблагоприятное прогностическое значение.

В дополнительном исследовании было проведено определение значения исходного количества NKT -клеток для непосредственных результатов лечения, таких как степень лечебного патоморфоза опухоли (ЛПО). Мы не обнаружили статистически значимой корреляции процента NKT -клеток со степенью ЛПО: $p = 0,111$ (95% ДИ от $-0,182$ до $0,386$); $p = 0,437$ и различий между группами с высокой (3-4) и низкой степенью ЛПО (1-2), а также с контролем: Ме (95% ДИ) 11,9% (9,1-14,3%); 10,4% (3,3-16,9%); 8,8% (6,0-10,8%); $p = 0,584$; 0,156; 0,756 соответственно. Таким образом, количество $CD3^+CD56^+CD16^+NKT$ -клеток ПК до начала лечения, по-видимому, имеет значение в большей степени для отдаленных результатов терапии.

У больных в группе БПЗ после химиотерапии увеличился процент $CD3^+T$ -клеток, главным образом за счет увеличения $CD4^+T$ -лимфоцитов. Количество $CD3^+CD8^+T$ -клеток было в пределах контрольных значений у пациенток обеих групп и до, и после лечения. Отмечалась статистически значимая положительная корреляция исходного количества $CD4^+T$ -клеток (слабая), а также плотности экспрессии перфорина в $CD3^+CD16^+CD56^+T$ -клетках (средняя) с ОБ. Таким образом, уровень экспрессии перфорина в T -клетках (т.е. функциональный потенциал T -клеток) имел, по-видимому, большее значение, чем количество этих клеток в ПК (табл. 3). $CD4^+T$ -клетки являются одной из важнейших популяций иммунокомпетентных клеток, участвующих в противоопухолевом иммунном ответе. По данным Trédan и соавт. [28] и Péron и соавт. [21], исходное количество $CD4^+$ клеток в периферической крови может являться независимым прогностическим фактором при различных злокачественных опухолях. Они продемонстрировали, что снижение количества этих лимфоцитов коррелирует с прогрессивным течением заболевания и с уменьшением общей выживаемости больных метастатическим раком молочной железы, лимфомой, миеломой, саркомой и другими формами опухолей. Таким образом, обнаруженное нами повышение $CD3^+CD4^+T$ -лимфоцитов в ПК больных ТН РМЖ после лечения, по-видимому, имеет по-

ложительное значение, что доказывается увеличением их числа только у пациенток БПЗ.

Исходное снижение количества активированных $CD25^+$ лимфоцитов и $CD4^+CD25^+T$ -клеток было обнаружено только у больных с ПЗ. Молекула $CD25$, являясь рецептором $IL-2$, играет ключевую роль в запуске пролиферативного ответа T -лимфоцитов. Снижение этого показателя может указывать на нарушение способности лимфоцитов (в частности, $CD4^+CD25^+T$ -клеток) больных с ПЗ к пролиферации и дифференцировке [7, 10]. На отрицательное значение снижения исходного процента активированных $CD25^+$ лимфоцитов у больных ТН РМЖ указывает и связанное с ним повышение вероятности прогрессирования заболевания в 5,4 раза по сравнению с больными, имеющими нормальные или повышенные значения показателя.

Важной эффекторной популяцией врожденного иммунитета являются естественные киллеры (НК-клетки). Известно, что они способны контролировать рост некоторых опухолей, а также могут регулировать функцию других иммунокомпетентных клеток: макрофагов, дендритных и эндотелиальных клеток, B - и T -лимфоцитов [8]. В данном исследовании была обнаружена сильная отрицательная корреляция количества $CD3^+T$ -клеток с количеством НК-клеток до лечения, что может указывать на компенсаторное взаимоотношение двух основных линейных популяций ПК. Наблюдалась статистически значимая положительная корреляция ОБ с исходным уровнем перфорина в $CD3^+CD16^+CD56^+NK$ -клетках. В то же время обнаруженная отрицательная ассоциация ОБ с исходным количеством $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов может указывать на то, что субпопуляция НК-клеток, экспрессирующих маркер $CD8$, может являться негативным фактором у больных местно-распространенным ТН РМЖ. Отрицательная корреляция ОБ с исходным процентом $CD3^+CD16^+CD56^+NK$ -клеток может быть обусловлена $CD3^+CD8^+NK$ -клетками. Отмечалась сильная прямая корреляция процента $CD3^+CD16^+CD56^+NK$ -клеток (вся популяция естественных киллеров) и $CD3^+CD8^+NK$ -клеток [$p = 0,766$; $r^2 \times 100 = 58,7\%$].

Была обнаружена также отрицательная ассоциация между ОБ и исходным количеством двух регуляторных популяций лимфоцитов: $CD8^+CD28^+T$ -клеток и $CD4^+CD25^+FoxP3^+Treg$. $CD8^+T$ -лимфоциты являются основной эффекторной популяцией адаптивного иммунитета и основными клетками-эффекторами противоопухолевого иммунитета. Однако, известно, что популяция $CD3^+CD8^+T$ -клеток является гетерогенной и включает в свой состав не только клетки-эффекторы, но и регуляторные (супрессорные

клетки). Описаны различные фенотипические варианты супрессорных CD8⁺T-лимфоцитов. Наиболее часто их описывают как CD8⁺T-клетки, не экспрессирующие основной коактивационный рецептор CD28 (CD8⁺CD28⁻) [12]. Ряд авторов продемонстрировал, что у пациентов со злокачественными опухолями повышение количества этих клеток в периферической крови и в опухолевой ткани может коррелировать с плохим прогнозом заболевания [13, 24, 25]. Известно, что CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg могут играть при злокачественных опухолях двойную роль: участвовать как в стимуляции опухолевого роста, так и в его торможении. Однако в большинстве случаев повышение их количества в периферической крови и опухолевом микроокружении коррелирует с плохим прогнозом заболевания [29, 30]. Таким образом, в настоящем исследовании повышение количества клеток этих регуляторных популяций (CD8⁺CD28⁻ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-клеток) до лечения имело неблагоприятное прогностическое значение у пациенток с местно-распространенным ТН РМЖ. В то же время при сравнении групп в зависимости от прогрессирования заболевания оказалось, что процент регуляторных CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T-клеток до лечения был несколько выше у больных в группе БПЗ, чем в группе с ПЗ: разность между медианами 0,4% (95% ДИ 0,0-0,9%), $p = 0,040$ U. Однако результаты, несмотря на статистическую значимость различия, следует оценивать как неоднозначные, так как нижняя граница 95% ДИ разности медиан равна нулю. К тому же количество этих клеток в обеих группах не отличалось от контроля. Отрицательная ассоциация ОВ с Т-лимфоцитами, экспрессирующими многофункциональную молекулу CD38⁺, может быть связана с высокой экспрессией CD38 на CD4⁺ и CD8⁺ регуляторных Т-клетках [5, 15, 20].

Заключение

Полученные в настоящем исследовании результаты позволяют предположить, что как эф-

фекторные, так и регуляторные популяции лимфоцитов в той или иной степени оказывают влияние (положительное или отрицательное) на эффективность химиотерапии цисплатином в сочетании с доксорубицином или паклитакселем у больных ТН-РМЖ. При этом большое значение для отдаленных результатов лечения (прогрессирование заболевания, общая выживаемость, выживаемость без прогрессирования) имеет исходное состояние иммунной системы пациенток. Полученные при корреляционном анализе коэффициенты детерминации для статистически значимых коэффициентов корреляции для каждой отдельной популяции были невысоки. Однако при иммунном ответе на опухоль иммунокомпетентные клетки действуют совместно, и каждая популяция лимфоцитов непосредственно сама или опосредованно через другие популяции клеток, в той или иной степени, вносит свой вклад в регуляцию опухолевого роста и эффективность лечения. Следует учесть, что наиболее значимые для прогноза заболевания популяции иммунокомпетентных клеток могут различаться в зависимости от нозологической формы рака, а также у индивидуальных пациентов даже в случае одного и того же варианта опухоли. Повидимому, в обеспечении непосредственных и отдаленных результатов лечения также могут участвовать различные популяции лимфоцитов. В связи с этим для определения прогностических и предиктивных факторов и для разработки индивидуальных подходов к лечению онкологических пациентов следует проводить комплексное изучение клеточного звена иммунитета в каждом конкретном случае. При этом необходимо исследовать одновременно достаточное число популяций иммунокомпетентных клеток (эффекторные и регуляторные популяции), так как прогностическое значение может иметь не одна определенная популяция, а их сочетание и соотношение.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Бюль А., Цёфель П. SPSS: Искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей. Пер. с нем. СПб.: ДиаСофтЮП, 2005. 608 с. [Bühl A., Zöfel P. SPSS Version 10. Einführung in die modern datenanalyse unter Windows. Addison-Wesley]. St. Petersburg: DiaSoftYUP, 2005. 608 p.
2. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И. Иммунная система и рак // Практическая онкология, 2016. Т. 17, № 2. С. 62-73. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I. Immunity and cancer. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*, 2016, Vol. 17, no. 2, pp. 62-73. (In Russ.)]
3. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А., Славина Е.Г. Основные субпопуляции регуляторных лимфоцитов у больных злокачественной меланомой и раком молочной железы // Иммунология, 2014. Т. 35, № 2. С. 64-67. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Zabolotina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A., Slavina E.G. The main subpopulation regulatory lymphocytes in patients with malignant melanoma and breast cancer. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no. 2, pp. 64-67. (In Russ.)].

4. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 217 с. [Petrie A., Sabin C. Medical statistics at a glance. John Wiley and Sons Limited]. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 217 p.
5. Bahri R., Bollinger A., Bollinger T., Orinska Z., Bulfone-Paus S. Ectonucleotidase CD38 demarcates regulatory, memory-like CD8(+) T cells with IFN-gamma-mediated suppressor activities. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 9, e45234. doi: 10.1371/journal.pone.0045234.
6. Balermipas P., Rödel F., Rödel C., Krause M., Linge A., Lohaus F., Baumann M., Tinhofer I., Budach V., Gkika E., Stuschke M., Avlar M., Grosu A.L., Abdollahi A., Debus J., Bayer C., Stangl S., Belka C., Pigorsch S., Multhoff G., Combs S.E., Mönnich D., Zips D., Fokas E. CD8⁺ tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: A multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG). *Int. J. Cancer*, 2016, Vol. 138, no. 1, pp. 171-181.
7. Benczik M., Gaffen S.L. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol. Invest.*, 2004, Vol. 33, no. 2, pp. 109-142.
8. Crouse J., Xu H.C., Lang P.A., Oxenius A. NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 1, pp. 49-58.
9. Dhodapkar M.V., Kumar V. Type II NKT cells and their emerging role in health and disease. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 3, pp. 1015-1021.
10. Ellery J.M., Nicholls P.J. Possible mechanism for the alpha subunit of the interleukin-2 receptor (CD25) to influence interleukin-2 receptor signal transduction. *Immunol. Cell Biol.*, 2002, Vol. 80, no. 4, pp. 351-357.
11. Emens L.A., Middleton G. The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol. Res.*, 2015, Vol. 3, no. 5, pp. 436-443.
12. Filaci G., Fravega M., Negrini S., Procopio F., Fenoglio D., Rizzi M., Brenzi S., Contini P., Olive D., Ghio M., Setti M., Accolla R.S., Puppo F., Indiveri F. Nonantigen specific CD8⁺ T suppressor lymphocytes originate from CD8⁺CD28⁻ T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Hum. Immunol.*, 2004, Vol. 65, no. 2, pp. 142-156.
13. Karagöz B., Bilgi O., Gümüş M., Erikçi A.A., Sayan O., Türken O., Kandemir E.G., Öztürk A., Yaylaci M. CD8⁺CD28⁻ cells and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients. *Med. Oncol.*, 2010, Vol. 27, no. 1, pp. 29-33.
14. Kepp O., Senovilla L., Kroemer G. Immunogenic cell death inducers as anticancer agents. *Oncotarget*, 2014, Vol. 5, no. 14, pp. 5190-5191.
15. Krejci J., Casneuf T., Nijhof I.S., Verbist B., Bald J., Plesner T., Syed K., Liu K., van de Donk N.W., Weiss B.M., Ahmadi T., Lokhorst H.M., Mutis T., Sasser A.K. Daratumumab depletes CD38⁺ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*, 2016, Vol. 128, no. 3, pp. 384-394.
16. Metelitsa L.S., Wu H.-W., Wang H., Yang Y., Warsi Z., Asgharzadeh S., Groshen S., Wilson S.B., Seeger R.C. Natural killer T cells infiltrate neuroblastomas expressing the chemokine CCL2. *J. Exp. Med.*, 2004, Vol. 199, no. 9, pp. 1213-1221.
17. Molling J.W., Langius J.A., Langendijk J.A., Leemans C.R., Bontkes H.J., van der Vliet H.J., von Blumberg B.M., Scheper R.J., van den Eertwegh A.J. Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2007, Vol. 25, no. 7, pp. 862-868.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Meth.*, 1983, Vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63.
19. Okabe M., Toh U., Iwakuma N., Saku S., Akashi M., Kimitsuki Y., Seki N., Kawahara A., Ogo E., Itoh K., Akagi Y. Predictive factors of the tumor immunological microenvironment for long-term follow-up in early stage breast cancer. *Cancer Sci.*, 2017, Vol. 108, no. 1, pp. 81-90.
20. Patton D.T., Wilson M.D., Rowan W.C., Soond D.R., Okkenhaug K. The PI3K p110delta regulates expression of CD38 on regulatory T cells. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 3, e17359. doi:10.1371/journal.pone.0017359.
21. Péron J., Cropet C., Tredan O., Bachelot T., Ray-Coquard I., Clapisson G., Chabaud S., Philip I., Borg C., Cassier P., Labidi Galy I., Sebban C., Perol D., Biron P., Caux C., Menetrier-Caux C., Blay J.Y. CD4 lymphopenia to identify end-of-life metastatic cancer patients. *Eur. J. Cancer*, 2013, Vol. 49, no. 5, pp. 1080-1089.
22. Rühle P.F., Fietkau R., Gaipf U.S., Frey B. Development of a modular assay for detailed immunophenotyping of peripheral human whole blood samples by multicolor flow cytometry. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 8, pii: E1316. doi: 10.3390/ijms17081316.
23. Schneiders F.L., de Bruin R.C., van den Eertwegh A.J., Scheper R.J., Leemans C.R., Brakenhoff R.H., Langendijk J.A., Verheul H.M., de Gruijl T.D., Molling J.W., van der Vliet H.J. Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up. *J. Clin. Oncol.*, 2012, Vol. 30, no. 5, pp. 567-570.
24. Shen Y., Qu Q.X., Zhu Y.B., Zhang X.G. Analysis of CD8⁺CD28⁻ T-suppressor cells in gastric cancer patients. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2012, Vol. 33, no. 2, pp. 149-155.
25. Song G., Wang X., Jia J., Yuan Y., Wan F., Zhou X., Yang H., Ren J., Gu J., Lysterly H.K. Elevated level of peripheral CD8(+)CD28(-) T lymphocytes are an independent predictor of progression-free survival in patients with metastatic breast cancer during the course of chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013, Vol. 62, no. 6, pp. 1123-1130.

26. Stanton S.E., Disis M.L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J. Immunother. Cancer*, 2016, Vol. 4, p. 59.
27. Terabe M., Berzofsky J.A. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv. Cancer Res.*, 2008, Vol. 101, pp. 277-348.
28. Trédan O., Manuel M., Clapisson G., Bachelot T., Chabaud S., Bardin-dit-Courageot C., Rigal C., Biota C., Bajard A., Pasqual N., Blay J.Y., Caux C., Ménétrier-Caux C. Patients with metastatic breast cancer leading to CD4⁺ T cell lymphopaenia have poor outcome. *Eur. J. Cancer*, 2013, Vol. 49, no. 7, pp. 1673-1682.
29. Whiteside T.L. The role of regulatory T cells in cancer immunology. *Immunotargets Ther.*, 2015, Vol. 4, pp. 159-171.
30. Wolf D., Sopper S., Pircher A., Gastl G., Wolf A.M. Treg(s) in cancer: friends or foe? *J. Cell. Physiol.*, 2015, Vol. 230, no. 11, pp. 2598-2605.

Авторы:

Черткова А.И. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Славина Е.Г. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Шоуа Э.К. — врач, лаборатория клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Жукова Л.Г. — д.м.н., ведущий научный сотрудник отделения химиотерапии и комбинированного лечения злокачественных опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Окружнова М.А. — к.м.н., младший научный сотрудник отделения хирургического № 13 торако-абдоминального отдела (клинических биотехнологий) ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Нуртдинова В.А. — биолог, лаборатория клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Борунова А.А. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Джгамадзе Н.Т. — научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кадагидзе З.Г. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клинической иммунологии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Chertkova A.I., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Slavina E.G., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Shoua E.K., Physician, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Zhukova L.G., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Chemotherapy and Combined Cancer Treatment, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Okuzhnova M.A., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Department of Clinical Biotechnology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Nurtdinova V.A., Biologist, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Borunova A.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Dzhgamadze N.T., Research Associate, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Kadagidze Z.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Clinical Cancer Immunology, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Поступила 09.10.2017
Принята к печати 10.10.2017

Received 09.10.2017
Accepted 10.10.2017

ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИЙ РЕСУРС ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ОПУХОЛЯХ И ПРЕДРАКОВЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Михайлова Е.С.^{1,2}, Вараксин Н.А.³, Архипов С.А.^{1,2}, Голованова А.В.¹,
Студеникина А.А.¹, Аутеншлюс А.И.^{1,2}

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

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск, Россия

³ АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Резюме. В настоящее время в группу предраковых поражений протоков молочной железы, согласно Международному агентству по изучению рака, включена только протоковая карцинома *in situ*. Однако, исходя из данных литературы, помимо протоковой карциномы *in situ*, к предраковым изменениям можно отнести склерозирующий аденоз, внутрипротоковые пролиферативные поражения и радиальный рубец. Многообразие как доброкачественных, так и злокачественных процессов в молочной железе, особенности роста новообразований и возраст пациентов требуют новых подходов к изучению процесса канцерогенеза в молочной железе. Исходя из известной роли цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований, целью исследования явилась оценка цитокинпродуцирующего ресурса иммунокомпетентных клеток крови при злокачественных, доброкачественных заболеваниях и предраковых изменениях молочной железы. Для оценки цитокинпродуцирующего ресурса иммунокомпетентных клеток крови пациентов изучали индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками крови пациентов с инвазивным протоковым раком, являющимся по гистологическому типу аденокарциномой (I группа), и пациентов с незлокачественными новообразованиями молочной железы (II группа). В дальнейшем пациенты с незлокачественными новообразованиями молочной железы были разделены на группу только с фиброаденомой и мастопатией (III группа) и на группу, в которую вошли пациенты с предраковыми заболеваниями — склерозирующим аденозом и межпротоковыми пролифератами (IV группа). С помощью твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрацию IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1β, IL-1ra, TNFα, IFNγ, G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1. При сравнении I и II групп были получены более высокие индексы влияния поликлональных активаторов на продукцию G-CSF и GM-CSF у пациентов с инвазивным протоковым раком. Более высокие значения при сравнении индексов влияния поликлональных активаторов на продукцию цитокинов пациентов I и III групп были получены у больных с инвазивным протоковым раком по продукции IL-2, G-CSF и GM-CSF, а у пациентов с фиброаденомой и мастопатией — по продукции IL-18 и TNFα. При сравнении пациентов I и IV групп были получены более высокие индексы влияния поликлональных активаторов только на продукцию IL-1ra, G-CSF и VEGF при инвазивном протоковом раке.

Адрес для переписки:

Михайлова Елена Семеновна
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный
медицинский университет»
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52.
Тел./факс: 8 (383) 226-35-60.
E-mail: lpciip@211.ru

Address for correspondence:

Mikhailova Elena S.
Novosibirsk State Medical University
630091, Russian Federation, Novosibirsk, Krasny ave, 52.
Phone/Fax: 7 (383) 226-35-60.
E-mail: lpciip@211.ru

Образец цитирования:

Е.С. Михайлова, Н.А. Вараксин, С.А. Архипов,
А.В. Голованова, А.А. Студеникина, А.И. Аутеншлюс
«Цитокинпродуцирующий ресурс иммунокомпетентных
клеток крови при опухолях и предраковых изменениях
молочной железы» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20,
№ 5. С. 681–690. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-681-690
© Михайлова Е.С. и соавт., 2018

For citation:

E.S. Mikhailova, N.A. Varaksin, S.A. Arkhipov, A.V. Golovanova,
A.A. Studenikina, A.I. Autenshlyus "Cytokine-producing resource
of immunocompetent blood cells in breast tumors and precancerous
changes of mammary gland", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 681–690.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-681-690
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-681-690

При сравнении индексов влияния поликлональных активаторов на продукцию цитокинов III и IV групп были получены более высокие показатели у пациентов с доброкачественными изменениями по следующим цитокинам: IL-8, IL-18, IL-1 β , IL-1ra и TNF α . Более низкие индексы влияния поликлональных активаторов на продукцию ряда цитокинов пациентов с предраковыми изменениями по сравнению с пациентами со злокачественными и доброкачественными опухолями молочной железы не свидетельствуют о снижении функциональной активности иммунокомпетентных клеток крови, а обусловлены высоким уровнем спонтанной продукции цитокинов при склерозирующем аденозе и межпротоковых пролифератах.

Ключевые слова: цитокины, иммунокомпетентные клетки крови, опухоли, предраковые изменения молочной железы

CYTOKINE-PRODUCING RESOURCE OF IMMUNOCOMPETENT BLOOD CELLS IN BREAST TUMORS AND PRECANCEROUS CHANGES OF MAMMARY GLAND

Mikhaylova E.S.^{a, b}, Varaksin N.A.^c, Arkhipov S.A.^{a, b}, Golovanova A.V.^a, Studenikina A.A.^a, Autenshlyus A.I.^{a, b}

^a Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

^b Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

^c JSC "Vector-Best", Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. At present, only ductal carcinoma *in situ* is included into the group of precancerous lesions of mammary ducts, according to International Agency for the Study of Cancer. However, based on recent publications, in addition to ductal carcinoma *in situ*, sclerosing adenosis, intraductal proliferative lesions and radial scar may be also attributed to precancerous changes. A variety of both benign and malignant events in mammary gland, the features of neoplastic growth and age of the patients require new approaches to study of carcinogenic events in mammary gland. As based on the known role of cytokines in genesis of malignancies, the aim of the study was to evaluate the cytokine-producing resource of immunocompetent blood cells in malignant, benign and precancerous mammary disorders. To assess the cytokine-producing resource of immunocompetent blood cells in the patients, we studied quantitative effects of polyclonal activators upon production of cytokines by immunocompetent blood cells of patients with invasive ductal cancer representing a histological type of adenocarcinoma (group I), and patients with non-malignant breast neoplasias (group II). At subsequent step, the patients with non-malignant neoplasms of the breast were divided into a subgroup of patients with only fibroadenoma and mastopathy (group III), and a group which included patients with precancerous diseases, i.e., sclerosing adenosis and interductal proliferates (group IV). Concentrations of IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1ra, TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF, and MCP-1 were determined by solid-phase enzyme immunoassay. When comparing groups I and II, we revealed higher influence of polyclonal activators upon production of G-CSF and GM-CSF in patients with invasive ductal cancer. When comparing the influence of polyclonal activation for cytokine production in patients of I and III groups, higher values were registered in patients with invasive ductal cancer (production of IL-2, G-CSF, and GM-CSF), and in patients with fibroadenoma and mastopathy (IL-18, and TNF α production). When comparing patients of groups I and IV, higher indexes of the polyclonal activator effects were found only for IL-1ra, G-CSF, and VEGF production in invasive ductal cancer. When comparing the indexes of polyclonal activator influence upon cytokine production of groups III and IV, higher values were obtained in patients with benign changes for the following cytokines: IL-8, IL-18, IL-1 β , IL-1ra and TNF α , in contrast to patients with sclerosing adenosis and proliferates. The lower indexes of polyclonal activating effects upon the production of a number of cytokines in patients with precancerous changes, as compared to patients with malignant and benign breast tumors, do not indicate a decreased functional activity of immunocompetent blood cells. However, those may be due to high level of spontaneous cytokine production in sclerosing adenosis and interductal proliferates.

Keywords: cytokines, blood immunocompetent cells, tumors, precancerous changes, mammary gland

Введение

Опухоли молочной железы, согласно международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), подразделяют на злокачественные (C50 – номер в МКБ-10), в том числе инвазивный протоковый рак, и доброкачественные (D24 – номер в МКБ-10), к которым относят аденому. Помимо этого, среди болезней молочной железы выделяют группу доброкачественных дисплазий (N60 – номер в МКБ-10). К последним относят кисту, диффузную кистозную мастопатию, фиброаденоз (склерозирующий аденоз), фибросклероз, эктазию протоков и другие дисплазии молочной железы (радиальный рубец). Согласно классификации Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer), в группу предраковых поражений протоков молочной железы включена протоковая карцинома *in situ* [15].

В то же время некоторые авторы относят к предраковым изменениям и склерозирующий аденоз, встречающийся достаточно редко [8, 17]. Также существенную роль в канцерогенезе играют радиальный рубец, который является стартовой площадкой для развития тубулярной карциномы [2], и внутрипротоковые пролиферативные поражения, повышающие риск развития рака молочной железы от 1,27 до 10,35 раза в зависимости от их формы [4, 7, 9, 11]. Таким образом, исходя из данных литературы, помимо протоковой карциномы *in situ*, к предраковым изменениям можно отнести склерозирующий аденоз, внутрипротоковые пролиферативные поражения и радиальный рубец.

Многообразие как доброкачественных, так и злокачественных процессов в молочной железе, особенности роста новообразований и возраст пациентов требуют новых подходов к изучению процесса канцерогенеза в молочной железе.

Исходя из современных представлений о роли цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований [1], **целью исследования** явилась оценка цитокинпродуцирующего ресурса иммунокомпетентных клеток крови при злокачественных, доброкачественных заболеваниях и предраковых изменениях молочной железы.

Материалы и методы

Для оценки цитокинпродуцирующего ресурса иммунокомпетентных клеток (ИКК) крови при злокачественных, доброкачественных заболеваниях и предраковых изменениях молочной железы изучали влияние поликлональных активаторов на продукцию цитокинов ИКК крови пациентов с инвазивным протоковым раком

(ИПР), являющимся по гистологическому типу аденокарциномой – I группа (n = 54), пациентов с незлокачественными новообразованиями молочной железы – II группа (n = 29), включающая фиброаденому (ФАМ) (n = 15), мастопатию (n = 6), и пациентов с предраковыми изменениями молочной железы: со склерозирующим аденозом и межпротоковыми пролифератами (n = 8). Диагноз устанавливался врачом-онкологом и врачом-патологоанатомом. Ни у кого из пациентов не было обострения очагов хронической инфекции. В дальнейшем II группа была разделена на группу III (n = 21), в которую вошли пациенты только с ФАМ и мастопатией, и на группу IV (n = 8), в которую вошли пациенты с предраковыми изменениями. Забор венозной крови у всех исследуемых пациентов осуществляли до оперативного вмешательства.

Цитокинпродуцирующий ресурс ИКК крови определяли с помощью комплекса поликлональных активаторов (ПА), состоящего из фитогемагглютинаина в концентрации 4 мкг/мл, конканавалина А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарида в концентрации 2 мкг/мл. В исследовании использовали стандартизованный набор реагентов «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ» производства АО «Вектор-Бест». Одну часть клеток крови пациента инкубировали в питательной среде DMEM-F12 (для определения спонтанной продукции), а другую – в таком же объеме среды при 37 °C в течение 24 ч с комплексом ПА для определения индуцированной им продукции цитокинов, после чего клетки осаждали центрифугированием при 900 g, в течение 15 мин, получали супернатант, в котором с помощью твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрацию IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1ra, TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1 с использованием наборов реагентов производства АО «Вектор-Бест».

Цитокинпродуцирующий ресурс оценивали по индексу влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию цитокинов ИКК крови, который высчитывали по формуле: ИВПА = А/Б, где А – концентрация в супернатанте цитокина после инкубации клеток крови с ПА, а Б – концентрация цитокина в супернатанте клеток крови без стимуляции ПА (спонтанная продукция).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни при помощи программного пакета Statistica v. 6.0. Показатели выражали в виде медианы – Me, нижнего и верхнего квартилей (Q_{0,25}–Q_{0,75}).

Результаты и обсуждение

ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови пациентов с ИПР – I группа и пациентов с незлокачественными заболеваниями молочной железы – II группа, включающая ФАМ, мастопатию, склерозирующий аденоз, межпротоковые пролифераты, представлены в таблице 1. Как видно из таблицы, I и II группы пациентов достоверно отличались только по двум показателям ИВПА: G-CSF и GM-CSF. При этом важно отметить, что показатель ИВПА на продукцию G-CSF и GM-CSF в группе пациентов со злокачественной опухолью в несколько раз превышал таковой по сравнению с показателями группы II.

Полученные данные указывают на то, что цитокинпродуцирующий ресурс иммунокомпетентных клеток крови при злокачественных и незлокачественных новообразованиях молочной железы отличается только по показателям ростовых факторов G-CSF и GM-CSF, которые, как известно, продуцируются как ИКК крови, так и клетками микроокружения опухоли [5, 6].

Это свидетельствует о том, что ИКК крови обладающая повышенным потенциальным ресурсом продукции ростовых факторов G-CSF и GM-CSF при ИПР, попадая через кровеносное русло в опухоль, стимулируют злокачественную прогрессию, чего не отмечается при доброкачественной патологии молочной железы.

В таблице 2 представлены результаты исследования цитокинпродуцирующего ресурса иммунокомпетентных клеток при сравнении показателей ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови в I группе и в группе с доброкачественными заболеваниями молочной железы, в которую были включены только пациенты с ФАМ и мастопатией – III группа. Как видно из таблицы 2, рассматриваемые группы достоверно отличались по 5 показателям ИВПА на продукцию IL-2, IL-18, TNF α , G-CSF и GM-CSF. При этом наиболее выраженные достоверные различия были выявлены при сравнении ИВПА на продукцию GM-CSF – ростового фактора, продуцируемого в основном моноцитами и гранулоцитами крови. Необходимо отметить, что ИВПА на продукцию

ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЯ ИВПА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИНВАЗИВНЫМ ПРОТОКОВЫМ РАКОМ И ПАЦИЕНТОВ С НЕЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. INDEX VALUES OF POLYCLONAL ACTIVATOR INFLUENCE (IVPA) UPON CYTOKINE PRODUCTION BY BLOOD IMMUNOCOMPETENT CELLS OF PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA AND PATIENTS WITH NON-MALIGNANT BREAST TUMORS (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокины Cytokines	I группа Group I	II группа Group II	Достоверность различий (p) Significance of differences
	ИВПА, Index values of polyclonal activator influence	ИВПА Index values of polyclonal activator influence	
IL-2	8,65 (4,80-15,80)	8,55 (3,30-12,85)	0,4499
IL-6	59,95 (20,81-179,27)	61,45 (27,17-186,08)	0,9432
IL-8	24,15 (6,00-60,80)	18,83 (7,77-35,75)	0,5400
IL-10	35,68 (16,60-59,18)	42,92 (20,97-70,58)	0,2321
IL-17	28,20 (12,20-57,50)	24,85 (12,40-60,70)	0,6451
IL-18	1,26 (1,10-1,50)	1,29 (1,16-1,50)	0,4614
IL-1 β	31,400 (14,50-78,90)	26,43 (13,98-52,96)	0,2844
IL-1ra	12,65 (8,50-16,30)	10,86 (6,38-15,88)	0,3948
TNF α	51,45 (15,30-139,10)	65,24 (25,94-163,55)	0,3156
IFN γ	291,30 (69,90-622,70)	190,45 (24,05-358,35)	0,3638
G-CSF	58,50 (20,10-277,50)	20,90 (2,75-89,33)	0,0043
GM-CSF	17,55 (7,70-28,55)	6,90 (2,76-17,05)	0,0079
VEGF	2,59 (1,80-3,38)	1,99 (1,36-2,74)	0,1502
MCP-1	1,28 (0,50-2,70)	1,04 (0,31-1,51)	0,2573

G-CSF и GM-CSF были повышены при злокачественной патологии по сравнению с показателями пациентов группы III, так же как и при сравнении ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови пациентов I группы с показателями ИВПА II группы (табл. 1). Кроме того, был выявлен более высокий ИВПА на продукцию IL-2 пациентов I группы по сравнению с аналогичным показателем пациентов III группы. Известно, что IL-2, взаимодействуя с рецептором на клеточной мембране, приводит к активации тирозинкиназ Janus (Jak1, Jak3), которые регулируют транскрипцию генов, контролирующих клеточный цикл, организацию цитоскелета, пролиферацию и предотвращение апоптоза, а клетки многих опухолей способны экспрессировать рецептор к IL-2, что сопровождается повышением их пролиферативной активности, большей агрессивностью и плохим прогнозом [3, 16]. Также исключение из группы с незлокачественной патологией пациентов со склерозирующим аденозом и межпротоковыми пролифератами привело к появлению достоверных различий по показателю продукции

IL-18 ИКК крови пациентов с ИПР, по сравнению с группой пациентов с ФАМ и мастопатией. IL-18 принимает участие в процессе ангиогенеза, увеличивая миграцию эндотелиальных клеток, а также повышает продукцию VEGF [12]. Кроме того, появилось различие по ИВПА на продукцию ИКК крови TNF α между сравниваемыми выше группами пациентов, который был более высоким у пациентов с доброкачественной патологией молочной железы.

Выделение из II группы больных с ФАМ и мастопатиями в самостоятельную III группу привело к получению достоверных различий по ИВПА на продукцию ряда цитокинов, которые не были обнаружены ранее при сравнении данных I и II групп. В связи с этим особый интерес представляло проведение сравнения цитокинпродуцирующего ресурса ИКК крови в I группе с показателями группы пациентов со склерозирующим аденозом и межпротоковыми пролифератами — IV группа, которые некоторые исследователи относят к предраковым изменениям в молочной железе.

ТАБЛИЦА 2. ЗНАЧЕНИЯ ИВПА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИНВАЗИВНЫМ ПРОТОКОВЫМ РАКОМ И ПАЦИЕНТОВ С ФИБРОАДЕНОМОЙ И МАСТОПАТИЕЙ (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. INDEX VALUES OF POLYCLONAL ACTIVATOR INFLUENCE (IVPA) UPON CYTOKINE PRODUCTION BY BLOOD IMMUNOCOMPETENT CELLS OF PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA AND PATIENTS WITH FIBROADENOMA AND MASTOPATHY (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокины Cytokines	I группа Group I	II группа Group II	Достоверность различий (p) Significance of differences
	ИВПА Index values of polyclonal activator influence	ИВПА Index values of polyclonal activator influence	
IL-2	8,65 (4,80-15,80)	5,00 (2,00-13,80)	0,0489
IL-6	59,95 (20,81-179,27)	90,71 (51,34-223,01)	0,2290
IL-8	24,15 (6,00-60,80)	32,95 (19,76-62,25)	0,3108
IL-10	35,68 (16,60-59,18)	51,30 (22,16-86,10)	0,1441
IL-17	28,20 (12,20-57,50)	21,60 (9,75-55,25)	0,3326
IL-18	1,26 (1,10-1,50)	1,40 (1,29-1,65)	0,0234
IL-1 β	31,40 (14,50-78,90)	37,67 (18,79-66,66)	0,6624
IL-1ra	12,65 (8,50-16,30)	10,94 (8,78-15,43)	0,7951
TNF α	51,45 (15,30-139,10)	90,31 (46,25-248,48)	0,0314
IFN γ	291,30 (69,90-622,70)	63,85 (13,00-490,65)	0,1670
G-CSF	58,50 (20,10-277,50)	31,52 (2,09-121,51)	0,0220
GM-CSF	17,55 (7,70-28,55)	5,25 (1,35-21,65)	0,0053
VEGF	2,59 (1,80-3,38)	2,37 (1,55-3,24)	0,8119
MCP-1	1,28 (0,50-2,70)	1,17 (0,81-2,25)	0,9411

ТАБЛИЦА 3. ЗНАЧЕНИЯ ИВПА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИНВАЗИВНЫМ ПРОТОВОКОВЫМ РАКОМ И ПАЦИЕНТОВ СО СКЛЕРОЗИРУЮЩИМ АДЕНОЗОМ И МЕЖПРОТОВОКОВЫМИ ПРОЛИФЕРАТАМИ (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. INDEX VALUES OF POLYCLONAL ACTIVATOR INFLUENCE (IVPA) UPON CYTOKINE PRODUCTION BY BLOOD IMMUNOCOMPETENT CELLS OF PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA AND PATIENTS WITH SCLEROSING ADENOSIS AND INTERDUCTAL PROLIFERATES (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Цитокины Cytokines	I группа Group I	IV группа Group IV	Достоверность различий (p) Significance of differences
	ИВПА Index values of polyclonal activator influence	ИВПА Index values of polyclonal activator influence	
IL-2	8,65 (4,80-15,80)	9,37 (4,00-12,20)	0,7500
IL-6	59,95 (20,81-179,27)	53,41 (18,36-118,64)	0,3316
IL-8	24,15 (6,00-60,80)	10,20 (4,92-16,45)	0,0620
IL-10	35,68 (16,60-59,18)	33,24 (20,85-58,46)	0,8794
IL-17	28,20 (12,20-57,50)	22,55 (12,40-44,70)	0,5142
IL-18	1,26 (1,10-1,50)	1,21 (1,11-1,33)	0,6482
IL-1 β	31,40 (14,50-78,90)	18,22 (11,41-31,35)	0,0865
IL-1ra	12,65 (8,50-16,30)	7,60 (4,15-11,45)	0,0267
TNF α	51,45 (15,30-139,10)	32,62 (12,81-114,37)	0,7045
IFN γ	291,30 (69,90-622,70)	288,77 (34,95-358,35)	0,6600
G-CSF	58,50 (20,10-277,50)	16,08 (8,64-33,84)	0,0158
GM-CSF	17,55 (7,70-28,55)	10,39 (4,26-25,55)	0,1182
VEGF	2,59 (1,80-3,38)	1,82 (1,36-2,15)	0,0407
MCP-1	1,28 (0,50-2,70)	0,50 (0,27-1,39)	0,0751

ТАБЛИЦА 4. ЗНАЧЕНИЯ ИВПА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НЕЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 4. INDEX VALUES OF POLYCLONAL ACTIVATOR INFLUENCE (IVPA) UPON CYTOKINE PRODUCTION BY BLOOD IMMUNOCOMPETENT CELLS OF PATIENTS WITH NON-MALIGNANT BREAST TUMORS (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Цитокины Cytokines	III группа Group III	IV группа Group IV	Достоверность различий (p) Significance of differences
	ИВПА Index values of polyclonal activator influence	ИВПА Index values of polyclonal activator influence	
IL-2	5,00 (2,00-13,80)	9,37 (4,00-12,20)	0,3440
IL-6	90,71 (51,34-223,01)	53,41 (18,36-118,64)	0,1074
IL-8	32,95 (19,76-62,25)	10,20 (4,92-16,45)	0,0056
IL-10	51,30 (22,16-86,10)	33,24 (20,85-58,46)	0,2191
IL-17	21,60 (9,75-55,25)	22,55 (12,40-44,70)	0,8650
IL-18	1,40 (1,29-1,65)	1,21 (1,11-1,33)	0,0217
IL-1 β	37,67 (18,79-66,66)	18,22 (11,41-31,35)	0,0423
IL-1ra	10,94 (8,78-15,43)	7,60 (4,15-11,45)	0,0457
TNF α	90,31 (46,25-248,48)	32,62 (12,81-114,37)	0,0332
IFN γ	63,85 (13,00-490,65)	288,77 (34,95-358,35)	0,2437
G-CSF	31,52 (2,09-121,51)	16,08 (8,64-33,84)	0,1000
GM-CSF	5,25 (1,35-21,65)	10,39 (4,26-25,55)	0,4667
VEGF	2,37 (1,55-3,24)	1,82 (1,36-2,15)	0,2913
MCP-1	1,17 (0,81-2,25)	0,50 (0,27-1,39)	0,1599

ТАБЛИЦА 5. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТЕ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НЕЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (СПОНТАННАЯ ПРОДУКЦИЯ) Ме, ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), пг/мл

TABLE 5. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN THE SUPERNATES OF IMMUNOCOMPETENT BLOOD CELLS FROM PATIENTS WITH NON-MALIGNANT BREAST DISORDERS (SPONTANEOUS PRODUCTION) Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), pg/ml

Цитокины Cytokines	III группа Group III	IV группа Group IV	Достоверность различий (p) Significance of differences
IL-2	2,00 (2,00-2,00)	2,00 (2,00-2,00)	0,8407
IL-6	130,10 (70,80-443,50)	503,75 (70,80-798,00)	0,1300
IL-8	645,00 (355,00-2345,00)	1962,50 (805,00-5115,00)	0,0022
IL-10	2,00 (1,00-4,60)	2,15 (1,00-4,60)	0,7221
IL-17	2,00 (2,00-2,00)	2,00 (1,00-2,00)	0,1221
IL-18	20,60 (14,10-34,00)	22,85 (19,50-38,00)	0,3130
IL-1 β	44,40 (18,10-84,10)	82,50 (50,40-99,40)	0,0008
IL-1ra	810,00 (493,00-1241,90)	1264,70 (917,80-1833,20)	0,0281
TNF α	8,60 (4,50-12,60)	18,15 (11,70-28,40)	0,0016
IFN γ	2,00 (2,00-2,00)	2,00 (2,00-2,00)	0,7221
G-CSF	10,70 (3,60-19,90)	28,60 (10,70-79,90)	0,0076
GM-CSF	2,50 (2,00-5,90)	4,45 (2,00-17,80)	0,1383
VEGF	68,00 (38,00-99,80)	82,15 (63,10-112,00)	0,1074
MCP-1	3490,00 (1792,00-6259,00)	6157,50 (2901,00-13067,00)	0,0103

ТАБЛИЦА 6. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТЕ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИНВАЗИВНЫМ ПРОТОВОКОВЫМ РАКОМ И ПАЦИЕНТОВ С ПРЕДРАКОВЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (СПОНТАННАЯ ПРОДУКЦИЯ) Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), пг/мл

TABLE 6. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN THE SUPERNATES OF IMMUNOCOMPETENT BLOOD CELLS FROM THE PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA AND PATIENTS WITH PRECANCEROUS CHANGES OF MAMMARY GLAND (SPONTANEOUS PRODUCTION) Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), pg/ml

Цитокины Cytokines	I группа Group I	IV группа Group IV	Достоверность различий (p) Significance of differences
IL-2	2,00 (2,00-2,00)	2,00 (2,00-2,00)	0,6798
IL-6	180,15 (58,00-643,40)	503,75 (70,80-798,00)	0,3872
IL-8	642,50 (320,00-2445,00)	1962,50 (805,00-5115,00)	0,0419
IL-10	2,95 (1,00-5,80)	2,15 (1,00-4,60)	0,5632
IL-17	2,00 (2,00-2,00)	2,00 (1,00-2,00)	0,5734
IL-18	25,25 (21,20-31,40)	22,85 (19,50-38,00)	0,7470
IL-1 β	45,75 (15,60-106,50)	82,50 (50,40-99,40)	0,1446
IL-1ra	629,00 (456,80-944,50)	1264,70 (917,80-1833,20)	0,0050
TNF α	11,55 (4,50-21,50)	18,15 (11,70-28,40)	0,1577
IFN γ	2,00 (2,00-2,00)	2,00 (2,00-2,00)	0,7470
G-CSF	13,00 (2,00-40,10)	28,60 (10,70-79,90)	0,0970
GM-CSF	2,60 (2,00-7,80)	4,45 (2,00-17,80)	0,2023
VEGF	50,25 (28,70-80,50)	82,15 (63,10-112,00)	0,0125
MCP-1	2659,50 (1211,00-6601,30)	6157,50 (2901,00-13067,00)	0,0283

Как видно из таблицы 3, отмечались достоверные различия в сравниваемых группах пациентов по ИВПА на продукцию IL-1ra, G-CSF и VEGF. Последний играет ключевую роль в ангиогенезе опухоли и в метастазировании [13], а IL-1ra может быть маркером выраженности воспалительной реакции при раке [10]. Наиболее выраженные достоверные различия были выявлены при сравнении ИВПА на продукцию фактора роста G-CSF.

Таким образом, при сопоставлении данных таблиц видно, что различные принципы формирования групп сравнения позволяют вскрыть особенности цитокинового ресурса при раке молочной железы, при доброкачественных опухолях и предраковых изменениях в молочной железе.

В связи с этим представляло интерес сравнение показателей ИВПА на продукцию цитокинов группы пациентов с фиброаденомой и мастопатией (III группа) с группой пациентов с предраковыми изменениями в молочной железе (IV группа).

Как видно из таблицы 4, рассматриваемые группы достоверно отличались по 5 показателям ИВПА на продукцию IL-8, IL-18, IL-1 β , IL-1ra и TNF α . Причем ИВПА на продукцию этих цитокинов во всех случаях был более высоким у пациентов III группы.

Однако показатели ИВПА на продукцию вышеуказанных цитокинов у пациентов IV группы были более низкими за счет более высокой спонтанной продукции этих цитокинов (табл. 5),

за исключением показателя ИВПА на продукцию IL-18, обсуждать который необходимо в связи с регулятором его биологического эффекта — IL-18BP. Следовательно, ИКК крови пациентов с предраковыми изменениями молочной железы были активированы, поэтому ПА не оказывали на них такого влияния, как на ИКК крови пациентов с доброкачественными изменениями в молочной железе, что выражалось в более низких значениях ИВПА ИКК крови пациентов IV группы. То есть представленные в таблице 4 и 5 данные необходимо рассматривать под иным углом зрения, а именно основной упор при анализе показателей пациентов с предраковыми изменениями молочной железы необходимо делать на уровнях спонтанной продукции цитокинов ИКК крови.

При сравнении концентрации (спонтанной продукции) цитокинов в супернатанте ИКК крови пациентов I и IV групп были получены различия, заключающиеся в более высокой концентрации в супернатанте ИКК крови IL-8, IL-1ra VEGF и MCP-1 у пациентов с предраковыми изменениями молочной железы (табл. 6).

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить особенности цитокинпродуцирующего ресурса ИКК крови у пациентов с ИПР, доброкачественными опухолями и предраковыми изменениями молочной железы.

Список литературы / References

1. Соснина А.В., Великая Н.В., Вараксин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. Новосибирск: Офсет, 2014. 128 с. [Sosnina A.V., Velikaya N.V., Varaksin N.A., Grishaev M.P., Autenshlyus A.I. The role of cytokines in the pathogenesis of malignant neoplasms]. Novosibirsk: Ofset, 2014. 128 p.
2. Aroner S.A., Collins L.C., Connolly J.L., Colditz G.A., Schnitt S.J., Rosner B.A., Hankinson S.E., Tamimi R.M. Radial scars and subsequent breast cancer risk: results from the Nurses' Health Studies. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2013, Vol. 1, no. 139, pp. 277-285.
3. Burchill M.A., Yang J., Vang K.B., Farrar M.A. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol. Lett.*, 2007, Vol. 1, no. 114, pp. 1-8.
4. Castells X., Domingo L., Corominas J.M., Torá-Rocamora I., Quintana M.J., Baré M., Vidal C., Natal C., Sánchez M., Saladié F., Ferrer J., Vernet M., Servitja S., Rodríguez-Arana A., Roman M., Espinàs J.A., Sala M. Breast cancer risk after diagnosis by screening mammography of nonproliferative or proliferative benign breast disease: a study from a population-based screening program. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2015, Vol. 1, no. 149, pp. 237-244.
5. Chavey C., Bibeau F., Gourgu-Bourgade S., Burlincho S., Boissière F., Laune D., Roques S., Lazennec G. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res.*, 2007, Vol. 1, no. 9, pp. 1-11.
6. Chen Y., Zhao Z., Chen Y., Lv Z., Ding X., Wang R., Xiao H., Hou C., Shen B., Feng J., Guo R., Li Y., Peng H., Han G., Chen G. An epithelial-to-mesenchymal transition-inducing potential of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in colon cancer. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 1, no. 7, pp. 1-12.
7. Cote M.L., Ruterbusch J. J., Alesh B., Bandyopadhyay S., Kim E., Albashiti B., Sharaf Aldeen B., Radisky D.C., Frost M.H., Visscher D.W., Hartmann L.C., Nassar W.H., Ali-Femhi R. Benign breast disease and the risk of subsequent breast cancer in African American women. *Cancer Prev. Res. (Phila.)*, 2012, Vol. 12, no. 5, pp. 1375-1380.

8. Degnim A.C., Nassar A., Stallings-Mann M., Keith Anderson S., Oberg A.L., Vierkant R.A., Frank R.D., Wang C., Winham S.J., Frost M.H., Hartmann L.C., Visscher D.W., Radisky D.C. Gene signature model for breast cancer risk prediction for women with sclerosing adenosis. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2015, Vol. 3, no. 152, pp. 687-694.
9. Degnim A.C., Visscher D.W., Berman H.K., Frost M.H., Sellers T.A., Vierkant R.A., Maloney S.D., Pankratz V.S., de Groen P.C., Lingle W.L., Ghosh K., Penheiter L., Tlsty T., Melton L.J. 3rd, Reynolds C.A., Hartmann L.C. Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. *J. Clin. Oncol.*, 2007, Vol. 19, no. 25, pp. 2671-2677.
10. Dinarello C.A. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev.*, 2010, Vol. 2, no. 29, pp. 317-329.
11. Hartmann L.C., Sellers T.A., Frost M.H., Lingle W.L., Degnim A.C., Ghosh K., Vierkant R.A., Maloney S.D., Pankratz V.S., Hillman D.W., Suman V.J., Johnson J., Blake C., Tlsty T., Vachon C.M., Melton L.J. 3rd, Visscher D.W. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2005, Vol. 3, no. 353, pp. 229-237.
12. Kim K.E., Song H., Kim T.S., Yoon D., Kim C.W., Bang S.I., Hur D.Y., Park H., Cho D.H. Interleukin-18 is a critical factor for vascular endothelial growth factor-enhanced migration in human gastric cancer cell lines. *Oncogene*, 2007, Vol. 10, no. 26, pp. 1468-1476.
13. Lalla R.V., Boissoneau D.S., Spiro J.D., Kreutzer D.L. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2003, Vol. 8, no. 129, pp. 882-888.
14. Lewis A.M., Varghese S., Xu H., Alexander H.R. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J. Transl. Med.*, 2006, Vol. 4, no. 48, pp. 1-12.
15. Morrow M., Schnitt S.J., Norton L. Current management of lesions associated with an increased risk of breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2015, Vol. 4, no. 12, pp. 227-238.
16. Olejniczak K., Kasprzak A. Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases – a review. *Med. Sci. Monit.*, 2008, Vol. 10, no. 14, pp. 179-189.
17. Visscher D.W., Nassar A., Degnim A.C., Frost M.H., Vierkant R.A., Frank R.D., Tarabishy Y., Radisky D.C., Hartmann L.C. Sclerosing adenosis and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2014, Vol. 1, no. 144, pp. 205-212.

Авторы:

Михайлова Е.С. — научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; старший научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск, Россия

Вараксин Н.А. — заведующий лабораторией АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Архипов С.А. — д.б.н., заведующий лабораторией иммуногистохимии, биохимии и фармакологии, центральная научно-исследовательской лаборатория ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; старший научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Mikhaylova E.S., Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Research Associate, Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

Varaksin N.A., Head of Laboratory, JSC "Vector-Best", Novosibirsk, Russian Federation

Arkhipov S.A., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Immunohistochemistry, Biochemistry and Pharmacology, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Research Associate, Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

Голованова А.В. — младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Студеникина А.А. — младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Аутеншлюс А.И. — д.б.н., профессор, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; главный научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск, Россия

Golovanova A.V., Junior Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Studenikina A.A., Junior Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Autenshlyus A.I., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Chief Research Associate, Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 11.10.2017

Отправлена на доработку 16.10.2017

Принята к печати 20.10.2017

Received 11.10.2017

Revision received 16.10.2017

Accepted 20.10.2017

СЫВОРОТОЧНЫЕ УРОВНИ ФАКТОРОВ РОСТА ГЕМОПОЭЗА И АНГИОГЕНЕЗА (IL-5, IL-7, IL-9, FGF- β , G-CSF, VEGF И PDGF) У ЖЕНЩИН С МИОМОЙ МАТКИ

Коненков В.И., Королева Е.Г., Орлов Н.Б., Прокофьев В.Ф., Шевченко А.В., Новиков А.М.

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Маточные лейомиомы являются распространенными доброкачественными опухолями, развивающимися из гладкомышечных тканей, зачастую приводящими к бесплодию и рецидивирующим абортam. Беременность и развитие миомы матки характеризуются необычайной скоростью роста миометрия, гиперпродукцией внеклеточного матрикса и повышением уровня экспрессии рецепторов для ряда ростовых факторов. Целью настоящего исследования явилось определение концентрации ряда основных ростовых факторов (IL-5, IL-7, IL-9, FGF- β , G-CSF, VEGF и PDGF) в сыворотке крови женщин с миомой матки. Концентрацию 27 цитокинов определяли с использованием набора фирмы Bio Rad (США) — Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном анализаторе Bio-Plex 200. Под наблюдением находились 36 пациенток с верифицированным диагнозом миомы тела матки, которым в дальнейшем проводилось оперативное лечение в объеме лапароскопической миомэктомии. Результаты проведенного исследования показали наличие тенденции к снижению в сыворотке крови женщин с миомой матки таких ростовых факторов, оказывающих стимулирующее воздействие на процессы гемопоэза и ангиогенеза, как IL-9 и FGF. Концентрация IL-5, IL-7 и G-CSF оказалась достоверно снижена относительно характерного для содержания в сыворотке крови здоровых женщин европеоидного происхождения. Наиболее значимо оказалось снижение концентраций таких проангиогенных факторов, как VEGF и PDGF. Их концентрация в сыворотке крови женщин с лейомиомой оказалась сниженной, соответственно, в 3 и в 6 раз. Снижение концентрации G-CSF оказалось не только значительно выраженным относительно здоровых женщин, но тесно скоррелировано с изменениями концентраций таких факторов, как IL-5, IL-7 и IL-9, коэффициент корреляции которых составляет, соответственно, 0,723, 0,637 и 0,504. Можно заключить, что несмотря на то, что, по литературным данным, при развитии миомы матки отмечается значительное возрастание содержания ростовых факторов, участвующих в процессах гемопоэза и ангиогенеза в тканях миометрия и растущей лейомиомы, оно сопровождается, согласно полученным нами данным, снижением в той или иной степени концентраций этих регуляторных белков в сыворотке крови.

Ключевые слова: миома матки, факторы роста гемопоэза, факторы роста ангиогенеза, IL-5, IL-7, IL-9, FGF- β , G-CSF, VEGF, PDGF

Адрес для переписки:

Прокофьев Виктор Федорович
Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»
630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.
Тел./факс: 8 (383) 311-05-40, 227-01-94.
E-mail: vf_prok@mail.ru

Address for correspondence:

Prokofiev Viktor F.
Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences
630060, Russian Federation, Novosibirsk, Timakova str., 2.
Phone/Fax: 7 (383) 311-05-40, 227-01-94.
E-mail: vf_prok@mail.ru

Образец цитирования:

В.И. Коненков, Е.Г. Королева, Н.Б. Орлов, В.Ф. Прокофьев, А.В. Шевченко, А.М. Новиков «Сывороточные уровни факторов роста гемопоэза и ангиогенеза (IL-5, IL-7, IL-9, FGF- β , G-CSF, VEGF и PDGF) у женщин с миомой матки» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 691–698. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-691-698
© Коненков В.И. и соавт., 2018

For citation:

V.I. Konenkov, E.G. Koroleva, N.B. Orlov, V.F. Prokofiev, A.V. Shevchenko, A.M. Novikov "Serum levels of hemopoietic and angiogenesis growth factors (IL-5, IL-7, IL-9, FGF- β , G-CSF, VEGF and PDGF) in women with uterine myoma", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 691–698. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-691-698
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-691-698

SERUM LEVELS OF HEMOPOIETIC AND ANGIOGENESIS GROWTH FACTORS (IL-5, IL-7, IL-9, FGF- β , G-CSF, VEGF AND PDGF) IN WOMEN WITH UTERINE MYOMA

Konenkov V.I., Koroleva E.G., Orlov N.B., Prokofiev V.F.,
Shevchenko A.V., Novikov A.M.

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Uterine leiomyomas are common benign tumors developing from smooth muscle tissues, often leading to infertility and recurrent abortions. Pregnancy and development of uterine fibroids are characterized by an unusual rate of myometrium growth, hyperproduction of extracellular matrix and increased expression of numerous growth factor receptors. The purpose of this study was to determine concentrations of some key growth factors (IL-5, IL-7, IL-9, FGF- β , G-CSF, VEGF and PDGF) in blood serum of women with uterine myoma. Concentrations of the 27 cytokines were determined using a Bio Rad kit (USA) – Bio-Plex Pro™. Human Cytokine 27-plex Assay by means of flow-through fluorometry at the Bio-Plex 200 double-beam laser analyzer. Thirty-six patients with verified uterine myoma were followed up, being later subject to operative treatment (laparoscopic myomectomy). The results of this study showed a trend to decreased amounts of some hematopoiesis and angiogenesis growth factors, e.g., IL-9 and FGF, in blood serum of women with uterine myoma. Concentrations of IL-5, IL-7, and G-CSF proved to be significantly decreased if compared to serum contents of European healthy women. The most significant decrease was registered for pro-angiogenic factors, such as VEGF and PDGF. Their serum concentration in women with leiomyoma was reduced, respectively, 3- and 6-fold against controls. The decreased G-CSF concentration was not only quite significant, as compared to healthy women, but showed significant correlations with changes of such factors as IL-5, IL-7 and IL-9, with correlation quotients of, resp., 0.723, 0.637, and 0.504, respectively. One may conclude that, in spite of literature data on significantly increased contents of the mentioned growth factors in tissues of myometrium and growing uterine leiomyoma, our data show that the concentrations of these regulatory proteins in blood serum are decreased to some extent in this clinical condition.

Keywords: uterine myoma, growth factors of hematopoiesis, growth factors of angiogenesis, IL-5, IL-7, IL-9, FGF- β , G-CSF, VEGF, PDGF

Введение

Маточные лейомиомы являются распространенными доброкачественными опухолями, развивающимися из гладкомышечных тканей, зачастую приводящими к бесплодию и рецидивирующим абортam. Беременность и развитие миомы матки (ММ) характеризуются необычайной скоростью роста миометрия, гиперпродукцией внеклеточного матрикса и повышением уровня экспрессии рецепторов для пептидных и стероидных гормонов. Однако, в отличие от обычного послеродового миометрия, лейомиомы не могут регрессировать путем апоптоза и подвергаться обратной послеродовой дедифференцировке [7]. Важнейшими регуляторами этих клеточных процессов являются представители семейства ростовых факторов. На сегодняшний день установлено, что активными участниками в процессах пролиферации и дифференцировки миометрия являются: эпидермальный фактор роста (EGF), гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF),

инсулиноподобный фактор роста (IGF), трансформирующий фактор роста α (TGF- α), фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF). Все приведенные выше факторы роста являются лигандами хорошо известных и установленных рецепторных тирозинкиназ (RTK), которые активируют два критических сигнальных каскада, таких как пути Ras-Erk/MAP-киназы и фосфатидилинозит-3-киназы (PI3K) – АКТ-mTor. Кроме того, члены надсемейства TGF, такие как TGF- β , а также активин являются важными факторами роста, связанными с биологией клеток миометрия, действуя посредством активации рецепторов сериновой треонинкиназы пути Smad [6, 14].

В настоящее время семейство ростовых факторов насчитывает более 100 наименований. В приведенном исследовании нами поставлена цель определить концентрации в сыворотке крови женщин с развившимися миомами матки таких наиболее значимых ростовых факторов, принимающих активное участие в процессах гемопо-

эза и ангиогенеза, как IL-5, IL-7, IL-9, FGF- β , G-CSF, VEGF и PDGF.

IL-5, или эозинофильный колониестимулирующий фактор, синтезируется эозинофилами, клетками Th2, тучными клетками, клетками-предшественниками CD34⁺, NK-Т-клетками и врожденными лимфоидными клетками типа 2 (ILC2), способствуя производству, созреванию, пролиферации, рекрутингу, дифференцировке и выживанию эозинофилов. Кроме того, IL-5 в костном мозге способствует дифференцировке некоторых CD34⁺ клеток в эозинофилы [19].

IL-7 описан как лимфопоэтический фактор роста или как лимфо-гомеостатический цитокин, играющий важную роль в В-клеточном лимфопоэзе и тимопоэзе [17]. Снижение уровня продукции IL-7 ретикулярными клетками лимфоузлов рассматривается в качестве одного из факторов снижения противоопухолевого иммунитета [8].

IL-9 оказывает плеiotропные эффекты на гемопоэтические клетки, связываясь со специфической цепью рецептора IL-9 (IL-9R α), активируя синтез IL-2, IL-4 и IL-21. IL-9 стимулирует накопление тучных клеток в тканях, способствует пролиферации Т-клеток, выживанию ILC, улучшает переключение класса IgE в В-клетках и изменяет активность кроветворных клеток-предшественников. Хелперные эффекты IL-9 позволяют предположить функционирование специализированных Th9-клеток [12].

FGF- β является представителем семейства фактора роста фибробластов, экспрессируется в различных эмбриональных и взрослых тканях и проявляет разнообразную активность в пролиферации клеток, ангиогенезе, росте нейронов, выживании и заживлении ран. К настоящему моменту описано более 20 ростовых факторов этого семейства [10].

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор G-CSF инициирует пролиферацию и дифференцировку клеток предшественников в зрелые гранулоциты. Члены надсемейства колониестимулирующего фактора (CSF) участвуют в миелопоэзе млекопитающих, а именно: образование моноцитов, макрофагов, дендритных клеток (DCs) и полиморфноядерных фагоцитов, например нейтрофилов и эозинофилов [3].

Фактор роста сосудистого эндотелия VEGF опосредует ангиогенез, расширение существующего сосудистого русла путем прорастания новых кровеносных сосудов [1, 22].

Тромбоцитарный фактор роста PDGF играет важную роль в ангиогенезе, пролиферации таких мезенхимных клеток, как фибробласты, остеобласты, сосудистые гладкомышечные клетки, нейроэктодермальные клетки-предшественники

и мезенхимальные стволовые клетки, а также в направленной миграции мезенхимальных клеток [4].

Материалы и методы

Описание группы пациентов

Под наблюдением находились 36 пациенток с верифицированным диагнозом миомы тела матки, которым проводилось оперативное лечение в объеме лапароскопической миомэктомии. Возраст пациенток составил от 23 до 54 лет. Средний возраст составил 41,13 $\pm$ 6,68. Среди них пациенток с избыточной массой тела и с ожирением (ИМТ > 24,99) — 35,89%. Нарушение менструального цикла по типу полименореи выявлено у 20 пациенток. Предшествующие роды отмечены у 28 пациенток. Искусственное прерывание беременности в анамнезе у 25 женщин. Спонтанные выкидыши выявлены у 8 пациенток. У 5 пациенток в анамнезе беременностей не наступало. Жалобы на тянущие боли внизу живота предъявили 28 пациенток, на кровотечение — 23 пациентки. Размеры миоматозных узлов, выявленных по данным УЗИ, органов малого таза составили от 5 до 180 мм. Средний размер 106,5 $\pm$ 41,05 мм. По передней стенке матки располагались узлы у 19 пациенток, по задней — у 7 пациенток; атипичное расположение (забрюшинные, перешеечные узлы) — у 2, сочетанное расположение — у 10 пациенток. При выполнении предоперационной гистероскопии, при гистологическом исследовании у 7 пациенток диагностирован полип эндометрия, у 6 пациенток — простая гиперплазия эндометрия.

Метод определения цитокинов

Однократно замороженная сыворотка крови размораживалась перед исследованием до комнатной температуры. Для удаления осадка проводили центрифугирование сыворотки при 4 °C 10000 об/мин 10 минут. Концентрацию 27 цитокинов определяли с использованием набора фирмы Bio Rad (США) — Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном анализаторе Bio-Plex 200 производства Bio-Rad (США). В сыворотке одномоментно определялись концентрации IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, FGF basic, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF α и VEGF после построения калибровочной кривой по соответствующим стандартам. Для обработки данных применялось программное обеспечение Bio-Plex manager Software v. 4.1. Концентрация цитокинов выражалась в пикограммах на 1 миллилитр (пг/мл).

Методы статистического анализа

Статистическая обработка проводилась с помощью специализированных пакетов прикладных программ StatSoft Statistica 10.0 и IBM SPSS Statistics 23 (США). Проверку гипотезы о нормальном распределении количественных параметров проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка и критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Для анализа данных использовали параметрические (t-критерий Стьюдента для независимых выборок с учетом выполнения двух ограничивающих условий: нормальность распределения и равенство генеральных дисперсий для групп сравнения) и непараметрические (U-тест Манна–Уитни, ранговая корреляция Спирмена) методы статистики. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ ошибка средней ($M \pm m$), медианы (Me) и интерквартильного размаха (интервал между 25-м ($Q_{0,25}$) и 75-м ($Q_{0,75}$) процентилями). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты

Необходимо отметить, что при сравнении количественных характеристик исследованных цитокинов обращает на себя внимание значительная дисперсия практически всех регуляторных факторов в сыворотке крови обследован-

ных женщин. Это заключение подтверждается как значениями минимальных и максимальных показателей, представленных в таблице 1, так и значительными различиями в показателях средних величин и медианных критериев для всех исследованных цитокинов.

Кроме того, привлекают внимание значительные различия в абсолютных значениях содержания исследованных ростовых факторов в сыворотке крови больных ММ женщин. Так, если содержание IL-5 характеризуется величиной $2,23 \pm 0,39$ пг/мл, то концентрация PDGF-BB в тех же сыворотках достигает уже величины $4212,53 \pm 388,62$ пг/мл, то есть практически в тысячи раз выше. Речь здесь, конечно, идет об абсолютных значениях концентраций белков, а не сравнительной активности этих регуляторных факторов, которую можно сопоставить лишь в соответствующих клеточных тест-системах.

Переходя к вопросу о сопоставлении полученных результатов со значениями исследованных показателей у здоровых женщин, мы обратились к нормативным значениям, полученным на значительной выборке здоровых женщин европеоидного происхождения, полученных лабораторией, сотрудничающей с фирмой-разработчиком используемых нами тест-систем “27-plex kit from Bio-Rad” [5]. В этих исследованиях проведен тщательный анализ результатов исследова-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИИ ФАКТОРОВ РОСТА ГЕМОПОЭЗА И АНГИОГЕНЕЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖЕНЩИН С МИОМОЙ МАТКИ

TABLE 1. CONCENTRATIONS OF GROWTH FACTORS OF HEMOPOIESIS AND ANGIOGENESIS IN THE SERUM OF WOMEN WITH UTERINE MYOMA

Статистический показатель Statistical indicator		IL-5	IL-7	IL-9	FGF- β	G-CSF	VEGF	PDGF-BB
Среднее Mean value		2,22	8,16	89,75	46,32	54,26	79,72	4212,52
Стандартная ошибка среднего значения Standard error of mean value		0,39	0,75	4,84	3,97	3,50	8,35	388,62
Среднеквадратическое отклонение Standard deviation		2,35	4,51	29,06	23,82	21,02	50,09	2331,71
Минимум Minimum		0,01	1,82	54,32	22,53	20,20	9,93	1400,43
Максимум Maximum		7,54	22,54	221,13	162,67	95,50	201,28	11144,54
Мода Mode		0,01	2,80	54,32	22,53	20,20	9,93	1400,43
Медиана Median		1,36	7,73	84,14	43,13	51,58	70,39	3757,18
Процентили Percentiles	$Q_{0,25}$	0,01	4,24	72,56	33,96	36,88	35,96	2499,72
	$Q_{0,75}$	4,21	11,22	98,05	49,26	69,66	115,84	5046,98

ния цитокинов в сыворотке крови в зависимости от пола, возраста, этнической принадлежности обследованных лиц, от времени исследования и даже от использования различных пластиковых планшетов при исследовании полученного образца сыворотки крови. Результаты этих исследований, статистический анализ которых проведен с помощью программного обеспечения Bio-Plex Manager software v. 6.2, признаны пригодными в качестве нормативных значений. Несмотря на то, что результаты исследования 25 из 27 цитокинов (за исключением MCP-1 и TNF α) не выявили гендерных различий, для сопоставления нами использованы данные исследования сывороток группы из 94 здоровых женщин [9].

Результаты проведенного исследования показали наличие тенденции к снижению в сыворотке крови женщин с ММ таких ростовых факторов, оказывающих стимулирующее воздействие на процессы гемопоэза и ангиогенеза, как IL-9 и FGF. Хотя при оценке полученных различий с помощью одностороннего критерия Стьюдента получены значения $p = 0,0001$ и $0,052$ соответственно, при использовании более точного двустороннего критерия эти различия утрачивают значения достоверности ($p = 0,314$).

Гораздо более значимые результаты получены при сопоставлении полученных данных об уровне остальных пяти исследованных ростовых факторов в сыворотке крови женщин с ММ.

Так, концентрация IL-5 с его способностью воздействовать на активность эозинофильных клеток снижена до $2,23 \pm 0,39$ пг/мл по сравнению с $8,0 \pm 1,68$ пг/мл, характерной для содержания в сыворотке крови здоровых женщин европейского происхождения ($p = 0,001$).

Еще более значимым оказалось снижение содержания в сыворотке крови женщин с ММ такого плейотропного лимфопоэтического фактора, как IL-7. Его средняя концентрация в сыворотке крови обследованных нами пациенток составила $8,16 \pm 0,75$ пг/мл, что значительно ниже присущего здоровым женщинам уровня концентрации $59,5 \pm 14,62$ пг/мл ($p = 0,0006$).

Сходным образом характеризуются и результаты определения в сыворотке крови женщин с ММ гранулоцитарного колониестимулирующего фактора G-CSF. Его концентрация в сыворотке крови женщин с ММ составляет $54,26 \pm 3,5$ пг/мл, что достоверно ниже, чем аналогичный показатель, установленный для здоровых женщин $93,7 \pm 9,33$ пг/мл ($p = 0,0001$).

Поскольку рост опухолевой массы как злокачественного, так и доброкачественного характера сопровождается развитием процессов ангиогенеза и васкулогенеза, особое внимание при исследовании ростовых факторов обращено на такие

проангиогенные факторы, как VEGF и PDGF. Их концентрация в сыворотке крови женщин с лейомиомой также оказалась значительно сниженной, соответственно, в 3 и в 6 раз. Концентрация фактора роста сосудистого эндотелия VEGF в сыворотке крови женщин с ММ составляет $79,72 \pm 8,35$ пг/мл, тогда как в сыворотке крови здоровых женщин его уровень характеризуется величиной $263,3 \pm 22,95$ пг/мл ($p < 0,0000001$).

Аналогичным образом изменена и концентрация в сыворотке крови женщин с ММ тромбоцитарного фактора роста PDGF. Усредненный показатель его содержания составляет $4212,53 \pm 388,62$ пг/мл, тогда как в группе здоровых женщин он определяется в концентрации $27537,4 \pm 2676,95$ пг/мл ($p < 0,0000001$).

Обсуждение

Сыворотка крови является наиболее доступным для исследования объектом, однако всегда возникает вопрос о том, насколько адекватно отражает содержание того или иного биологически активного вещества в кровеносном русле процессы, происходящие в тканях и в очагах патологических изменений. В связи с этим полученные результаты необходимо сопоставлять с данными, полученными при исследовании тканей миометрия и очагов роста лейомиомы.

Полученные нами данные говорят о снижении концентрации проангиогенных факторов в сыворотке крови, однако это может служить как свидетельством снижения уровня их синтеза, так и свидетельством их активного потребления в патологических очагах миометрия.

В литературе, посвященной исследованию факторов роста при развитии ММ, практически отсутствуют сведения о роли IL-5, IL-7 и IL-9 в росте лейомиом, хотя и описаны единичные случаи развития эозинофильной инфильтрации при этом заболевании [21] и выявлены тенденции к снижению уровня IL-7 и IL-9 в плазме американских женщин африканского происхождения с ММ [23]. В этом же исследовании выявлена тенденция к снижению уровня сывороточного G-CSF в плазме крови женщин с ММ. В этой же работе нашли подтверждение используемые нами нормативные для здоровых женщин значения содержания в крови этого ростового фактора, который при использовании метода проточной флуориметрии колеблется в интервале 86-108 пг/мл. Снижение концентрации данного ростового фактора оказалось не только значительно выраженным (практически в 2 раза) относительно здоровых женщин, но тесно скоррелировано с изменениями концентраций таких факторов, как IL-5, IL-7 и IL-9, коэффициент

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ КОРРЕЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА КОНЦЕНТРАЦИЙ ФАКТОРОВ РОСТА ГЕМОПОЭЗА И АНГИОГЕНЕЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖЕНЩИН С МИОМОЙ МАТКИ

TABLE 2. RESULTS OF THE CORRELATION ANALYSIS OF THE CONCENTRATIONS OF GROWTH FACTORS OF HEMOPOIESIS AND ANGIOGENESIS IN THE SERUM OF WOMEN WITH UTERINE MYOMA

Показатели Indicators	IL-5	IL-7	IL-9	FGF- β	G-CSF	VEGF	PDGF-BB
IL-5	1,000	0,524	0,464	0,288	0,723	0,332	0,308
		0,001	0,004	0,089	< 0,001	0,048	0,068
IL-7	0,524	1,000	0,393	0,551	0,637	0,567	0,700
	0,001		0,018	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
IL-9	0,464	0,393	1,000	0,387	0,504	0,304	0,419
	0,004	0,018		0,020	0,002	0,071	0,011
FGF- β	0,288	0,551	0,387	1,000	0,484	0,318	0,416
	0,089	< 0,001	0,020		0,003	0,059	0,012
G-CSF	0,723	0,637	0,504	0,484	1,000	0,438	0,488
	< 0,001	< 0,001	0,002	0,003		0,008	0,003
VEGF	0,332	0,567	0,304	0,318	0,438	1,000	0,436
	0,048	< 0,001	0,071	0,059	0,008		0,008
PDGF-BB	0,308	0,700	0,419	0,416	0,488	0,436	1,000
	0,068	< 0,001	0,011	0,012	0,003	0,008	

Примечание. Верхняя строка – значения коэффициента корреляции Спирмена; нижняя строка – уровень достоверности (значимости) коэффициента корреляции.

Note. Top line, values of the Spearman correlation coefficient; bottom line, the level of reliability (significance) of the correlation coefficient.

корреляции которых составляет, соответственно, 0,723, 0,637 и 0,504 (табл. 2).

Экспрессия мРНК VEGF и белка была идентифицирована в гладкомышечных клетках как нормального миометрия, так и лейомиомы. Рецепторы VEGF, VEGFR-1 и VEGFR-2 также экспрессируются в миометрии и клеточных лейомиомах [18]. Более выраженная экспрессия VEGF была обнаружена в лейомиомах по сравнению с соседним миометрием, что указывает на то, что локальный ангиогенез может быть важным для развития и роста этих опухолей, причем экспрессия VEGF более выражена при лейомиосаркоме по сравнению с лейомиомой. VEGF стимулирует ангиогенную активность, которая отвечает за активно растущие опухоли и может усилить рост миомы и прогрессирование заболевания при многих карциномах [2, 9].

Экспрессия PDGF и PDGF-R была зарегистрирована как в нормальных тканях миометрия, так и на более высоком уровне в очагах лейомиомы, причем в клетках культивируемой лейомиомы присутствует больше участков PDGF-R, чем в клетках миометрия, но их сродство к рецепторам ниже в лейомиоме, чем в миометрии [13]. Обработка культивируемых клеток гладкой мускулатуры миометрия человека PDGF стимулирует экспрессию VEGF и стимулирует пролиферацию

клеток [20]. Взаимодействие между активностью этих факторов подтверждается и результатами проведенного нами корреляционного анализа, который показал, что коэффициент корреляции между изменениями их концентраций в сыворотке крови составляет 0,436 ($p = 0,008$).

Активные формы кислорода, продуцирующиеся NADPH-оксидазным комплексом, являются необходимым компонентом митогенного пути MAP-киназы, активирующей PDGF в клетках гладкой мускулатуры лейомиомы. Стимуляция этих клеток PDGF вызывает заметное увеличение внутриклеточной продукции активного кислорода, в то время как ингибитор NADPH-оксидазы блокирует его продукцию дозозависимым образом [15].

В патогенезе ММ играют важную роль взаимодействия факторов роста и белков внеклеточного матрикса [11]. Методами сокультивирования установлена повышенная пролиферация миоцитов лейомиомы матки и фибробластов, полученных из лейомиомы матки, и повышенные уровни внеклеточного матрикса, коллагена I типа и связывающего инсулиноподобного фактора роста (IGFBP-3). Также была увеличена секреция TGF- β , VEGF, EGF, FGF- β и PDGF-AA и -BB в среде клеток лейомиомы, совместно культивированных с фибробластами, сопровождаю-

шаяся повышением фосфорилирования фактора роста. Растворимые факторы, высвобождаемые фибробластами и/или лейомиомой, полученными из опухолей, и активация рецепторов фактора роста и их путей стимулировали пролиферацию клеток лейомиомы и улучшали производство белков внеклеточного матрикса [16].

Экспрессия фактора роста фибробластов с его способностью стимулировать пролиферацию миоцитов и клеток лейомиомы как в кислой, так и в основной формах и рецепторов к нему FGFR-1 и FGFR-2 выявлена в клетках нормального миометрия и значительно повышается во время роста

лейомиомы [24], что также может быть связано с выявленным нами незначительным снижением его содержания в сыворотке крови женщин с ММ.

Таким образом, можно заключить, что, по литературным данным, при развитии ММ отмечается значительное возрастание содержания ростовых факторов, участвующих в процессах гемопоза и ангиогенеза, в тканях миометрия и растущей лейомиомы, что сопровождается, согласно полученным нами данным, снижением в той или иной степени концентраций этих регуляторных белков в сыворотке крови.

Список литературы / References

1. Коненков В.И., Климонтов В.В., Черных В.В., Тянь Н.В. Ангиогенез при пролиферативной диабетической ретинопатии: перспективы анти-VEGF-терапии (обзор литературы) // Офтальмохирургия, 2013. № 4. С. 111-115. [Konenkov V.I., Klimontov V.V., Chernykh V.V., Tyan N.V. Angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy: perspectives of anti-VEGF therapy (review of literature). *Oftalmokhirurgiya = Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery*, 2013, no. 4, pp. 111-115. (In Russ.)]
2. Arita S., Kikkawa F., Kajiyama H., Shibata K., Kawai M., Mizuno K., Nagasaka T., Ino K., Nomura S. Prognostic importance of vascular endothelial growth factor and its receptors in the uterine sarcoma. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2005, Vol. 15, no. 2, pp. 329-336.
3. Becher B., Tugues S., Greter M. GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation. *Immunity*, 2016, Vol. 45, no. 5, pp. 963-973.
4. Betsholtz C. Biology of platelet-derived growth factors in development. *Birth Defects Res. C Embryo Today*, 2003, Vol. 69, no. 4, pp. 272-285.
5. Ciarmela P., Bloise E., Gray P.C., Carrarelli P., Islam M.S., de Pascalis F., Severi F.M., Vale W., Castellucci M., Petraglia F. Activin-A and myostatin response and steroid regulation in human myometrium: disruption of their signalling in uterine fibroid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011, Vol. 96, no. 3, pp. 755-765.
6. Ciarmela P., Islam Md. S., Reis F.M., Gray P. C., Bloise E., Petraglia F., Vale W., Castellucci M. Growth factors and myometrium: biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Hum. Reprod. Update*, 2011, Vol. 17, no. 6, pp. 772-790.
7. Gao J., Zhao L., Liu L., Yang Y., Guo B., Zhu B. Disrupted fibroblastic reticular cells and interleukin-7 expression in tumor draining lymph nodes. *Oncol. Lett.*, 2017, Vol. 14, no. 3, pp. 2954-2960.
8. Hong T., Shimada Y., Uchida S., Itami A., Li Z., Ding Y., Kaganoi J., Komoto I., Sakurai T., Imamura M. Expression of angiogenic factors and apoptotic factors in leiomyosarcoma and leiomyoma. *Int. J. Mol. Med.*, 2001, Vol. 8, no. 2, pp. 141-148.
9. Itoh N., Ohta H., Nakayama Y., Konishi M. Roles of FGF signals in heart development, health, and disease. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2016, Vol. 4, p. 110.
10. Joseph D.S., Malik M., Nurudeen S., Catherino W.H. Myometrial cells undergo fibrotic transformation under the influence of transforming growth factor beta-3. *Fertil. Steril.*, 2010, Vol. 93, no. 5, pp. 1500-1508.
11. Kaplan M.H., Hufford M.M., Olson M.R. The development and *in vivo* function of T helper 9 cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no. 5, pp. 295-307.
12. Liang M., Wang H., Zhang Y., Lu S., Wang Z. Expression and functional analysis of platelet-derived growth factor in uterine leiomyomata. *Cancer Biol. Ther.*, 2006, Vol. 5, no. 1, pp. 28-33.
13. McKay M.M., Morrison D.K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, 2007, Vol. 26, no. 22, pp. 3113-3121.
14. Mesquita F.S., Dyer S.N., Heinrich D.A., Bulun S.E., Marsh E.E., Nowak R.A. Reactive oxygen species mediate mitogenic growth factor signaling pathways in human leiomyoma smooth muscle cells. *Biol. Reprod.*, 2010, Vol. 82, no. 2, pp. 341-351.
15. Moore A.B., Yu L., Swartz C.D., Zheng X., Wang L., Castro L., Kissling G.E., Walmer D.K., Robboy S.J., Dixon D. Human uterine leiomyoma-derived fibroblasts stimulate uterine leiomyoma cell proliferation and collagen type I production, and activate RTKs and TGF beta receptor signaling in coculture. *Cell Commun. Signal*, 2010, Vol. 8, p. 10.
16. Nguyen V., Mendelsohn A., Larrick J.W. Interleukin-7 and Immunosenescence. *J. Immunol. Res.*, 2017, 4807853. doi: 10.1155/2017/4807853.
17. Sanci M., Dikis C., Inan S., Turkoz E., Dicle N., Ispahi C. Immunolocalization of VEGF, VEGF receptors, EGF-R and Ki-67 in leiomyoma, cellular leiomyoma and leiomyosarcoma. *Acta Histochem.*, 2011, Vol. 113, no. 3, pp. 317-325.

18. Schollaert K.L., Stephens M.R., Gray J.K., Fulkerson P.C. Generation of eosinophils from cryopreserved murine bone marrow cells. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 12, e116141. doi: 10.1371/journal.pone.0116141.
19. Taniguchi Y., Morita I., Kubota T., Murota S., Aso T. Human uterine myometrial smooth muscle cell proliferation and vascular endothelial growth-factor production in response to platelet-derived growth factor. *J. Endocrinol.*, 2001, Vol. 169, no. 1, pp. 79-86.
20. Vang R., Medeiros L.J., Samoszuk M., Deavers M.T. Uterine leiomyomas with Eosinophils: a clinicopathologic study of 3 cases. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 2001, Vol. 20, no. 3, pp. 239-243.
21. Vempati P., Popel A.S., Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2014, Vol. 25, no. 1, pp. 1-19.
22. Wegienka G., Baird D.D., Cooper T., Woodcroft K.J., Havstad S. Cytokine patterns differ seasonally between women with and without uterine leiomyomata. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 70, no. 4, pp. 327-335.
23. Wolanska M., Bankowska-Guszczyn E., Jaworski S. Fibroblast growth factor gene expression in uterine leiomyomas. *Ginek. Pol.*, 2008, Vol. 79, no. 8, pp. 555-559.

Авторы:

Коненков В.И. — д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель лаборатории клинической иммуногенетики, научный руководитель, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Королева Е.Г. — врач акушер-гинеколог, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Орлов Н.Б. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Прокофьев В.Ф. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Шевченко А.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Новиков А.М. — врач акушер-гинеколог, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Konenkov V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory for Clinical Immunogenetics, Scientific Director, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Koroleva E.G., Obstetrician-Gynecologist, Research Associate, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Orlov N.B., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory for Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Prokofiev V.F., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Shevchenko A.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory for Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Novikov A.M., Obstetrician-Gynecologist, Junior Research Associate, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 11.12.2017
Принята к печати 13.12.2017

Received 11.12.2017
Accepted 13.12.2017

СВЯЗЬ МЕЖДУ АКТИВНОЙ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ И ХЛОРИРОВАННЫМ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

**Соколов А.В.^{1,2,3,4}, Костевич В.А.^{1,2}, Горбунов Н.П.¹, Григорьева Д.В.⁵,
Горудко И.В.⁵, Васильев В.Б.^{1,3}, Панасенко О.М.^{2,6}**

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

² ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» России, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

⁴ Центр доклинических трансляционных исследований, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

⁶ ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Миелопероксидаза является ключевым фактором, отвечающим за развитие окислительного/галогенирующего стресса при воспалении. Ранее в плазме пациентов с воспалительными заболеваниями различной этиологии, в том числе при атеросклерозе, нами были обнаружены комплексы, образованные миелопероксидазой и ее физиологическим ингибитором, церулоплазмином. Анализ регуляции активности миелопероксидазы церулоплазмином показал, что при воспалении могут возникать условия, при которых церулоплазмин будет модифицирован хлорноватистой кислотой, НОСІ – специфическим продуктом катализа миелопероксидазы. Целью данного исследования был анализ связи между активностью миелопероксидазы и концентрацией церулоплазмينا, модифицированного НОСІ (хлорированного церулоплазмينا), в образцах плазмы крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Были получены специфические антитела против миелопероксидазы, церулоплазмينا, в том числе модифицированного НОСІ, отработаны условия твердофазного иммуноферментного анализа. С помощью комбинации сорбции антигенов на твердой фазе и последующего выявления их собственной активности либо пероксидазной активности меченых антител были разработаны высокочувствительные методы определения миелопероксидазы (концентрация, пероксидазная и галогенирующая активность), концентрации церулоплазмينا, в том числе модифицированного НОСІ. Обнаружена положительная корреляция между концентрацией миелопероксидазы, ее активностью и концентрацией церулоплазмينا, модифицированного НОСІ. Выводы: впервые в плазме крови пациентов с сер-

Адрес для переписки:

Соколов Алексей Викторович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-56-06, 234-94-89.
E-mail: biochemsokolov@gmail.com

Address for correspondence:

Sokolov Alexey V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-56-06, 234-94-89.
E-mail: biochemsokolov@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Соколов, В.А. Костевич, Н.П. Горбунов,
Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, В.Б. Васильев,
О.М. Панасенко «Связь между активной
миелопероксидазой и хлорированным церулоплазмином
в плазме крови пациентов с сердечно-сосудистыми
заболеваниями» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20,
№ 5. С. 699–710.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-699-710

© Соколов А.В. и соавт., 2018

For citation:

A.V. Sokolov, V.A. Kostevich, N.P. Gorbunov, D.V. Grigorieva,
I.V. Gorudko, V.B. Vasilyev, O.M. Panasenkov. "A link between
active myeloperoxidase and chlorinated ceruloplasmin in blood
plasma of patients with cardiovascular diseases", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,
Vol. 20, no. 5, pp. 699–710.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-699-710

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-699-710

дечно-сосудистыми заболеваниями обнаружен церулоплазмин, модифицированный HOCl. Получена достоверная положительная корреляционная зависимость между концентрацией хлорированного церулоплазмينا и активностью миелопероксидазы. Предполагается, что физиологический ингибитор миелопероксидазы, церулоплазмин, претендует на роль мишени для продукта ее катализа — HOCl.

Ключевые слова: миелопероксидаза, галогенирующий стресс, церулоплазмин, пероксидазная активность, сердечно-сосудистые заболевания, биомаркер

A LINK BETWEEN ACTIVE MYELOPEROXIDASE AND CHLORINATED CERULOPLASMIN IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASES

Sokolov A.V.^{a, b, c, d}, Kostevich V.A.^{a, b}, Gorbunov N.P.^a, Grigorieva D.V.^e, Gorudko I.V.^e, Vasilyev V.B.^{a, c}, Panasenکو O.M.^{b, f}

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

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

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

^d Centre of Preclinical Translational Research, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

^e Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

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

Abstract. Myeloperoxidase is a key factor promoting development of halogenative/oxidative stress under inflammatory conditions. Previously, we have discovered complexes including myeloperoxidase and its physiological inhibitor, ceruloplasmin in blood plasma of patients with inflammatory diseases of different etiology, e.g., atherosclerosis. Studies on regulation of myeloperoxidase activity by ceruloplasmin have shown that hypochlorous acid, a specific product of myeloperoxidase action, is likely to modify ceruloplasmin during inflammation. The present study was aimed for analysis of relationships between the myeloperoxidase activity, native, and HOCl-modified ceruloplasmin levels in blood plasma samples of the patients with cardiovascular diseases.

Specific antibodies against myeloperoxidase, ceruloplasmin, and HOCl-modified ceruloplasmin were obtained and specific enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were developed. A combination of highly sensitive methods of myeloperoxidase assay i.e., solid-phase adsorption of antigens with subsequent testing of either their activity, or peroxidase-labeled antibody activity allowed elaborating the highly sensitive assays for ceruloplasmin and its HOCl-modified molecules, and for myeloperoxidase (concentration, peroxidase and halogenating activity). Positive correlation was proven between the myeloperoxidase concentration and activities. HOCl-modified ceruloplasmin content also correlated with myeloperoxidase activity.

The HOCl-modified ceruloplasmin was first discovered in blood plasma samples from patients with cardiovascular diseases. In view of correlation between myeloperoxidase activity and HOCl-modified ceruloplasmin content in plasma, we suggest that HOCl production is aimed for suppression of myeloperoxidase-inhibitory function of ceruloplasmin.

Keywords: myeloperoxidase, halogenative stress, ceruloplasmin, peroxidase activity, cardiovascular diseases, biomarker

Исследование поддержано грантом РФ 17-75-30064 (выделение и очистка СР и МРО, получение антител против белков), грантами РФФИ 15-04-03620 (получение антител против СР-HOCl, измерение концентрации СР, СР-HOCl), 17-04-00530, БРФФИ (Б16Р-015) (измерение концентрации и активности МРО).

Сокращения: СР — церулоплазмин, СР-HOCl — модифицированный HOCl церулоплазмин, НА —

галогенирующая активность, МРО — миелопероксидаза, РА — пероксидазная активность, Σ (РА) — общая пероксидазная активность.

Введение

Развитие сердечно-сосудистых заболеваний ассоциировано с хроническим воспалением и активацией лейкоцитов. Активированные нейтрофилы секретируют миелопероксидазу (МРО, К.Ф. 1.7.1.11, донор: H₂O₂-оксидоредуктаза), по-

вышенная концентрация которой в плазме пациентов является предиктором инфаркта миокарда [2,15]. МРО содержится главным образом в азурофильных гранулах нейтрофилов и в моноцитах, составляя около 5 и 0,9% от общего белка этих клеток соответственно [25]. При взаимодействии с H_2O_2 происходит превращение МРО в высокореакционное Соединение I, которое, наряду с классическим одноэлектронным окислением пероксидазных субстратов (например, *o*-дианизидина, тирозина [3, 35]), обладает уникальной способностью катализировать двухэлектронное окисление хлорид-иона с образованием хлорноватистой кислоты (НОСІ). Образование НОСІ в описанном выше галогенирующем цикле функционирования МРО считается важным фактором врожденного иммунитета. Однако при хроническом воспалении НОСІ, продуцируемая МРО, может модифицировать молекулы организма-хозяина и приводить к развитию окислительного/галогенирующего стресса, сопровождающего многие заболевания [6, 7].

МРО формирует в плазме крови комплексы с церулоплазмином (СР), в составе которых могут оказываться липопротеины низкой плотности [27, 31]. СР претендует на роль эндогенного ингибитора хлорирующей активности МРО и окислительной модификации липопротеинов низкой плотности [9, 24, 28]. Однако в наших опытах было показано, что СР эффективно ингибирует только хлорирующую, но не бромлирующую активность МРО, что, вероятно, связано с большим сродством бромид-иона к активному центру МРО [32]. Кроме того, ингибирование активности МРО возможно только в случае интактности полипептидной цепи СР, которая может расщепляться провоспалительными протеиназами, например, тромбином [26, 30]. Недавно нами было показано, что альбумин сыворотки крови и липопротеины низкой плотности, модифицированные НОСІ, активируют респираторный взрыв нейтрофилов и секрецию ими МРО [6, 8, 21, 31].

Маркеры галогенирующего стресса — молекулы, модифицированные НОСІ, были обнаружены в атеросклеротических бляшках [7, 17]. Известно о наличии аутоантител против модифицированных НОСІ липопротеинов низкой плотности у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями [1]. Учитывая, что МРО в плазме крови взаимодействует с СР и при определенных условиях может проявлять ферментативную активность, актуальным явилось определение концентрации СР, модифицированного НОСІ (СР-НОСІ), а также оценка корреляционных

связей СР-НОСІ с активностью и концентрацией МРО в плазме крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Материалы и методы

Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: конъюгат антител против IgG кролика с пероксидазой из корней хрена, UNOsphere Q, агароза Bio-Gel A-1.5m fine (Bio-Rad, США); Br_2 , KCN, NaCl, NaBr, триэтиламин, цитрат натрия, этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) (Merck, Германия); NaN_3 , глицерин, Кумасси R-250, меркаптоэтанол, персульфат аммония, Tris (Serva, Германия); NaOCl (1,79 M), 6-аминокапроновая кислота, 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин, гепарин, глицин, конъюгат антител против IgG крыс с пероксидазой из корней хрена, неомицина трисульфат, *o*-дианизидин, *p*-фенилендиамин, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, фенил-агароза, SDS, Sephacryl S-200 HR, Sephadex G-75 Superfine, триэтаноламин, фенилметилсульфонилфторид (Sigma, США); акриламид, N,N'-метилен-бис-акриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин («Медиген», Россия). Растворы для хроматографии были приготовлены с использованием апиrogenной деионизованной воды с удельным сопротивлением 18,2 МОм × см. BrCN синтезирован при бромировании KCN в двухфазной системе: вода-дихлорэтан. Лиганды для аффинной хроматографии (гепарин, неомицин, СР) иммобилизовали на BrCN-активированной агарозе [13].

Общая характеристика пациентов, включенных в исследование

Проведенное исследование одобрено комитетом по этике Республиканского научно-практического центра «Кардиология» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (г. Минск, Беларусь) (протокол заседания № 2, п. 6 от 13.02.2009 г., заключение этической экспертизы № 15/02/09 от 18.02.2009 г., приказ № 66 от 13.02.2008 г.). Перед проведением всех процедур бралось письменное информированное согласие пациентов. Всего в исследование включено 69 пациентов: 19 — с хронической ишемической болезнью сердца (стабильная стенокардия) и 50 — с острым коронарным синдромом (нестабильная стенокардия и острый инфаркт миокарда). В исследовании приняли участие 51 мужчина и 18 женщин (средний возраст всех пациентов составил $55,7 \pm 1,3$ лет). Все лица, включенные в исследование, прошли тщательное клинико-инструментальное и лабораторное обследование, включающее эхокардиографию,

ультразвуковое исследование брахиоцефальных артерий, суточное мониторирование ЭКГ и артериального давления, при наличии показаний — коронароангиографию.

Пробоподготовка образцов плазмы и сыворотки крови

Анализ данных литературы и собственные предварительные эксперименты [2, 3, 4, 20] свидетельствовали о том, что для адекватного измерения активности и концентрации МРО в плазме кровь должна быть стабилизирована ЭДТА либо цитратом натрия. Использование гепарина в качестве антикоагулянта либо образцов сыворотки крови приводит к результатам, искаженным секрецией МРО из нейтрофилов. Для измерения концентрации СР, напротив, адекватные результаты были получены только при анализе сыворотки крови, что обусловлено ингибирующим действием хелаторов ионов кальция на оксидазную активность СР. В данном исследовании образцы венозной крови, стабилизированной цитратом натрия, получали у пациентов в Республиканском научно-практическом центре «Кардиология» и в течение 2 часов с момента взятия крови ее центрифугировали при 600 g в течение 15 минут. Отобранную плазму повторно центрифугировали в таком же режиме для удаления следов тромбоцитов. Параллельно для анализа концентрации СР забирали вторую пробу венозной крови без антикоагулянтов, которую через 30 минут после свертывания центрифугировали при 600 g в течение 15 минут и отбирали сыворотку. Образцы плазмы и сыворотки делили на 5-6 аликвот по 0,2 мл и хранили при -70 °С до выполнения измерений.

Получение белков

МРО была очищена из экстракта лейкоцитов здоровых доноров с помощью хроматографий на гепарин-агарозе, фенол-агарозе и Sephacryl S-200 HR. Препарат характеризовался A_{430}/A_{280} (RZ) около 0,85, что соответствует гомогенному ферменту [29]. Для получения препарата мономерного СР, содержащего более 95% нефрагментированных 132 кДа-молекул с $A_{610}/A_{280} > 0,049$, плазму крови с добавлением 1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторида подвергали хроматографии на UNOsphere Q и неомицин-агарозе [13].

Спектрофотометрическое определение концентрации веществ

Спектры поглощения препаратов были измерены с помощью спектрофотометра СФ-2000-02 («ОКБ-Спектр», Россия). Концентрацию реагентов определяли, используя коэффициенты экстинкции: димер МРО - $\epsilon_{430} = 178\,000\text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ [14],

СР - $\epsilon_{610} = 10\,000\text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ [23], H_2O_2 - $\epsilon_{240} = 43,6\text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ [16], ClO^- - $\epsilon_{292} = 350\text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ [22].

Получение антител против СР и СР-НОСІ, а также выявление СР-НОСІ

Антитела против СР от крыс получали после 3-х иммунизаций крыс препаратом интактного СР, из сыворотки животных выделяли фракцию IgG и проводили их аффинную очистку на агарозе с иммобилизованным СР.

С помощью иммунизации кроликов СР-НОСІ были получены специфические поликлональные антитела кроликов против СР-НОСІ, использованные для сорбции модифицированного СР на твердой фазе и его последующей детекции с помощью антител крысы против СР. Для получения антигена СР инкубировали с НОСІ при мольном соотношении окислитель:СР = 20:1 в течение 30 минут при 37 °С. Модифицированный СР отделяли от неокисленного белка с помощью диск-электрофореза в ПААГ [18], вырезали из геля зону окисленного СР. Далее СР-НОСІ подвергали препаративному электрофорезу с SDS [19], вырезали белок из геля и использовали для иммунизации кроликов. После 4-х иммунизаций с интервалом в 2 недели была получена антисыворотка против СР-НОСІ. Из сыворотки выделяли фракцию IgG с помощью осаждения сульфатом аммония. Для очистки антител от фракции, реагирующей с интактным СР-проводили негативную аффинную хроматографию на агарозе с иммобилизованным СР.

Измерение концентрации СР-НОСІ в плазме крови осуществляли по следующему протоколу: антитела кроликов против СР-НОСІ (5 мкг/мл), растворенные в 40 мМ Na_2CO_3 , 80 мМ NaHCO_3 , pH 9,4, адсорбировали в 96-луночных полистирольных планшетах в течение ночи при 4 °С. После 3-х отмывок фосфатно-солевым буфером (PBS: 8,7 мМ Na_2HPO_4 , 1,5 мМ KH_2PO_4 , 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl; pH 7,4), содержащим 0,05%-ый Tween 20, в лунки помещали препараты СР, модифицированного 20-молярным избытком НОСІ, в концентрациях 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 нг/мл и образцы плазмы, разбавленные от 10 до 80 раз PBS, содержащим 0,05%-ый Tween 20. После 60 минут инкубации в термошейкере при 37 °С и 270 об/мин лунки планшета отмывали 3 раза PBS, содержащим 0,05%-ый Tween 20. В лунки помещали аффинные антитела крыс против СР (50 мкг/мл), через 60 минут планшеты отмывали 3 раза PBS, содержащим 0,05%-ый Tween 20. В лунки помещали конъюгат антител против IgG крыс с пероксидазой из корней хрена (1:5000), через 60 минут планшеты отмывали 3 раза PBS, содержащим 0,05%-ый Tween

20. В планшет помещали раствор, содержащий 2 мг 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, 1 мМ H_2O_2 в 12 мл 50 мМ Na-ацетатного буфера, pH 5,5. Через 5 минут инкубации реакцию останавливали 2 М серной кислотой и измеряли поглощение при 405 нм с помощью планшетного монохроматорного флуориметр-люминометр-спектрофотометра (CLARIOstar, BMG LABTECH, Германия). Калибровочный график зависимости A_{405} от [CP-HOCl] обрабатывали в программе MS Excel 2002 как линейную функцию (коэффициент детерминированности R^2 , нормированный от 0 до 1, составлял не менее 0,98). Концентрацию CP-HOCl в образце плазмы крови выражали в нг/мл после сравнения поглощения образца плазмы (с учетом его разбавления) с калибровочной прямой для модифицированного CP.

Определение концентрации CP

Для количественного определения концентрации CP в плазме крови сравнивали *p*-фенилендиамин-оксидазную активность образца сыворотки крови с активностью серии калибровочных растворов CP в модифицированном для микроформата варианте [35]. В лунки 96-луночного планшета вносили по 10 мкл проб сыворотки крови либо калибровочных растворов, содержащих 100-1300 мкг/мл очищенного CP [13], во все лунки добавляли по 200 мкл 0,2% *p*-фенилендиамина в 0,4 М Na-ацетатном буфере, pH 5,5. Через 60 минут реакцию останавливали, внося в лунки по 40 мкл 0,5% NaN_3 (ингибитор активности CP). Измеряли поглощение проб при 530 нм с помощью планшетного монохроматорного флуориметр-люминометр-спектрофотометра (CLARIOstar, BMG LABTECH, Германия). В программном обеспечении прибора (Mars) строили калибровочную прямую, по которой прибор автоматически рассчитывает содержание CP в образцах — в мкг/мл.

Определение пероксидазной активности МРО и общей пероксидазной активности в плазме крови

Для спектрофотометрического определения общей пероксидазной активности плазмы крови (Σ (РА)) в буферный раствор, содержащий 0,2 М Na_2HPO_4 /0,1 М лимонной кислоты (pH 4,5), добавляли субстрат *o*-дианизидин (380 мкМ) и 1/13,3 объема плазмы крови (например, 60 мкл плазмы до объема образца 800 мкл). Реакцию запускали добавлением 100 мкМ H_2O_2 и в кинетическом режиме в течение 6-8 минут определяли скорость окисления *o*-дианизидина — $A_{460}/\text{мин}$ [4, 5]. Измерения проводили при 20 °С на спектрофотометре СОЛАР РВ 2201 (г. Минск, Беларусь). $A_{460}/\text{мин}$ рассчитывали как тангенс угла наклона начального линейного участка кинетической кривой, содержащей минимум шесть экспериментальных точек, по линейной экстраполяции с использованием статистической программы графического редактора Origin 7.0. Σ (РА) рассчитывали с учетом разбавления образца плазмы крови:

$$\Sigma \text{ (РА)} = \Delta A / \text{мин} \times 13,3.$$

Пероксидазную активность МРО в плазме крови (МРО (РА)) оценивали разностным методом. Для этого готовили дополнительную пробу, содержащую, помимо всех вышеперечисленных компонент, специфический ингибитор ферментативной активности МРО — гидразид 4-аминобензойной кислоты (50 мкМ). МРО (РА) вычисляли согласно соотношению:

$$\text{МРО (РА)} = (\Delta A / \text{мин} - \Delta A_{\text{инг}} / \text{мин}) \times 13,3.$$

где $\Delta A / \text{мин}$ и $\Delta A_{\text{инг}} / \text{мин}$ — скорость окисления *o*-дианизидина в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно.

Определение концентрации МРО и ее галогенирующей активности

Измерение концентрации МРО в плазме крови осуществляли с помощью разработанного ранее [3] оригинального метода иммуноферментного анализа с использованием антител против МРО, полученных иммунизацией крыс и кроликов.

Галогенирующую активность МРО (НА) в плазме крови оценивали по флуоресценции резорфина, который образовывался при окислении 10-ацетил-3,7-дигидроксибензоказина в присутствии HOBr , продуцируемой активной МРО, которая связывалась при инкубации образцов в планшетах с адсорбированными на поверхности лунок аффинными антителами против МРО, полученными от крыс [3]. Антитела (5 мкг/мл), растворенные в 40 мМ Na_2CO_3 , 80 мМ NaHCO_3 , pH 9,4, адсорбировали в 96-луночных полистирольных планшетах в течение ночи при 4 °С. После 3-х отмывок PBS, содержащим 0,05%-ый Tween 20, в лунки помещали очищенную МРО в концентрациях 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 нг/мл и образцы плазмы, разбавленные от 10 до 80 раз PBS, содержащим 0,05%-ый Tween 20. После 60 минут инкубации в термошейкере при 37 °С и 270 об/мин лунки планшета отмывали 3 раза PBS, содержащим 0,05%-ый Tween 20. В лунки помещали раствор, содержащий 1 мкМ 10-ацетил-3,7-дигидроксибензоказина, 10 мкМ H_2O_2 , 20 мМ NaBr, 200 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 24 мМ Na-цитратный буфер, pH 6,0. Через 30 минут инкубации в термошейкере при 37 °С и 270 об/мин измеряли флуоресценцию резору-

фина при 580-620 нм (возбуждение 535-555 нм) с помощью планшетного монохроматорного флуориметр-люминометр-спектрофотометра (CLARIOstar, BMG LABTECH, Германия). Калибровочный график зависимости интенсивности флуоресценции I от [МРО] обрабатывали в программе MS Excel 2002 как биномиальную функцию $I = a[\text{МРО}]^2 + b[\text{МРО}] + c$ (коэффициент детерминированности R^2 , нормированный от 0 до 1, составлял не менее 0,97). Вычисляли активность МРО в плазме с учетом разбавления образца и выражали ее как нг/мл очищенной МРО.

Статистическая обработка результатов

Эксперименты повторяли три раза ($n = 3$), среднее значение рассчитывали по формуле:

$$X_m = (1 / n) \sum X_i,$$

где X_i — значение для каждого измерения. Стандартную ошибку выражали как S^*/n , где

$$S^* = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_m)^2}{(n-1)}}.$$

Для определения параметров корреляции использовали коэффициент корреляции Пирсона (r).

Результаты

Были исследованы: содержание СР и СР-НОСІ, МРО (РА) и МРО (НА), концентрация МРО и Σ (РА) в 69 образцах плазмы крови доноров с различной степенью тяжести сердечно-сосудистых заболеваний (табл. 1).

Был проведен анализ корреляционных связей измеренных показателей (табл. 2). Концентрация МРО была связана положительной корреляционной связью с МРО (НА) ($r = 0,87$, $p < 0,0001$, рис. 1А) и МРО (РА) ($r = 0,51$, $p < 0,0001$). Концентрация СР-НОСІ была связана положительной корреляционной связью с концентрацией МРО ($r = 0,76$, $p < 0,0001$, рис. 1Б) и с МРО (НА) ($r = 0,80$, $p < 0,0001$, рис. 1В). В качестве показателя удельной активности МРО было использовано отношение концентрации МРО к Σ (РА), оцененной по окислению *o*-дианизидина. Продемонстрирована положительная корреляционная связь данного показателя с концентрацией СР-НОСІ ($r = 0,86$, $p < 0,0001$, рис. 1Г). Интересно, что концентрация СР и Σ (РА) не коррелировала ни с одним из перечисленных показателей.

ТАБЛИЦА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ, ИЗМЕРЕННЫХ В ОБРАЗЦАХ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. GENERAL CHARACTERISTICS OF THE MARKERS MEASURED IN BLOOD SAMPLES OF PATIENTS

Показатель – обозначение, единицы измерения Marker: abbreviations, units	Среднее $\pm$ стандартная ошибка Mean $\pm$ standard error	Медиана (минимальное – максимальное значение) Median (minimum – maximum value)
Концентрация МРО – МРО, нг/мл MPO concentration: MPO, ng/ml	137,3 $\pm$ 56,9	116,4 (37,1-680,4)
Галогенирующая активность МРО – МРО (НА), нг/мл Halogenating activity of MPO: MPO (NA), ng/ml	71,2 $\pm$ 62,7	44,3 (3,2-662,1)
Пероксидазная активность МРО – МРО (РА), 1/мин Peroxidase activity of MPO: MPO (PA), 1/min	0,0776 $\pm$ 0,0575	0,0559 (0-0,364)
Общая пероксидазная активность – Σ (РА), 1/мин Total Peroxidase activity: Σ (PA), 1/min	0,715 $\pm$ 0,181	0,713 (0,178-1,215)
Концентрация СР – СР, мкг/мл CP concentration: CP, μ g/ml	312 $\pm$ 93	305 (65-613)
Концентрация СР, модифицированного НОСІ – СР-НОСІ, нг/мл Concentration of HOCl-modified CP: CP-HOCl, ng/ml	65 $\pm$ 63	23 (1-344)
Отношение концентрации МРО к общей пероксидазной активности – МРО/ Σ (РА), нг $\times$ мин/мл Ratio of MPO concentration and total peroxidase activity: MPO/ Σ (PA), ng $\times$ min/mL	212 $\pm$ 103	171 (59-857)

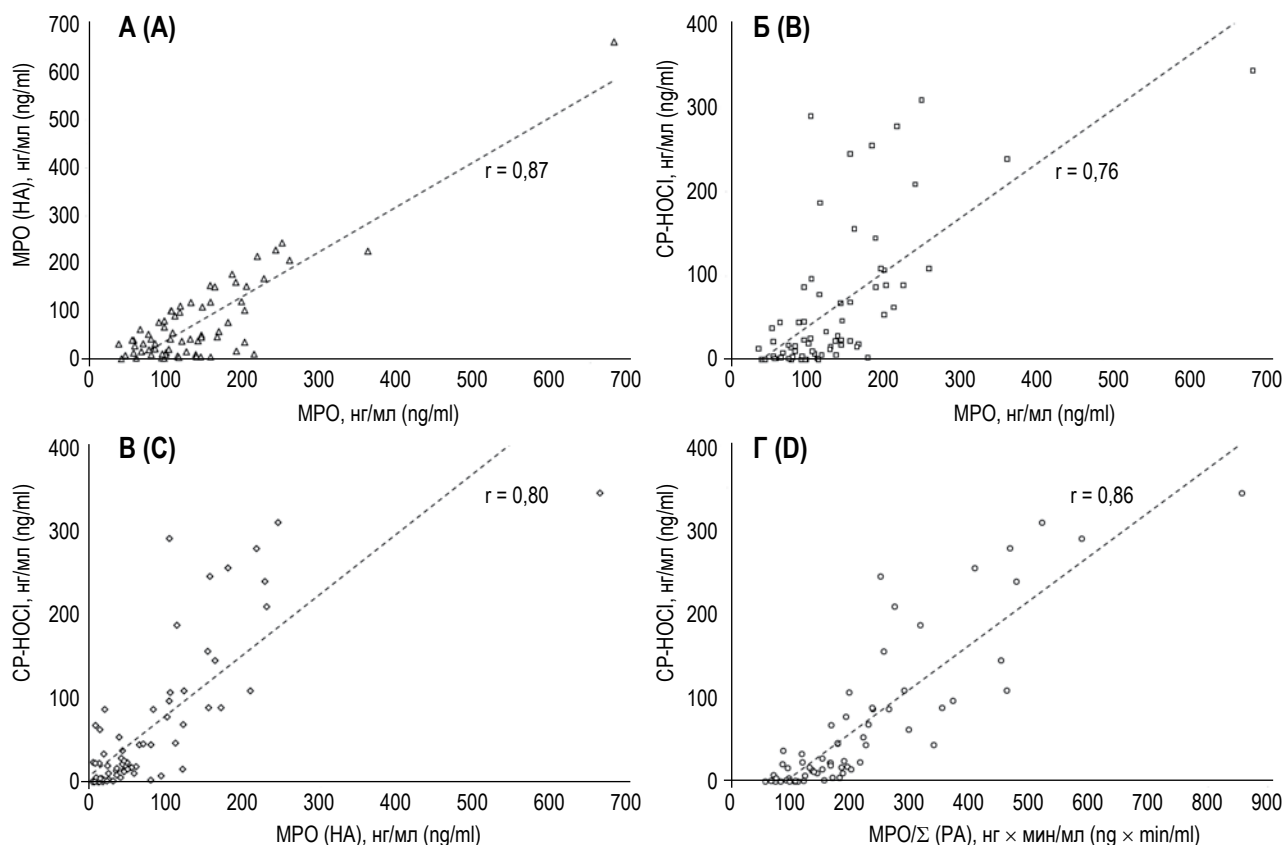


Рисунок 1. Графики зависимости галогенирующей активности МРО от концентрации МРО (А); СР, модифицированного HOCl, от концентрации МРО (Б); СР, модифицированного HOCl, от галогенирующей активности МРО (В); СР, модифицированного HOCl, от отношения концентрации МРО к общей пероксидазной активности плазмы крови (Г)

Figure 1. Dependence plots between halogenating activity of MPO and its concentration (A); concentration of HOCl-modified CP and concentration of MPO (B); concentration of HOCl-modified CP and halogenating MPO activity (C); concentration of HOCl-modified CP, and a ratio between MPO concentration and total peroxidase activity (D)

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ МАТРИЦА ИЗМЕРЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

TABLE 2. CORRELATION MATRIX OF THE MEASURED MARKERS

	МРО	МРО (НА)	МРО (РА)	Σ (РА)	СР	СР-НОСІ
МРО (НА)	$r = 0,87$; $p < 0,0001$	—				
МРО (РА)	$r = 0,51$; $p < 0,001$	$r = 0,47$; $p < 0,0001$	—			
Σ (РА)	$r = 0,00$; $p = 0,61$	$r = -0,19$; $p = 0,11$	$r = 0,32$; $p = 0,05$	—		
СР	$r = 0,42$; $p = 0,01$	$r = 0,20$; $p = 0,09$	$r = 0,04$; $p = 0,83$	$r = 0,07$; $p = 0,69$	—	
СР-НОСІ	$r = 0,76$; $p < 0,0001$	$r = 0,80$; $p < 0,0001$	$r = 0,26$; $p = 0,1119$	$r = -0,26$; $p = 0,11$	$r = 0,31$; $p = 0,05$	—
МРО/Σ (РА)	$r = 0,89$; $p < 0,0001$	$r = 0,84$; $p < 0,0001$	$r = 0,29$; $p = 0,07$	$r = -0,31$; $p = 0,06$	$r = 0,40$; $p = 0,01$	$r = 0,86$; $p < 0,0001$

Примечание. Обозначения столбцов и строк см. в таблице 1, в ячейках представлены значения коэффициента корреляции Пирсона.

Note. For abbreviated names of columns and rows, see Table 1. The cells represent values of Pearson correlation quotient.

Обсуждение

Ранее нами было показано, что концентрация МРО повышена у пациентов с острым коронарным синдромом по сравнению со здоровыми донорами, а прогрессивное снижение МРО (РА) в процессе тромболитической терапии коррелирует с благоприятным исходом заболевания [4]. Нами были разработаны оригинальные методы оценки МРО (РА) и МРО (НА), а также содержания МРО, иммуноферментный анализ для оценки концентрации СР-НОСІ. Наличие специфической МРО (НА) позволило разработать упрощенный вариант иммуноферментного анализа, в котором после сорбции МРО на твердой фазе возможно выявление активности МРО [8]. Этот подход существенно сокращает время анализа. В прототипе метода с помощью 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина выявлялась МРО (РА), адсорбированной на антителах [20], однако, как показали наши эксперименты, бромлирующая активность МРО практически не подавляется СР [32] и, следовательно, окисление ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина под действием НОВr, продуцируемой МРО, более адекватно отражает концентрацию МРО. Это подтверждается достоверной корреляционной связью между концентрацией МРО и МРО (НА) (рис. 1А). Обнаружение комплексов, включающих СР и МРО, в плазме пациентов с атеросклерозом [27] предполагало возможность образования при сердечно-сосудистых заболеваниях СР, модифицированного НОСІ — основным продуктом катализа МРО, однако только в данном исследовании впервые удалось обнаружить хлорированный СР в плазме крови больных с сердечно-сосудистой недостаточностью.

При сопоставлении измеренных показателей на репрезентативном количестве образцов плазмы крови ($n = 69$) от пациентов с различной степенью тяжести сердечно-сосудистых заболеваний нам удалось проследить ряд корреляционных связей, хорошо согласующихся с данными, полученными на экспериментальных моделях исследования ферментативных свойств МРО. Во-первых, МРО (РА) в плазме крови положительно коррелирует с концентрацией МРО и МРО (НА). Во-вторых, получена положительная корреляционная зависимость между концентрацией МРО и показателем галогенирующего стресса (концентрация СР, модифицированного НОСІ) и отношением концентрации МРО к Σ (РА). Ранее нами было показано, что по мере иммунопреципитации СР из плазмы крови снижается эффективность ингибирования плазмой МРО (РА) [33]. Обращает на себя внимание факт, что концентрации МРО и СР-НОСІ довольно близки, такой результат можно объяснить тем,

что комплекс между МРО и СР в плазме крови относительно стабилен [27], и, вероятнее всего, при окислительном/галогенирующем стрессе у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями модификации подвергается СР, находящийся в непосредственном контакте с МРО.

Важно отметить, что концентрация СР, измеренная по степени окисления его синтетического субстрата *p*-фенилендиамина, не коррелирует ни с одним из перечисленных показателей. Данный факт подтверждает важность определения целостности полипептидной цепи СР, а не его концентрации, поскольку именно интактность СР определяет эффективное ингибирование активности МРО [9, 28, 32]. Например, степень протеолиза СР в синовиальной жидкости коррелирует с тяжестью симптомов ревматоидного артрита [26]. Нами было показано, что СР взаимодействует с протеиназами нейтрофилов и матриксными металлопротеиназами 2 и 12, что также способствует расщеплению его полипептидной цепи [10, 11, 12]. Разработка методов количественной оценки непротеолизованного СР представляется перспективной и может быть реализована при получении моноклональных антител против участков СР, подвергающихся протеолитической деградации при воспалении. Учитывая, что при физиологических условиях МРО также способна катализировать образование бромноватистой кислоты (НОВr) [34], представляется перспективным получение антител против СР, модифицированного НОВr, с целью анализа модификации белка этим оксидантом.

На роль регуляторов активности МРО, кроме СР, претендуют низкомолекулярные соединения (тиоцианат, тирозин, глутатион и урат) [36], в будущем определение их концентрации в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями может дополнить картину регуляции развития галогенирующего стресса, опосредованного активностью МРО и других гемсодержащих пероксидаз человека.

Благодарности

Авторы выражают благодарность профессору В.Н. Кокрякову (ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины») за любезно предоставленную лейкоцитарную массу здоровых доноров, благодарность за предоставленные образцы плазмы и сыворотки крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями — профессору Л.З. Полонецкому (РНПЦ «Кардиология»). Планшетный монохроматорный флуориметр-люминометр-спектрофотометр (CLARIOstar, BMG LABTECH, Германия) получен при поддержке программы РМН Human Proteome.

Список литературы / References

1. Белик И.В., Иванцова А.А., Мамедова З.Э., Денисенко А.Д. Содержание антител к модифицированным липопротеинами низкой плотности и их комплексов в крови пациентов с различными проявлениями атеросклероза // Биомедицинская химия, 2016. Т. 62. С. 471-475. [Belik I.V., Ivantsova A.A., Mamedova Z.E., Denisenko A.D. Antibodies against modified low-density lipoproteins and their complexes in blood of patients with various manifestations of atherosclerosis. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2016, Vol. 62, pp. 471-475. (In Russ.)]
2. Буненков Н.С., Комок В.В., Соколов А.В., Немков А.С. Новые возможности оценки интраоперационного ишемически-реперфузионного повреждения миокарда при операциях реваскуляризации в условиях искусственного кровообращения и на работающем сердце // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского, 2017. Т. 16, № 2. С. 40-48. [Bunenko N.S., Komok V.V., Sokolov A.V., Nemkov A.S. New methods of intraoperative evaluation of myocardial ischemic-reperfusion injury during on- and off-pump coronary artery bypass grafting. *Klinicheskaya i eksperimental'naya khirurgiya. Zhurnal imeni Akademika B.V. Petrovskogo = Clinical and Experimental. Surgery Petrovsky Journal*, 2017, Vol. 16, no. 2, pp. 40-48. (In Russ.)]
3. Горудко И.В., Черкалина О.С., Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. Новые подходы к определению концентрации и пероксидазной активности миелопероксидазы в плазме крови человека // Биоорганическая химия, 2009. Т. 35. С. 629-639. [Gorudko I.V., Cherkalina O.S., Sokolov A.V., Pulina M.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Cherenkevich S.N., Panasenکو O.M. New approaches to the measurement of the concentration and peroxidase activity of myeloperoxidase in human blood plasma. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry*, 2009, Vol. 35, pp. 629-639. (In Russ.)]
4. Григорьева Д.В., Горудко И.В., Костевич В.А., Соколов А.В., Буко И.В., Васильев В.Б., Полонецкий Л.З., Панасенко О.М., Черенкевич С.Н. Активность миелопероксидазы в плазме крови как критерий эффективности лечения пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями // Биомедицинская химия, 2016. Т. 62. С. 318-324. [Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Kostevich V.A., Sokolov A.V., Buko I.V., Vasilyev V.B., Polonetsky L.Z., Panasenکو O.M., Cherenkevich S.N. Myeloperoxidase activity in blood plasma as a criterion of therapy for patients with cardiovascular disease. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2016, Vol. 62, pp. 318-324. (In Russ.)]
5. Григорьева Д.В., Горудко И.В., Соколов А.В., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Буко И.В., Константинова Е.Э., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. Определение пероксидазной активности гемоглобина в плазме крови // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013. Т. 155, № 9. С. 129-132. [Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Sokolov A.V., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F., Buko I.V., Konstantinova E.E., Cherenkevich S.N., Panasenکو O.M. Measurement of plasma hemoglobin peroxidase activity. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2013, Vol. 155, no. 9, pp. 129-132. (In Russ.)]
6. Михальчик Е.В., Смолина Н.В., Астамирова Т.С., Горудко И.В., Григорьева Д.В., Иванов В.А., Соколов А.В., Костевич В.А., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. Альбумин сыворотки крови, модифицированный в условиях окислительного/галогенирующего стресса, усиливает люминол-зависимую хемилюминесценцию нейтрофилов человека // Биофизика, 2013. Т. 58. С. 681-689. [Mikhalkhik E.V., Smolina N.V., Astamirova T.S., Gorudko I.V., Grigoryeva D.V., Ivanov V.A., Sokolov A.V., Kostevich V.A., Cherenkevich S.N., Panasenکو O.M. Human serum albumin modified under oxidative/halogenative stress enhances luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *Biofizika = Biophysics*, 2013, Vol. 58, pp. 681-689. (In Russ.)]
7. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах // Успехи биологической химии, 2013. Т. 53. С. 195-244. [Panasenکو O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry*, 2013, Vol. 53, pp. 195-244. (In Russ.)]
8. Панасенко О.М., Михальчик Е.В., Горудко И.В., Григорьева Д.В., Соколов А.В., Костевич В.А., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н. Влияние антиоксидантов и сквенджеров гипохалогидных кислот на активацию нейтрофилов липопротеинами низкой плотности, модифицированными гипохлоритом // Биофизика, 2016. Т. 61. С. 500-509. [Panasenکو O.M., Mikhalkhik E.V., Gorudko I.V., Grigorieva D.V., Sokolov A.V., Kostevich V.A., Vasilyev V.B., Cherenkevich S.N. The effects of antioxidants and hypohalous acid scavengers on neutrophil activation by hypochlorous acid-modified low-density lipoproteins. *Biofizika = Biophysics*, 2016, Vol. 61, pp. 500-509. (In Russ.)]
9. Панасенко О.М., Чеканов А.В., Власова И.И., Соколов А.В., Агеева К.В., Пулина М.О., Черкалина О.С., Васильев В.Б. Влияние церулоплазмينا и лактоферрина на хлорирующую активность лейкоцитарной миелопероксидазы. Изучение методом хемилюминесценции // Биофизика, 2008. Т. 53. С. 573-581. [Panasenکو O.M., Chekanov A.V., Vlasova I.I., Sokolov A.V., Ageeva K.V., Pulina M.O., Cherkalina O.S., Vasilyev V.B. A study of the effect of ceruloplasmin and lactoferrin on the chlorination activity of leukocytic myeloperoxidase using the chemiluminescence method. *Biofizika = Biophysics*, 2008, Vol. 53, pp. 573-581. (In Russ.)]

10. Соколов А.В., Агеева К.В., Костевич В.А., Берлов М.Н., Рунова О.Л., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. Исследование взаимодействия церулоплазмينا с серпроцидинами // Биохимия, 2010. Т. 75. С. 1544-1552. [Sokolov A.V., Ageeva K.V., Kostevich V.A., Berlov M.N., Runova O.L., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. Study of interaction of ceruloplasmin with serprocidins. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2010, Vol. 75, pp. 1544-1552. (In Russ.)]
11. Соколов А.В., Пулина М.О., Агеева К.В., Рунова О.Л., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. Идентификация катионных белков лейкоцитов, взаимодействующих с церулоплазмином // Биохимия, 2007. Т. 72. С. 1072-1077. [Sokolov A.V., Pulina M.O., Ageeva K.V., Runova O.L., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. Identification of leukocyte cationic proteins that interact with ceruloplasmin. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2007, Vol. 72, pp. 1072-1077. (In Russ.)]
12. Соколов А.В., Пулина М.О., Агеева К.В., Черкалина О.С., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. Идентификация комплексов церулоплазмينا с матриксными металлопротеиназами 2 и 12 // Биохимия, 2009. Т. 74. С. 1703-1708. [Sokolov A.V., Pulina M.O., Ageeva K.V., Cherkalina O.S., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. Identification of complexes formed by ceruloplasmin with matrix metalloproteinases 2 and 12. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2009, Vol. 74, pp. 1703-1708. (In Russ.)]
13. Соколов А.В., Костевич В.А., Романико Д.Н., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. Двухстадийный метод получения церулоплазмينا на основе его взаимодействия с неомицином // Биохимия, 2012. Т. 77. С. 775-784. [Sokolov A.V., Kostevich V.A., Romanico D.N., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. Two-stage method for purification of ceruloplasmin based on its interaction with neomycin. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2012, Vol. 77, pp. 775-784. (In Russ.)]
14. Bakkenist A.R., Wever R., Vulsma T., Plat H., van Gelder B.F. Isolation procedure and some properties of myeloperoxidase from human leucocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, Vol. 524, pp. 45-54.
15. Baldus S., Heeschen C., Meinertz T., Zeiher A.M., Eiserich J.P., Münzel T., Simoons M.L., Hamm C.W. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 2003, Vol. 108, pp. 1440-1445.
16. Beers R.F.Jr., Sizer I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 1952, Vol. 195, pp. 133-140.
17. Daugherty A., Dunn J.L., Rateri D.L., Heinecke J.W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.*, 1994, Vol. 94, pp. 437-444.
18. Davis B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, Vol. 121, pp. 404-427.
19. Fling S.P., Gregerson D.S. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.*, 1986, Vol. 155, pp. 83-88.
20. Franck T., Minguet G., Delporte C., Derochette S., Zouaoui Boudjeltia K., van Antwerpen P., Gach O., Deby-Dupont G., Mouithys-Mickalad A., Serteyn D. An immunological method to combine the measurement of active and total myeloperoxidase on the same biological fluid, and its application in finding inhibitors which interact directly with the enzyme. *Free Radic. Res.*, 2015, Vol. 49, pp. 790-799.
21. Gorudko I.V., Grigorieva D.V., Shamova E.V., Kostevich V.A., Sokolov A.V., Mikhalechik E.V., Cherenkevich S.N., Arnhold J., Panasenکو O.M. Hypohalous acid-modified human serum albumin induces neutrophil NADPH-oxidase activation, degranulation and shape change. *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, Vol. 68, pp. 326-334.
22. Morris J.C. The acid ionization constant of HOCl from 5° to 35°. *J. Phys. Chem.*, 1966, Vol. 70, pp. 3798-3805.
23. Noyer M., Dwulet F.E., Hao Y.L., Putnam F.W. Purification and characterization of undegraded human ceruloplasmin. *Anal. Biochem.*, 1980, Vol. 102, pp. 450-458.
24. Samygina V.R., Sokolov A.V., Bourenkov G., Petoukhov M.V., Pulina M.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Bartunik H., Svergun D.I. Ceruloplasmin: macromolecular assemblies with iron-containing acute phase proteins. *PLoS ONE*, 2013. Vol. 8, e67145. doi: 10.1371/journal.pone.0067145.
25. Schultz J., Kaminker K. Myeloperoxidase of the leukocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, Vol. 96, pp. 465-467.
26. Sokolov A.V., Acquasaliente L., Kostevich V.A., Frasson R., Zakharova E.T., Pontarollo G., Vasilyev V.B., de Filippis V. Thrombin inhibits the anti-myeloperoxidase and ferroxidase functions of ceruloplasmin: relevance in rheumatoid arthritis. *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, Vol. 86, pp. 279-294.
27. Sokolov A.V., Ageeva K.V., Cherkalina O.S., Pulina M.O., Zakharova E.T., Prozorovskii V.N., Aksenov D.V., Vasilyev V.B., Panasenکو O.M. Identification and properties of complexes formed by myeloperoxidase with lipoproteins and ceruloplasmin. *Chem. Phys. Lipids*, 2010, Vol. 163, pp. 347-355.
28. Sokolov A.V., Ageeva K.V., Pulina M.O., Cherkalina O.S., Samygina V.R., Vlasova I.I., Panasenکو O.M., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. Ceruloplasmin and myeloperoxidase in complex affect the enzymatic properties of each other. *Free Radic. Res.*, 2008, Vol. 42, pp. 989-998.

29. Sokolov A.V., Chekanov A.V., Kostevich V.A., Aksenov D.V., Vasilyev V.B., Panasenکو O.M. Revealing binding sites for myeloperoxidase on the surface of human low density lipoproteins. *Chem. Phys. Lipids*, 2011, Vol. 164, pp. 49-53.
30. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Kozlov S.O., Donskyi I.S., Vlasova I.I., Rudenko A.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Panasenکو O.M. Kinetic method for assaying the halogenating activity of myeloperoxidase based on reaction of celestine blue B with taurine halogenamines. *Free Radic. Res.*, 2015, Vol. 49, pp. 777-789.
31. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Runova O.L., Gorudko I.V., Vasilyev V.B., Cherenkevich S.N., Panasenکو O.M. Proatherogenic modification of LDL by surface-bound myeloperoxidase. *Chem. Phys. Lipids*, 2014, Vol. 180, pp. 72-80.
32. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Zakharova E.T., Samygina V.R., Panasenکو O.M., Vasilyev V.B. Interaction of ceruloplasmin with eosinophil peroxidase as compared to its interplay with myeloperoxidase: Reciprocal effect on enzymatic properties. *Free Radic. Res.*, 2015, Vol. 49, pp. 800-811.
33. Sokolov A.V., Zakharova E.T., Kostevich V.A., Samygina V.R., Vasilyev V.B. Lactoferrin, myeloperoxidase, and ceruloplasmin: complementary gearwheels cranking physiological and pathological processes. *Biomaterials*, 2014, Vol. 27, pp. 815-828.
34. van Dalen C.J., Whitehouse M.W., Winterbourn C.C., Kettle A.J. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *Biochem. J.*, 1997, Vol. 327, pp. 487-492.
35. Varfolomeeva E.Y., Semenova E.V., Sokolov A.V., Aplin K.D., Timofeeva K.E., Vasilyev V.B., Filatov M.V. Ceruloplasmin decreases respiratory burst reaction during pregnancy. *Free Radic. Res.*, 2016, Vol. 50, pp. 909-919.
36. Vlasova I.I., Sokolov A.V., Arnhold J. The free amino acid tyrosine enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase. *J. Inorg. Biochem.*, 2012, Vol. 106, pp. 76-83.

Авторы:

Соколов А.В. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией биохимической генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; отдел биофизики ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» России, Москва; кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; отдел биохимических исследований, Центр доклинических трансляционных исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Костевич В.А. — к.б.н., научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; отдел биофизики ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» России, Москва, Россия

Authors:

Sokolov A.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Biochemical Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Department of Biophysics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow; Department of Fundamental Problems of Medicine, St. Petersburg State University; Department of Biochemical Research, Centre of Preclinical Translational Research, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Kostevich V.A., PhD (Biology), Research Associate, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Department of Biophysics Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Горбунов Н.П. — аспирант, младший научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Григорьева Д.В. — к.б.н., старший научный сотрудник кафедры биофизики, Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

Горудко И.В. — к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики, Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

Васильев В.Б. — д.м.н., профессор, заведующий отделом молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Панасенко О.М. — д.б.н., профессор, заведующий отделом биофизики ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» России; отдел медицинской биофизики ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Gorbunov N.P., Postgraduate Student, Junior Research Associate, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Grigorieva D.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Biophysics, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Gorudko I.V., PhD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Department of Biophysics, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Vasilyev V.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine; Department of Fundamental Problems of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Panasenko O.M., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Biophysics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency; Department of Medical Biophysics, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 12.10.2017
Отправлена на доработку 16.10.2017
Принята к печати 23.10.2017

Received 12.10.2017
Revision received 16.10.2017
Accepted 23.10.2017

ЦИРКУЛЯТОРНЫЙ СЕКРЕТОРНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИН А ПРИ СЕПТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Мальцева Н.В.¹, Лапутенко Т.А.², Архипова С.В.³, Смирнова А.Ш.¹,
Лыкова О.Ф.¹, Горбатовский Я.А.¹, Мещерякова О.А.⁴

¹ Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

² ООО «МЕДИКА-2», г. Новокузнецк, Россия

³ ГБУЗ Кемеровской области «Новокузнецкая городская клиническая больница № 29», г. Новокузнецк, Россия

⁴ ГБУЗ Кемеровской области «Новокузнецкая городская клиническая больница № 1», г. Новокузнецк, Россия

Резюме. Недостаточность локального иммунитета может играть немаловажную роль в патогенезе сепсиса, а значит, и септического (острого) инфекционного эндокардита (ИЭ). В работе исследовали содержание секреторного иммуноглобулина А (sIgA) в сыворотке крови пациентов обоего пола с сепсисом (26 женщин и 32 мужчины), острым (11 женщин и 23 мужчины) и подострым (7 женщин и 13 мужчин) ИЭ в зависимости от локализации очага инфицирования (ангиогенный или неангиогенный), исхода заболевания и носительства генотипических вариантов локуса гена глутатион-S-трансферазы *Пи1* (*GSTP1*^{Ile105Val}). В качестве группы контроля обследовали лиц, не имеющих признаков очаговой и системной инфекции и не страдающих артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца (25 женщин и 24 мужчины). В работе применяли иммуноферментный анализ и аллель-специфическую полимеразную цепную реакцию. Найдено, что при большой индивидуальной вариабельности концентрации sIgA в сыворотке крови при сепсисе и ИЭ у большинства больных наблюдается значительное (в среднем в 4 раза) ее повышение в сравнении с контролем, как у мужчин, так и у женщин, особенно выраженное при остром течении ИЭ (в среднем в 5 раз в сравнении с контролем). Подострый ИЭ характеризуется меньшим количеством sIgA в циркуляции, чем острый ИЭ и сепсис, что можно использовать при ранней дифференциальной диагностике данных нозологий. Гендерных различий в содержании sIgA не обнаружено. При сепсисе с неангиогенным источником инфекции уровень sIgA был выше, чем при ангиогенном инфицировании. Не обнаружено его связи с выживаемостью (летальностью), что исключает тестируемый показатель из числа прогностических маркеров сепсиса и ИЭ. Носительство гетерозиготного генотипа *GSTP1*^{Ile105Val} усиливает риск развития сепсиса и ИЭ независимо от варианта его течения, а гомозиготный генотип *GSTP1*^{Ile105Ile} предрасполагает к более высокому содержанию иммуноглобулина в циркуляции, чем генотип *GSTP1*^{Val105Val}. Таким образом, широкий диапазон индивидуальной вариабельности уровня sIgA в циркуляции при сепсисе и инфекционном эндокардите может быть обусловлен локализацией очага инфицирования и генетическими факторами.

Ключевые слова: сепсис, острый и подострый инфекционный эндокардит, сывороточный секреторный IgA, локус гена *GSTP1*^{Ile105Val}

Адрес для переписки:

Мальцева Нина Васильевна
Новокузнецкий государственный институт
усовершенствования врачей
654005, Россия, г. Новокузнецк, пр. Строителей, 5.
Тел.: 8 (3843) 45-56-41.
Факс: 8 (3843) 45-42-19.
E-mail: ninamaltseva2015@mail.ru

Address for correspondence:

Mal'tseva Nina V.
Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical
Education
654005, Russian Federation, Novokuznetsk, Stroiteley ave, 5.
Phone: 7 (3843) 45-56-41.
Fax: 7 (3843) 45-42-19.
E-mail: ninamaltseva2015@mail.ru

Образец цитирования:

Н.В. Мальцева, Т.А. Лапутенко, С.В. Архипова,
А.Ш. Смирнова, О.Ф. Лыкова, Я.А. Горбатовский,
О.А. Мещерякова «Циркуляторный секреторный
иммуноглобулин А при септических заболеваниях»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5.
С. 711–720. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-711-720
© Мальцева Н.В. и соавт., 2018

For citation:

N.V. Mal'tseva, T.A. Laputenko, S.V. Arkhipova, A.Sh. Smirnova,
O.F. Lykova, Ya.A. Gorbatskiy, O.A. Meshcheryakova
“Circulating secretory immunoglobulin A in septic disorders”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2018, Vol. 20, no. 5, pp. 711–720.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-711-720
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-711-720

CIRCULATING SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A IN SEPTIC DISORDERS

Mal'tseva N.V.^a, Laputenko T.A.^b, Arkhipova S.V.^c, Smirnova A.Sh.^a,
Lykova O.F.^a, Gorbatskiy Ya.A.^a, Meshcheryakova O.A.^d

^a Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education – Branch of Russian Medical Academy for Permanent Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

^b MEDICA-2 LLC, Novokuznetsk, Russian Federation

^c Kemerovo Regional Novokuznetsk Municipal Clinical Hospital No. 29, Novokuznetsk, Russian Federation

^d Novokuznetsk City Clinical Hospital No. 1, Novokuznetsk, Russian Federation

Abstract. Insufficiency of local immunity can play an important role in pathogenesis of sepsis, including septic (acute) infectious endocarditis (IE). The paper presents data on secretory immunoglobulin A (sIgA) contents in blood serum of patients with sepsis (26 women and 32 men), acute (11 women and 23 men) and subacute (7 women and 13 men) IE, depending on localization of the infection site (angiogenic or non-angiogenic), outcome of the disease and carriage of glutathione-S-transferase P1 gene variants (*GSTP1*^{Ile105Val}). A control group consisted of 25 women and 24 men without hypertension and ischemic heart disease and lacking evidence of focal and systemic infection, was examined. Laboratory studies were performed with enzyme immunoassay and allele-specific polymerase chain reaction. We have found that, despite large individual variability of serum sIgA concentration in sepsis and infectious endocarditis, the majority of patients had a significant (on average, 4-fold) IgA increase against controls, in both men and women, especially in acute IE (a mean of 5-fold over control values). Subacute infectious endocarditis is associated with lesser sIgA in circulation than acute IE and sepsis, which may be used for early differential diagnosis of these conditions. There were no gender differences in sIgA contents. In sepsis with non-angiogenic source of infection, the sIgA levels were higher than in angiogenic infection. There was no association of sIgA level with survival (mortality), which excludes this index from predictive markers in sepsis and IE. Carriage of heterozygous *GSTP1*^{Ile105Val} genotype increases the risk of sepsis and IE development, regardless of clinical course, and homozygous genotype *GSTP1*^{Ile105Ile} is associated with higher contents of circulating immunoglobulin than in carriers of *GSTP1*^{Val105Val} genotype. Thus, a wide range of individual variability in of circulating sIgA levels in patients with sepsis and infective endocarditis may be connected with location of infection source and genetic factors.

Keywords: sepsis, acute and subacute infective endocarditis, serum secretory IgA, gene locus *GSTP1*^{Ile105Val}

Введение

Сепсис и инфекционный эндокардит (ИЭ) относятся к наиболее тяжелой патологии человека и нередко развиваются как осложнение хирургических, гинекологических, урологических заболеваний, манипуляций на сердце. Известно, что ИЭ формируется в результате действия факторов, предрасполагающих эндотелий к инфицированию и развитию разрушающего эндокарда воспаления. Острый ИЭ, расцениваемый как сепсис [1], характеризуется интоксикацией, наличием вегетаций на клапанах сердца и быстрым развитием клапанной деструкции. При подостром инфекционном эндокардите, вызываемом менее вирулентными возбудителями, наблюдаются не столь выраженные интоксикация и иммунные нарушения.

Выявление иммуносупрессии, развивающейся при тяжелом сепсисе, привело к необходимости измерения количества эндогенных иммуноглобулинов для возможности прогнозирования исхода болезни. В большинстве исследований обычно определяют содержание IgG-, IgM-,

IgA-классов. Их уровни в плазме крови, сниженные до определенных значений, могут указывать на повышенную вероятность неблагоприятного исхода заболевания [7, 9, 20]. Иммунологический мониторинг предлагается использовать для своевременного и персонализированного прогноза септических заболеваний [10], а препараты иммуноглобулинов — в качестве дополнительной терапии при сепсисе или септическом шоке [15].

Немаловажную роль в патогенезе сепсиса может играть и локальный иммунитет. Иммунная система слизистых оболочек, как иммунциты, так и гуморальные факторы, препятствует проникновению микробов в *l. propria*. Иммунная составляющая мукозального барьера, как первая линия защиты слизистых оболочек кишечника, респираторного тракта и др. от инвазии патогенов, представлена, прежде всего, секреторным IgA (sIgA), который, как известно, осуществляет нейтрализацию вирусов, бактерий и токсинов, ингибирует адгезию микробов к слизистой оболочке [21]. Дисфункция мукозального барьера на любом уровне способна привести к воспалению и повреждению тканей [8]. Недостаточность

по sIgA может играть важную роль в патофизиологии сепсиса, т.к. повышается транслокация бактерий и токсинов в низлежащие ткани и системную циркуляцию, что ведет к развитию вторичных инфекций и множественной органной недостаточности [17]. Таким образом, sIgA может участвовать в патогенезе сепсиса, однако соответствующие исследования немногочисленны, отсутствует количественная характеристика sIgA при инфекционном эндокардите.

В связи с тем, что sIgA обнаруживается в периферической крови [3] и его продукция может зависеть от гена глутатион-S-трансферазы Пи1 (*GSTP1*) [2], кодирующего фермент GSTP1, способный защищать эндотелий от токсических соединений [11], **целью работы** явилось определение уровня sIgA в сыворотке крови пациентов с сепсисом и инфекционным эндокардитом как носителей различных генотипических вариантов полиморфизма *GSTP1*^{Ile105Val}, связанного с риском развития инфекционного эндокардита [4, 5].

Материалы и методы

Обследовано 54 пациента в возрасте от 26 до 75 лет, находившихся на стационарном лечении в терапевтических клиниках г. Новокузнецка с диагнозом «инфекционный эндокардит», выставленным на основании критериев DUKE. У 34 пациентов (11 женщин и 23 мужчины) было диагностировано острое течение заболевания (оИЭ) — значительная часть из них принимала наркотики внутривенно и у 27 человек обнаружено поражение трикуспидального клапана сердца (ТК). Один человек в этой группе страдал хронической болезнью почек с необходимостью проведения гемодиализа. У трех больных выявлен ревматический порок митрального и аортального клапанов сердца (МК, АК) и проведено протезирование клапанов. Врожденные пороки сердца, пролапс митрального клапана 2-3 степени с систолическим шумом обнаружены у двух пациентов, у одного пациента эндокардит с поражением ТК развился на фоне тяжелой вирусной инфекции. У 20 пациентов (7 женщин и 13 мужчин) диагностировано подострое течение ИЭ (п/оИЭ). В этой группе поражение АК выявлено у 9 человек, у 4 больных инфицирован МК, у 5 пациентов обнаружено сочетанное поражение клапанов МК и АК, у одного больного, принимавшего наркотики внутривенно, — МК и ТК. В данной группе страдали ревматическими пороками сердца пять пациентов, у трех из них выявлен врожденный порок сердца (ВПС). Проведено протезирование клапанов (МК и АК) четырем больным, МК и ТК — одному пациенту, у трех пациентов оперированы АК и МК по поводу ВПС.

У всех больных ИЭ неоднократно проводилось исследование крови на стерильность. У 26

больных выявлены *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus viridans*, у 5 человек — другие возбудители (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*). У остальных больных инфекционный агент не был обнаружен, в основном в группе с подострым течением заболевания, в которой пациенты принимали антибактериальные препараты на амбулаторном этапе лечения.

У пациентов следующей группы в количестве 58 человек (26 женщин и 32 мужчины) диагностирован сепсис на основании критериев Sofa. Основная часть пациентов этой группы находилась в отделении интенсивной терапии, отделениях хирургического профиля после оперативного лечения. Из них 23 пациента оперированы по поводу острой хирургической патологии ЖКТ (холецистит, деструктивный панкреатит, кишечная непроходимость, аппендицит с развитием перитонита). У 9 человек сепсис развился на фоне внутривенного приема наркотиков (ангиогенный сепсис), у 26 человек — другие источники инфекции (неангиогенный сепсис — гнойные процессы кожи и подкожной клетчатки, патология мочеполовой системы, ЖКТ).

Все пациенты получали антибактериальную терапию — антибиотики широкого спектра действия, антикоагулянтную и симптоматическую терапию по показаниям. Смертность госпитализированных пациентов с сепсисом составила 29%, а больных с оИЭ — 13%.

В группу контроля включены 49 лиц в возрасте от 27 до 74 лет (25 женщин и 24 мужчины), не имеющих признаков очаговой и системной инфекции и не страдающих артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца.

Все обследованные лица проживали на территории Кемеровской области и были русскими. Забор крови и молекулярно-генетические исследования проводились на основании их информированного согласия.

Забор образцов периферической крови у больных ИЭ проводили на 2-4 день и у больных сепсисом — в течение 1-2 недель после госпитализации. Выделение сыворотки проводили стандартно. Для выделения геномной ДНК забирали по 3 мл цельной венозной крови в стандартные стерильные вакуумные одноразовые пластиковые пробирки, содержащие ЭДТА-К3 (IMPROVE, Китай). ДНК выделяли с помощью коммерческого реагента «ДНК-экспресс-кровь-плюс» или «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ «Литех», Москва). Генотипирование осуществляли по полиморфному локусу *rs1695* (нуклеотидная замена *GSTP1*^{313A > G}, аминокислотная замена *GSTP1*^{Ile105Val}, альтернативное название *GSTP1*^{1105V}) гена *GSTP1* с использованием соответствующих комплектов реагентов для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека «SNP-экспресс» (НПФ «Литех», Мо-

сква) с помощью метода аллель-специфической полимеразной реакции.

В образцах сывороток крови определяли концентрацию секреторного иммуноглобулина А (sIgA) методом твердофазного иммуноферментного анализа на иммуноферментном автоматическом анализаторе Лазурит (Dynex Technol., США) с использованием стандартного набора реагентов IgA секреторный-ИФА-БЕСТ А-8668 (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Математическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакетов статистических программ InStatII, Microsoft Excel. Стандартная обработка включала подсчет выборки (n — количество обследованных лиц), средних арифметических величин (M), стандартных ошибок среднего (m), 95%-ного доверительного интервала (95% CI). Значимость различий показателей между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (p). Корреляционную связь между показателями оценивали с помощью непараметрического критерия Спирмена (r). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты

Содержание sIgA в сыворотке крови обследованных лиц

Анализ показал (табл. 1), что в отличие от группы контроля, в которой концентрация sIgA варьировала от 0,9 до 5,9 мг/л у обследованных лиц, у больных ИЭ она составила более широкий диапазон и с более высокими граничными значениями — от 3 мг/л до 23 мг/л. При этом только у девяти (17%) человек с ИЭ она была меньше 5,9 мг/л, т.е. меньше верхней границы диапазона группы контроля и меньше ориентировочной верхней границы нормы (5,47 мг/л), приведенной в инструкции к используемому набору реагентов А-8668, в соответствии с которой интервал концентрации sIgA в сыворотке крови здоровых доноров составляет 1,69–5,47 мг/л (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). У остальных пациентов с ИЭ (45 человек, 83%) искомая концентрация ($14,5 \pm 0,8$ мг/л, диапазон значений 5,94–22,5 мг/л) была больше в сравнении с контролем в среднем в 4,5 раза ($p < 0,0001$). В среднем уровень иммуноглобулина в группе с ИЭ был выше, чем в контроле, в 4 раза ($p < 0,0001$).

При анализе концентрации sIgA в группе больных ИЭ с учетом варианта течения заболевания было обнаружено, что она была самой высокой у лиц с оИЭ — в среднем выше соответствующего значения у лиц с п/оИЭ в 1,5 раза ($p < 0,05$), а по сравнению с контролем — в 5 раз ($p < 0,0001$). У 2 (6%) человек с оИЭ концентрация sIgA составила 4,3 мг/л и 5,1 мг/л, у остальных (32 человека,

94%) — статистически значимо выше нормы, колеблясь от 5,9 мг/л до 22,5 мг/л (среднее значение $15,4 \pm 0,9$ мг/л, $n = 32$, $p < 0,0001$ в сравнении с контролем).

В группе лиц с подострым течением ИЭ у семи (35%) человек концентрация sIgA варьировала от 3,0 до 5,2 мг/л, у остальных тринадцати (65%) человек превышала максимальный показатель контроля, 5,9 мг/л, составляя интервал от 6,7 мг/л до 21,8 мг/л, в среднем больше, чем в группе контроля, в 3 раза ($p < 0,0001$), но меньше, чем в группе с оИЭ, в 1,5 раза ($p < 0,05$).

Хотя индивидуальная вариабельность тестируемого показателя была сходной при оИЭ и п/оИЭ (табл. 1), отмечено, что у 25 человек (81%) с оИЭ концентрация иммуноглобулина была выше 10 мг/л, а в группе лиц с подострым течением заболевания у подавляющего большинства больных п/оИЭ (14 человек, 78%) концентрация этого белка была меньше 10 мг/л, что возможно использовать при ранней дифференциальной диагностике данных нозологий. Подтверждением такой возможности является дополнительный аргумент в виде найденной достоверной положительной корреляционной связи между концентрацией sIgA и диагнозом оИЭ среди обследованных лиц с оИЭ и п/оИЭ (коэффициент корреляции Спирмена равен 0,4084, $n = 54$, $p = 0,0022$). Соответственно, между концентрацией sIgA и установленным диагнозом п/оИЭ выявлена отрицательная корреляционная связь (коэффициент корреляции Спирмена равен -0,4084, $n = 54$, $p = 0,0022$).

Гендерных различий в содержании sIgA у обследуемых больных ИЭ не обнаружено. Как у мужчин, так и у женщин наблюдался повышенный уровень иммуноглобулина при разном варианте течения ИЭ в сравнении с контролем, а при остром течении — больше, чем при подостром, в среднем в 1,5 раза ($p < 0,05$).

При сепсисе (табл. 1) количество sIgA в сыворотке крови, как у мужчин, так и у женщин, было также существенно выше, чем в контроле — в среднем в 4 раза ($p < 0,0001$). Размах данного показателя в исследованной выборке находился в сходном с ИЭ диапазоне значений. У 21 (38%) пациента из 58 обследованных больных выявлено более 5,9 мг/л sIgA, максимального значения в группе контроля. Статистически значимых различий между группами с сепсисом и ИЭ по тестируемому показателю не было обнаружено, однако сравнение выборок значений sIgA при подостром течении ИЭ и сепсисе позволило их выявить — при п/оИЭ уровень иммуноглобулина меньше, чем при сепсисе, как у мужчин, так и у женщин ($p < 0,05$).

Таким образом, развитие инфекционного эндокардита и сепсиса сопровождается значитель-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ sIgA (мг/л) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛИЦ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ ЭНДОКАРДИТЕ (ИЭ), ОСТРОМ (оИЭ) И ПОДОСТРОМ (п/оИЭ), И СЕПСИСЕ

TABLE 1. CONTENTS OF sIgA (mg/l) IN BLOOD SERUM OF INDIVIDUALS WITH INFECTIVE ENDOCARDITIS (IE), ACUTE (aIE) AND SUBACUTE (saIE) CLINICAL COURSE, AND SEPSIS

ИЭ IE	оИЭ aIE	п/оИЭ saIE	Сепсис Sepsis	Сепсис + оИЭ Sepsis + aIE	Контроль Control
1	2	3	4	5	6
Все обследованные лица All the persons under study					
12,8±0,98* (54) 2,99-22,5** p ₆ < 0,0001	14,8±0,98 (34) 4,3-22,5 p ₃ = 0,0030 p ₆ < 0,0001	9,5±1,4 (20) 2,99-21,8 p ₄ = 0,0368 p ₅ = 0,0081 p ₆ < 0,0001	12,6±0,8 (58) 2,7-22,8 p ₆ < 0,0001	13,4±0,7 (92) 2,7-22,8 p ₆ < 0,0001	3,2±0,3 (49) 0,9-5,9
Мужчины Men					
13,4±1,1 (36) 4,3-22,5 p ₆ < 0,0001	15,2±1,2 (23) 4,3-22,5 p ₃ = 0,0562, p _{с3} = 0,0254 p ₆ < 0,0001	10,3±1,8 (13) 4,9-21,8 p ₆ < 0,0001 p ₅ = 0,0681	12,9±1,3 (32) 3,6-22,8 p ₆ < 0,0001	14,2±0,9 (55) 3,6-22,8 p ₆ < 0,0001	3,6±0,5 (24) 0,9-5,9
Женщины Women					
11,6±1,5 (18) 2,99-22,3 p ₆ < 0,0001	13,9±1,7 (11) 5,9-22,3 p ₃ = 0,0346 p ₆ < 0,0001	8,0±2,1 (7) 2,99-19,0 p ₆ = 0,0019 p ₅ = 0,079	11,7±1,2 (26) 2,7-22,1 p ₆ < 0,0001	12,3±1,0 (37) 2,7-22,3 p ₆ < 0,0001	2,7±0,2 (25) 1,3-5,7

Примечание. В этой и последующих таблицах результаты представлены построчно как M±m (*), в круглых скобках количество образцов сыворотки крови, разброс данных от минимального до максимального значения (**); p – критерий Манна–Уитни, цифровое/буквенное обозначение рядом с p указывает на сравниваемую группу; p_с – критерий Стьюдента, рассчитанный при условии нормального распределения выборки.

Note. In this and the following tables, the results are consequently shown as M±m (*); in parentheses, number of serum samples, data ranging from minimal to maximal values (**); p, Mann–Whitney test, a numerical/next to p indicates to the compared group; p_с is a difference by Student's test calculated under the condition of a normal distribution of the sample.

ным повышением сывороточного уровня sIgA в сравнении с контролем, как у мужчин, так и у женщин, особенно выраженным при остром течении ИЭ. Подострое течение ИЭ характеризуется меньшим количеством sIgA в циркуляции, чем острый ИЭ и сепсис, что можно использовать для расширения спектра лабораторно-диагностических тестов при ранней дифференциальной диагностике данных нозологий.

Уровень сывороточного sIgA при разных исходах и очагах инфекции

Летальный исход в клинике при сепсисе (29%) оказался выше, чем при оИЭ (13%) (p = 0,0404), и зависел от возраста. Так, возраст умерших от сепсиса (n = 18) составил 60,3±3,7 лет, а возраст выживших (n = 32) – 47,3±2,6 лет (p = 0,0141), но концентрация сывороточного sIgA у этих больных варьировала в сходных пределах и в среднем составила, соответствен-

но, 12,1±1,4 мг/л и 12,3±1,2 мг/л (p > 0,05). При оИЭ исход заболевания не зависел от возраста – средний возраст умерших составил 32,8±2,4 года (n = 5) и у выживших – 34,7±1,3 лет (n = 27), (p > 0,05), и также не выявлено различий в уровне иммуноглобулина. Данные, представленные в таблице 2, показывают, что сывороточный уровень sIgA не связан с исходом заболевания.

Влияние очага заражения на уровень sIgA найдено лишь в группе с сепсисом, в которой неангиогенное инфицирование приводило к большему содержанию иммуноглобулина в циркуляции (14,3±1,3 мг/л, n = 21, диапазон значений 3,8-22,8 мг/л), чем ангиогенное (10,4±1,3 мг/л, n = 25, диапазон значений 2,7-22,1 мг/л, p = 0,0325). В группе с ИЭ уровень иммуноглобулина не зависел от локализации предполагаемого источника инфекции.

Поиск ассоциации полиморфизма *GSTP1*^{Ile105Val} с риском развития исследуемых заболеваний

В группах пациентов с сепсисом и ИЭ разного течения в сравнении с группой контроля преобладали гетерозиготные носители полиморфизма *GSTP1*^{Ile105Val}, то есть такое носительство может predisполагать к повышению риска развития не только ИЭ [12], как острого, так и подострого течения, но и сепсиса, что подтверждено статистически (табл. 3).

Уровень сывороточного sIgA при носительстве различных генотипов локуса *GSTP1*^{Ile105Val} и разном исходе исследуемых заболеваний

Выявлено, что уровень сывороточного sIgA связан с носительством генотипических вариантов локуса *GSTP1*^{Ile105Val} (табл. 4). Генотип *GSTP1*^{Ile105Ile} predisполагает к более высокому содержанию иммуноглобулина в циркуляции, чем генотип *GSTP1*^{Val105Val}, у пациентов с сепсисом и оИЭ ($p_{II/VV} = 0,0542$), что также подтверждается отрицательной достоверной корреляционной связью содержания sIgA с носительством генотипа *GSTP1*^{Val105Val} ($r = -0,391$ $p_r = 0,022$). Хотя связи уровня иммуноглобулина с исходом болезни при носительстве различных вариантов *GSTP1*^{Ile105Val} не выявлено, все же максимальный уровень sIgA в данном исследовании был обнаружен у выжив-

ших гетерозигот с оИЭ ($15,9 \pm 1,0$ мг/л, диапазон варибельности 6,4–22,5 мг/л).

Обсуждение

До сих пор остается невыясненным, почему одни и те же микроорганизмы могут вызывать в организме воспалительный процесс разной степени тяжести — от локальных поражений у одних пациентов до септических состояний, нередко осложненных смертельно опасным инфекционным эндокардитом, у других. Одним из predisполагающих факторов риска генерализации инфекции является снижение общего и, возможно, локального иммунитета. В представленной работе оценено содержание секреторного IgA в сыворотке крови больных с инфекционным эндокардитом острого и подострого течения и сепсисом без инфекционного поражения эндокарда. При известной гиперактивации В-звена иммунной системы при сепсисе и ИЭ содержание sIgA в циркуляции при ИЭ и его остром и подостром течении оценено нами впервые. Оно широко варьировало в исследованных выборках как при ИЭ, так и при сепсисе, значительно превышая сывороточный уровень sIgA у здоровых лиц как в среднем, так и в интервале индивидуальной варибельности. Выявлено, что подострый ИЭ у большинства пациентов характеризуется

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ sIgA (мг/л) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛИЦ ПРИ РАЗНОМ ИСХОДЕ ОСТРОГО ИНФЕКЦИОННОГО ЭНДОКАРДИТА (оИЭ) И СЕПСИСА

TABLE 2. SERUM sIgA CONTENTS (mg/l) IN THE EXAMINED INDIVIDUALS WITH DIFFERENT OUTCOMES OF ACUTE INFECTIVE ENDOCARDITIS (aIE) AND SEPSIS

оИЭ aIE		Сепсис Sepsis		Сепсис + оИЭ Sepsis + aIE	
Умерли Died	Выжили Survived	Умерли Died	Выжили Survived	Умерли Died	Выжили Survived
1	2	3	4	5	6
Все обследованные лица All the persons under study					
14,0±2,5 (7) 5,9-21,3	15,0±1,1 (27) 4,3-22,5	12,5±1,4 (17) 5,3-22,4	12,7±1,1 (42) 2,7-22,8	13,0±1,2 (24) 5,3-22,4	13,6±0,8 (69) 2,7-22,8
Мужчины Men					
15,4±2,4 (6) 6,5-21,3	15,1±1,4 (17) 4,3-22,5	12,6±2,0 (10) 5,2-22,4	13,8±1,5 (22) 3,6-22,8	13,6±1,5 (16) 5,2-22,4	14,4±1,1 (39) 3,6-22,8
Женщины Women					
5,94 (1)	14,7±1,7 (10) 7,9-22,3	12,4±2,0 (7) 5,4-21,4	11,3±1,4 (20) 2,7-22,1	10,9±1,9 (8) 5,4-21,4	12,5±1,1 (30) 2,7-22,3

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА $GSTP1^{Ile105Val}$ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛИЦ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ ЭНДОКАРДИТЕ (ИЭ), ОСТРОМ (оИЭ) И ПОДОСТРОМ (п/оИЭ), И СЕПСИСЕ

TABLE 3. FREQUENCY OF THE $GSTP1^{Ile105Val}$ GENOTYPES IN INDIVIDUALS WITH INFECTIVE ENDOCARDITIS (IE), ACUTE (aIE) AND SUBACUTE (saIE) CLINICAL COURSE, AND SEPSIS

ИЭ IE	оИЭ aIE	п/оИЭ saIE	Сепсис Sepsis	Сепсис + оИЭ Sepsis + aIE	Контроль Control
1	2	3	4	5	6
Генотип $GSTP1^{Ile105Ile}$ $GSTP1^{Ile105Ile}$ genotype					
14* [25]** $p_7 = 0,0445$ OR = 0,4229 (0,2-0,9)	8 [24] $p_7 = 0,0443$ OR = 0,3718 (0,1-0,9)	6 [30]	17 [30]	25 [28] $p_7 = 0,0446$ OR = 0,4647 (0,2-0,9)	24 [45]
Генотип $GSTP1^{Ile105Val}$ $GSTP1^{Ile105Val}$ genotype					
37 [69] $p_7 = 0,0002$ OR = 4,609 (2,0-10,4)	25 [74] $p_7 = 0,0002$ OR = 5,88 (2,3-15,3)	12 [60] $p_7 = 0,0358$ OR = 3,176 (1,1-9,2)	33 [59] $p_7 = 0,0070$ OR = 3,04 (1,4-6,7)	58 [64] $p_7 = 0,0002$ OR = 3,84 (1,9-7,9)	17 [32]
Генотип $GSTP1^{Val105Val}$ $GSTP1^{Val105Val}$ genotype					
3 [6] $p_7 = 0,0128$ OR = 0,2010 (0,1-0,8)	1 [2] $p_7 = 0,0131$ OR = 0,1035 (0,0-0,8)	2 [10]	6 [11]	7 [8] $p_7 = 0,0197$ OR = 0,2882 (0,1-0,8)	12 [23]

Примечание. * – число проанализированных вариантов генотипов; в квадратных скобках – в процентах; p – критерий Манна–Уитни, цифровое обозначение рядом с p указывает на сравниваемую группу; OR – соотношение шансов, в круглых скобках – 95%-ный доверительный интервал.

Note. * shows the number of patients with different genotypes; percentage of total group (in square brackets). p values reflect differences by the Mann–Whitney test; p values for specific groups are denoted by appropriate figures; OR, odds ratio and 95% confidence interval (in parentheses).

меньшими значениями этого иммуноглобулина в циркуляции, чем острый ИЭ и сепсис. Не обнаружено связи sIgA с выживаемостью (или летальностью) обследованных пациентов, что исключает данный показатель из числа прогностических маркеров сепсиса и ИЭ. Можно предположить, что такая связь имеет место лишь при тяжелом сепсисе/септическом шоке, когда низкие уровни в плазме эндогенных иммуноглобулинов других классов, общих IgG1, IgM и IgA, указывают на неблагоприятный прогноз [9].

Проведенное генотипирование больных ИЭ и сепсисом по полиморфному локусу $GSTP1^{Ile105Val}$ выявило накопление гетерозигот в группе пациентов с сепсисом, как и в группе с ИЭ [5], что позволяет сделать вывод об ассоциации риска развития сепсиса, а также ИЭ независимо от его нозологических форм, с гетерозиготным носительством данного полиморфизма. Лocus $GSTP1^{Ile105Val}$ может иметь отношение не только к риску развития септического заболевания, но и к его прогнозу и/или к эффективности лечения, поскольку генетически детерминированная высокая эффективность антиоксидантных ферментов, к которым относится и глутатион-S-

трансфераза P1, может способствовать лучшим терапевтическим результатам [6].

Большее содержание исследуемого иммуноглобулина у гомозигот $GSTP1^{Ile105Ile}$ в сравнении с гомозиготными носителями $GSTP1^{Val105Val}$ при остром ИЭ и сепсисе соответствует полученным нами ранее данным о сходной зависимости локального уровня секреторного иммуноглобулина А от полиморфизма $GSTP1^{Ile105Val}$ [2].

Таким образом, выявленный нами широкий диапазон индивидуальной вариативности уровня sIgA в циркуляции при исследуемых нозологиях может быть обусловлен и локализацией очага инфицирования (ангиогенный или неангиогенный) и генетическими факторами. Давно известно, что наблюдаемая в популяциях вариативность иммунного ответа наследуется [13] и зависит не только от генетического статуса системы HLA II класса [14, 16], но и от вариантов генов в других областях генома (*TACI*, *ICOS*, *BAFFR*, *CD81*, *CD20*, *CD19*, *CD21* и другие), определяющих дефекты в развитии В-клеток и формирование иммунодефицитов [18]. Около 30 генов участвуют в созревании В-клеток у человека [12, 19]. В литературе нами найдена работа, указы-

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО IgA (мг/л) У ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛИЦ ПРИ НОСИТЕЛЬСТВЕ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ЛОКУСА *GSTP1*^{ILE105VAL} И РАЗНОМ ИСХОДЕ ИССЛЕДУЕМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ИНФЕКЦИОННЫЙ ЭНДОКАРДИТ [ИЭ], ОСТРЫЙ [ОИЭ] И ПОДОСТРЫЙ [п/ОИЭ], И СЕПСИС)

TABLE 4. IgA CONTENT (mg/l) IN BLOOD SERUM OF THE EXAMINED INDIVIDUALS WITH CERTAIN *GSTP1*^{ILE105VAL} GENOTYPES AND DIFFERENT OUTCOMES OF THE DISEASES UNDER STUDY (INFECTIOUS ENDOCARDITIS [IE], ACUTE [aIE], AND SUBACUTE [s/aOIE], AND SEPSIS)

ИЭ IE	оИЭ aIE	п/оИЭ saIE	Сепсис Sepsis		Сепсис + оИЭ Sepsis + aIE		Контроль Control	
1	2		3	4		5	6	
Генотип <i>GSTP1</i> ^{Ile105Ile} <i>GSTP1</i> ^{Ile105Ile} genotype								
12,1±1,6 (14) 5,0-21,7 p ₆ < 0,0001 p _{IIIVV} = 0,0206	13,9±2,2 (8) 5,6-21,7 p ₆ = 0,0443		9,8±2,0 (6) 5,0-19,0	14,5±1,7 (17) 4,7-22,8		14,3±1,3 (25) 4,7-22,8 p ₆ = 0,0446 p _{IIIVV} = 0,0542		3,5±0,6 (18) 1,3-13,2
	Умерли Died	Выжили Survived		Умерли Died	Выжили Survived	Умерли Died	Выжили Survived	
	15,2±3,1 (4) 6,5-19,9	12,6±3,6 (4) 5,1-21,7		13,3±3,0 (6) 5,4-21,4	14,4±2,0 (12) 4,7-22,8	14,0±2,1 (10)	14,0±1,7 (16)	
Генотип <i>GSTP1</i> ^{Ile105Val} <i>GSTP1</i> ^{Ile105Val} genotype								
13,7±1,0 (37) 3,0-22,5 p ₆ < 0,0001 p _{IVVV} = 0,0168	15,5±1,0 (25) 5,9-22,5 p ₃ = 0,0143 p ₆ = 0,0002		10,0±2,1 (12) 3,0-21,8 p ₆ = 0,0358	12,1±1,1 (33) 2,7-22,4 p ₂ = 0,0462 p ₆ = 0,0070		13,6±0,8 (58) 2,7-22,5 p ₃ = 0,0487 p ₆ = 0,0002		2,9±0,3 (16) 1,4-5,5
	Умерли Died	Выжили Survived		Умерли Died	Выжили Survived	Умерли Died	Выжили Survived	
	12,5±4,6 (3) 6,0-21,3	15,9±1,0 (22) 6,4-22,5 p _{4выж} = 0,0523		12,6±1,7 (10) 5,2-22,4	11,9±1,4 (23) 2,7-22,1	12,6±1,6 (13) 5,2-22,4	13,9±0,9 (45) 2,7-22,5	
Генотип <i>GSTP1</i> ^{Val105Val} <i>GSTP1</i> ^{Val105Val} genotype								
5,1±1,1 (3) 3,8-7,3 p ₆ = 0,08	4,3 (1) p ₆ = 0,0131		5,6±1,8 (2) 3,8-7,3	10,8±2,8 (6) 4,3-19,7		9,9±2,6 (7) 4,3-19,7 r = -0,391 p _r = 0,022		3,2±0,3 (11) 1,7-5,5
	Умерли Died	Выжили Survived		Умерли Died	Выжили Survived	Умерли Died	Выжили Survived	
	0	4,3 (1)		5,6 (1)	11,8±3,2 (5) 4,3-19,7	5,6 (1)	10,6±2,9 (6) 4,3-19,7	

Примечание. В круглых скобках – количество обследованных лиц; r – коэффициент корреляция Спирмена; p_r – показатель статистической достоверности коэффициента.

Note. Numbers of examined persons are shown in parentheses; r, Spearman's correlation quotient; p_r, level of statistical significance of the quotient.

вающая на вовлечение глутатион-S-трансфераз двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* в регуляцию врожденных иммунных реакций на бактериальную инфекцию [22]. Авторы основываются на данных о повышении экспрессии

этих ферментов в гемоцитах моллюска после его инфицирования. Полученные нами результаты также могут подтверждать зависимость продукции иммуноглобулинов, в частности секреторного IgA, от активности антиоксидантного фермен-

та GSTP1, детерминируемой соответствующим геном, который, видимо, можно внести в список генов, имеющих отношение к иммунным механизмам развития тяжелых инфекций.

Заключение

Для инфекционного эндокардита и сепсиса характерно значительное повышение сывороточного уровня секреторного IgA в сравнении со здоровыми лицами, особенно выраженное при

остром течении ИЭ как у мужчин, так и у женщин. Содержание иммуноглобулина в циркуляции не зависит от пола, но может зависеть от очага инфицирования, а также от носительства генотипических вариантов гена *GSTP1*. У подавляющего большинства пациентов подострое течение ИЭ характеризуется меньшим количеством sIgA в циркуляции, чем острый ИЭ и сепсис, что можно использовать при ранней дифференциальной диагностике данных нозологий.

Список литературы / References

1. Виноградова Т.Л. Инфекционный эндокардит: современное течение // Клиницист, 2011. Т. 5, № 3. С. 4-9. [Vinogradova T.L. Infective endocarditis: modern course. *Klinitsist = Clinician*, 2011, Vol. 5, no. 3, pp. 4-9. (In Russ.)]
2. Мальцева Н.В., Лыкова О.Ф., Мельниченко М.А., Архипова С.В., Онищенко А.Л. Зависимость содержания иммуноглобулинов IgA и IgE в слезной жидкости от полиморфизмов гена глутатион-S-трансферазы-P1 у металлургов с офтальмопатологией // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 6. С. 609-616. [Mal'tseva N.V., Lykova O.F., Melnichenko M.A., Arkhipova S.V., Onishchenko A.L. The dependence of immunoglobulin IgA and IgE tear levels from glutathione-S-transferase P1 gene polymorphisms in steelworkers with ophtalmopathy. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, Vol. 13, no. 6, pp. 609-616. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2011-6-609-616.
3. Мальцева Н.В., Лыкова О.Ф., Морозова А.В., Архипова С.В., Горбатовский Я.А. Сывороточный секреторный иммуноглобулин А и полиморфизм Gln223Arg гена рецептора лептина при алкогольной и неалкогольной жировой болезнях печени // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 5. С. 465-472. [Mal'tseva N.V., Lykova O.F., Morozova A.V., Arkhipova S.V., Gorbatsvskiy Ya.A. Serum secretory immunoglobulin A and Gln223Arg polymorphism of the LEPR gene in alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 5, pp. 465-472. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-5-465-472.
4. Мальцева Н.В., Лапутенко Т.А., Лыкова О.Ф., Горбатовский Я.А. Полиморфизмы генов ферментов системы детоксикации ксенобиотиков и риск развития инфекционного эндокардита // Клиническая медицина, 2016. Т. 94, № 8. С. 596-600. [Mal'tseva N.V., Laputenko T.A., Lykova O.F., Gorbatsvskiy Ya.A. Polymorphisms of genes encoding enzymes of the xenobiotic detoxification system and the risk of infectious endocarditis. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*, 2016, Vol. 94, no. 8, pp. 596-600. (In Russ.)]
5. Мальцева Н.В., Лапутенко Т.А., Горбатовский Я.А. Связь инфекционного эндокардита с полиморфизмами генов ферментов фазы II системы детоксикации ксенобиотиков // Молекулярная медицина, 2017. Т. 15, № 2. С. 33-38. [Mal'tseva N.V., Laputenko T.A., Gorbatsvskiy Ya.A. Association of infective endocarditis with gene polymorphisms of the phase II xenobiotic detoxication system enzymes. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2017, Vol. 15, no. 2, pp. 33-38. (In Russ.)]
6. Alexoudi A., Zachaki S., Stavropoulou C., Gavrilis S., Spiliopoulou C., Papadodima S., Karageorgiou C.E., Sambani C. Possible implication of GSTP1 and NQO1 polymorphisms on natalizumab response in multiple sclerosis. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2016, Vol. 46, no. 6, pp. 586-591.
7. Almansa R., Wain J., Tamayo E., Andaluz-Ojeda D., Martin-Loeches I., Ramirez P., Fermejo-Martin J. Immunological monitoring to prevent and treat sepsis. *Crit. Care*, 2013, Vol. 17, no. 1, p. 109.
8. Baumgart D.C., Dignas A.U. Intestinal barrier function. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2002, Vol. 5, no. 6, pp. 685-694.
9. Bermejo-Martin J.F., Rodriguez-Fernandez A., Herrán-Monge R., Andaluz-Ojeda D., Muriel-Bombín A., Merino P., García-García M.M., Citores R., Gandía F., Almansa R., Blanco J. Immunoglobulins IgG1, IgM and IgA: a synergistic team influencing survival in sepsis. *J. Intern. Med.*, 2014, Vol. 276, no. 4, pp. 404-412.
10. Bermejo-Martin J.F., Giamarellos-Bourboulis E.J. Endogenous immunoglobulins and sepsis: New perspectives for guiding replacement therapies. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2015, no. 46, pp. 25-28.
11. Conklin D.J., Haberzettl P., Prough R.A., Bhatnagar A. Glutathione-S-transferase P protects against endothelial dysfunction induced by exposure to tobacco smoke. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2009, Vol. 296, no. 5, pp. 1586-1597.
12. Conley M.E., Broides A., Hernandez-Trujillo V., Howard V., Kanegane H., Miyawaki T., Shurtleff S.A. Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development. *J. Immunol. Rev.*, 2005, Vol. 203, no. 1, pp. 216-234.
13. Grundbacher F.J. Heritability estimates and genetic and environmental correlations for the human immunoglobulins G, M, and A. *Am. J. Hum. Genet.*, 1974, Vol. 26, no. 1, pp. 1-12.

14. Hammer C., Begemann M., McLaren P.J., Bartha I., Michel A., Klose B., Schmitt C., Waterboer T. Amino acid variation in HLA class II proteins is a major determinant of humoral response to common viruses. *Am. J. Hum. Genet.*, 2015, Vol. 97, no. 5, pp. 738-743.
15. Kreyman K.G., de Heer G., Nierhaus A., Kluge S. Use of polyclonal immunoglobulins as adjunctive therapy for sepsis or septic shock. *Am. J. Crit. Care*, 2007, Vol. 35, no. 12, pp. 2677-2685.
16. Lambert N.D., Haralambieva I.H., Kennedy R.B., Ovsyannikova I.G., Pankratz V.S., Poland G.A. Polymorphisms in HLA-DPB1 are associated with differences in Rubella virus – specific humoral immunity after vaccination. *J. Infect. Dis.*, 2015, Vol. 211, no. 6, pp. 898-905.
17. MacFie J., O'Boyle C., Mitchell C.J., Buckley P.M., Johnstone D., Sudworth P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut*, 1999, Vol. 45, no. 2, pp. 223-228.
18. McHeyzer-Williams M., Okitsu S., Wang N., McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, no. 12, pp. 24-34.
19. Minegishi Y., Rohrer J., Conley M.E. Recent progress in the diagnosis and treatment of patients with defects in early B-cell development. *Curr. Opin. Pediatr.*, 1999, no. 11, pp. 528-532.
20. Tamayo E., Fernández A., Almansa R., Carrasco E., Goncalves L., Heredia M., Andaluz-Ojeda D., March G., Rico L., Gómez-Herreras J.I., de Lejarazu R.O., Bermejo-Martin J.F. Beneficial role of endogenous immunoglobulin subclasses and isotypes in septic shock. *Am. J. Crit. Care*, 2012, Vol. 27, no. 6, pp. 616-622.
21. Tyler B.M., Cole M.F. Effect of IgA1 protease on the ability of secretory IgA1 antibodies to inhibit the adherence of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Immunol.*, 1998, Vol. 42, no. 7, pp. 503-508.
22. Wang C., Zhao J., Mu C., Wang Q., Wu H., Wang C. cDNA cloning and mRNA expression of four glutathione-S-transferase (GST) genes from *Mytilus galloprovincialis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 2013, Vol. 34, no. 2, pp. 697-703.

Авторы:

Мальцева Н.В. — д.б.н., заведующая научно-исследовательской лабораторией молекулярной биологии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Лапутенко Т.А. — врач-терапевт ООО «МЕДИКА-2», г. Новокузнецк, Россия

Архипова С.В. — к.м.н., врач-лаборант ГБУЗ Кемеровской области «Новокузнецкая городская клиническая больница № 29», г. Новокузнецк, Россия

Смирнова А.Ш. — младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной биологии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Лыкова О.Ф. — к.б.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной биологии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Горбатовский Я.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой терапии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Мещерякова О.А. — заведующая пульмонологическим отделением ГБУЗ Кемеровской области «Новокузнецкая городская клиническая больница № 1», г. Новокузнецк, Россия

Authors:

Mal'tseva N.V., PhD, MD (Biology), Head, Research Laboratory of Molecular Biology, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education — Branch of Russian Medical Academy for Permanent Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Laputenko T.A., Physician (Clinical Therapeutics), MEDICA-2 LLC, Novokuznetsk, Russian Federation

Arkhipova S.V., PhD (Medicine), Laboratory Assistant, Kemerovo Regional Novokuznetsk Municipal Clinical Hospital No. 29, Novokuznetsk, Russian Federation

Smirnova A.S., Junior Research Associate, Research Laboratory of Molecular Biology, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education — Branch of Russian Medical Academy for Permanent Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Lykova O.F., PhD (Biology), Leading Research Associate, Research Laboratory of Molecular Biology, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education — Branch of Russian Medical Academy for Permanent Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Gorbatovskiy Ya.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Therapy, Novokuznetsk State Institute for Postgraduate Medical Education — Branch of Russian Medical Academy for Permanent Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Meshcheryakova O.A., Head, Pulmonology Department, Kemerovo Regional Novokuznetsk City Clinical Hospital No. 1, Novokuznetsk, Russian Federation

Поступила 19.10.2017
Принята к печати 23.10.2017

Received 19.10.2017
Accepted 23.10.2017

ПОКАЗАТЕЛИ ПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ КАК ПРЕДИКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРОМ $TNF\alpha$ У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Петричук С.В.¹, Мирошкина Л.В.¹, Семикина Е.Л.^{1,4},
Топтыгина А.П.^{2,3}, Потапов А.С.¹, Цимбалова Е.Г.¹, Радыгина Т.В.¹

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Резюме. В работе проведено исследование популяций лимфоцитов периферической крови у детей с воспалительными заболеваниями кишечника, которым впервые была назначена терапия блокатором $TNF\alpha$ (инфликсимабом), с целью определения прогностической информативности иммунологических показателей в оценке эффективности лечения. Проведено комплексное обследование 70 детей с ВЗК в возрасте от 12 до 18 лет в динамике заболевания на фоне проводимого лечения (49 детей с БК, 21 ребенок с ЯК). Группу сравнения составили 50 практически здоровых детей аналогичного возраста, прошедших комплексное профилактическое обследование. В зависимости от терапевтического ответа к году применения биологической терапии, пациенты были разделены на две группы — со стойким положительным эффектом препарата и с нестабильным эффектом терапии. Определяли содержание основных и малых популяций лимфоцитов периферической крови до первого введения инфликсимаба. Иммунофенотипирование проводили методом многоцветной проточной цитофлуориметрии (FC 500) с использованием маркеров CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56, HLA-DR, CD5, CD161, CD127, CD25, CD294.

Получено: содержание В-лимфоцитов было достоверно снижено у детей с нестабильным эффектом терапии, у детей со стойким положительным эффектом уровень В-лимфоцитов не отличался от группы сравнения. Анализ состава В-лимфоцитов показал дисбаланс в соотношении В1- и В2-клеток с уменьшением содержания В1-клеток у пациентов с ВЗК относительно группы сравнения. При этом у пациентов с нестабильным эффектом выявлено значимое снижение популяции В2-клеток относительно группы сравнения и относительно группы со стойким эффектом. Количество НК-клеток у пациентов с ВЗК было снижено относительно группы сравнения. Оценка содержания субпопуляций Т-лимфоцитов выявила ряд особенностей у пациентов с минимальным терапевтическим эффектом — увеличение уровня активированных Т-хелперов ($CD4^+CD25^+CD127^{high}$) и Th17-лимфоцитов

Адрес для переписки:

Петричук Светлана Валентиновна
ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения РФ
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1
Тел.: 8 (499) 134-13-98.
Факс: 8 (499) 134-70-01.
E-mail: cito@list.ru

Address for correspondence:

Petrchuk Svetlana V.
National Medical Research Center of Children's Health
119991, Russian Federation, Moscow,
Lomonosovskiy ave, 2, bldg 1.
Phone: 7 (499) 134-13-98.
Fax: 7 (499) 134-70-01.
E-mail: cito@list.ru

Образец цитирования:

С.В. Петричук, Л.В. Мирошкина, Е.Л. Семикина,
А.П. Топтыгина, А.С. Потапов, Е.Г. Цимбалова,
Т.В. Радыгина «Показатели популяционного состава
лимфоцитов как предикторы эффективности терапии
ингибитором $TNF\alpha$ у детей с воспалительными
заболеваниями кишечника» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 5. С. 721–730.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-721-730
© Петричук С.В. и соавт., 2018

For citation:

S.V. Petrchuk, L.V. Miroshkina, E.L. Semikina, A.P. Topygina,
A.S. Potapov, E.G. Tsimbalova, T.V. Radygina "Indicators of
the lymphocyte subsets as efficiency predictors of therapy with
inhibitors of $TNF\alpha$ in children with inflammatory bowel disease",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2018, Vol. 20, no. 5, pp. 721–730.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-721-730

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-721-730

(CD3⁺CD4⁺CD161⁺) относительно детей со стойким эффектом терапии и группы сравнения. Кроме того, у детей с минимальным эффектом терапии уровень Treg в составе Т-хелперов оказался достоверно выше, чем в группе сравнения. Проведенный ROC-анализ выявил наиболее информативные показатели для групп с минимальным и стойким эффектом терапии и показал хорошее качество разделительной модели для относительного количества Th17-лимфоцитов, активированных Т-хелперов и В-лимфоцитов. Количество Th17-лимфоцитов (% от CD3⁺CD4⁺лимфоцитов) с высокой долей вероятности позволяет прогнозировать эффект терапии блокатором TNF α . Проведенные исследования позволяют рекомендовать включение оценки состояния клеточного иммунитета в мониторинг состояния пациентов с ВЗК.

Ключевые слова: популяции лимфоцитов, популяции CD4⁺ лимфоцитов, ВЗК, дети, инфликсимаб, эффективность терапии

INDICATORS OF THE LYMPHOCYTE SUBSETS AS EFFICIENCY PREDICTORS OF THERAPY WITH INHIBITORS OF TNF α IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Petrichuk S.V.^a, Miroshkina L.V.^a, Semikina E.L.^{a,d}, Toptygina A.P.^{b,c}, Potapov A.S.^a, Tsimbalova E.G.^a, Radygina T.V.^a

^a National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

^b G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^c M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. We have performed a study of blood lymphocyte subsets in children with inflammatory bowel disease (IBD), who were for the first time treated with TNF α blocker (infliximab). Our aim was to determine prognostic informative value of the immunological parameters in order to assess the treatment efficiency. A comprehensive research included seventy children with IBD from 12 to 18 years old in the course of specific treatment (49 children with CD, 21 children with UC).

The comparison group consisted of fifty healthy children of similar age who were subjected to a similar detailed examination. The patients were divided into two groups, depending on their therapeutic response following 1 year of biological therapy: the first group showed a persistent positive effect of the drug, and the second group exhibited only unstable effects of the treatment. We determined the contents of major and small subpopulations of peripheral blood lymphocytes before the first administration of infliximab. Immunophenotyping was performed by multicolor flow cytometry (FC 500), using the CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56, HLA-DR, CD5, CD161, CD127, CD25, and CD294 markers.

We have revealed that the content of B lymphocytes was significantly reduced in children with unstable effects of therapy. By contrast, the B lymphocyte levels in children with persistent positive therapeutic effect did not differ from the comparison group. Analysis of the composition of the B lymphocyte profile showed an imbalance in the B1-to-B2 cell ratio, with decreased of B1 cell counts in IBD patients against the comparison group. In addition, the patients with unstable therapeutic effect showed a significant decrease in B2 cell numbers compared with a group with persistent effect and comparison group. The numbers of NK cells in IBD patients were found to be reduced against the comparison group. Assessment of T lymphocytes subsets revealed a number of features in the patients with minimal therapeutic effects, i.e., an increased level of activated T helper cells (CD4⁺CD25⁺CD127^{high}) and Th17 lymphocytes (CD3⁺CD4⁺CD161⁺), as compared to children with stable effect of treatment and to the comparison group. Moreover, in children with minimal effects of therapy, the levels of Tregs within T-helper cell subsets were significantly higher than in the comparison group. By means of ROC analysis, we have identified most informative parameters for the groups with minimal *versus* persistent therapeutic effect, and showed a good quality for a discrimination model involving relative amount of Th17 cells, activated T helper cells and B lymphocytes. The number of Th17 lymphocytes (% CD3⁺CD4⁺ lymphocytes) allowed to predict the effect of therapy with a TNF α blocker with high probability. The present study enables us to propose cellular immunity testing, as a promising tool for monitoring clinical state of IBD patients.

Keywords: lymphocytes subsets, CD4⁺ subsets, IBD, children, infliximab, efficiency of therapy

Введение

В последние годы наблюдается значительный рост интереса медицинского сообщества к проблеме воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), к которым, согласно МКБ-10, относят болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК). С одной стороны, это обусловлено непрекращающимся ростом заболеваемости ВЗК в мире со значительным «омоложением» популяции больных и нарастанием частоты инвалидирующих форм патологии. С другой стороны, накопление и систематизация информации об этиологии и патогенезе данных заболеваний позволили разработать инновационные методы диагностики и лечения ВЗК, кардинальным образом изменившие качество жизни пациентов [2, 13, 17, 26].

В настоящее время полагают, что развитие хронического воспаления при ВЗК обусловлено дисрегуляцией нормального иммунного ответа на комменсальную микрофлору кишечника у генетически предрасположенных лиц. Подобное неконтролируемое воспаление ассоциировано с гиперпродукцией провоспалительных цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-17, IL-6, IL-8) и активацией ряда клеточных популяций. Иммуногистохимическое исследование поврежденных участков кишечника при ВЗК выявило массивную инфильтрацию стенки кишки активированными Т-хелперами и Th17-лимфоцитами, обусловленную их интенсивной пролиферацией на фоне снижения восприимчивости к сигналам апоптоза. В то же время у пациентов с ВЗК выявляется компенсаторное увеличение содержания Treg-лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки воспаленного сегмента кишки [23].

В связи с особенностями патогенеза терапия ВЗК направлена на подавление воспалительного процесса. Применение иммунодепрессантов, селективно ингибирующих отдельные звенья патогенеза, в частности связывающих TNF α , позволило совершить прорыв в терапии аутоиммунных заболеваний, в том числе ВЗК. Терапия химерными моноклональными IgG₁ антителами, блокирующими TNF α (инфликсимаб — ИНФ), при ВЗК значительно увеличивает долю пациентов, достигающих стабильной ремиссии в короткие сроки. Однако у 30% пациентов наблюдается первичная неэффективность ИНФ, а к году терапии доля пациентов с потерей ответа достигает 50% [1, 25].

Поиск маркеров эффективности ИНФ позволил выявить ряд факторов, обладающих прогностической значимостью: к ним, например, относятся клиничко-анамнестические данные (форма патологии, возраст и т.д.), некоторые лабораторные и фармакокинетические показатели, напри-

мер уровень С-реактивного белка, содержание антинейтрофильных антител, уровень TNF α , остаточная концентрация инфликсимаба, титр антител к препарату [3, 4, 22, 27, 28].

Данные предикторы обладают рядом ограничений — определяются однократно, не позволяют провести оценку прогноза до начала лечения и разрабатывались в основном для взрослых пациентов. Вместе с тем ранний прогноз эффективности ИНФ позволяет провести своевременную коррекцию схемы лечения, тем самым существенно снизить риск экстренных хирургических вмешательств и серьезных осложнений ВЗК, что особенно важно в детском возрасте.

Информативность показателей популяционного состава лимфоцитов была продемонстрирована на примере циркулирующих Treg у взрослых пациентов с БК [11, 18, 24]. Аналогичных работ у детей с ВЗК до настоящего времени не проводилось.

С учетом особенностей патогенеза ВЗК и характера терапии, направленной на регуляцию работы иммунной системы, исследование иммунологических показателей у пациентов детского возраста, которым была назначена терапия блокаторами TNF α , представляется крайне актуальным.

Материалы и методы

Проведено комплексное обследование 70 детей с ВЗК в возрасте от 12 до 17 лет 11 месяцев (40 мальчиков и 30 девочек) в динамике заболевания на фоне проводимого лечения. У 49 детей была диагностирована БК, у 21 ребенка — ЯК. Длительность наблюдений составила от полугода до 5 лет. Диагнозы устанавливались на основании анамнестических, клиничко-лабораторных, эндоскопических и гистологических данных. Группу сравнения составили 50 практически здоровых детей (28 мальчиков и 22 девочки) в возрасте от 12 до 16 лет, прошедших комплексное профилактическое обследование.

Все больные, вошедшие в исследование, получали патогенетическую и симптоматическую терапию в соответствии с существующими стандартами лечения.

В зависимости от терапевтического ответа на ИНФ все пациенты, вошедшие в исследование, были поделены на две группы — группа детей со стойким положительным эффектом препарата и пациенты с нестабильным эффектом терапии.

Критериями включения пациента в группу со стойким положительным эффектом биологической терапии (группа 1) были выбраны следующие показатели: клиничко-эндоскопическая ремиссия заболевания либо минимальная степень воспалительной активности в течение года при-

менения ИНФ по стандартной схеме введения (5мг/кг, 0–2–6 недель, далее каждые 8 недель).

В группу с недостаточным эффектом биологической терапии (группа 2) были отнесены пациенты с клинико-лабораторными и эндоскопическими признаками активного воспаления через год терапии по стандартной схеме введения, пациенты, достигшие ремиссии при эскалации дозы ИНФ, а также дети, развившие острую аллергическую реакцию на введение препарата.

Сравнение клинического и эндоскопического индексов активности заболевания, а также стандартных лабораторных критериев воспаления до начала терапии не выявило различий между группой 1 и группой 2.

Для выявления значимости показателей клеточного иммунитета в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с ВЗК определяли субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови до первого введения ИНФ. В работе исследовали количественные характеристики основных и малых популяций лимфоцитов периферической крови.

Имунофенотипирование проводили методом многоцветной проточной цитофлуориметрии на приборе CYTOMICS FC 500 (BeckmanCoulter, США) с использованием меченных флуорохромами моноклональных антител согласно существующим рекомендациям [6]. В работе использовали моноклональные антитела производства Beckman Coulter (США) и Becton Dickinson (США): CD4-FITC, CD3-FITC, HLA-DR-FITC, CD8-PE, CD19-PE, CD(16+56)-PE, CD294-PE, CD127-PE, CD161-PE, CD3-PerCP, CD45-PerCP, CD45-PC5, CD45-PC7, CD5-PC7, CD25 PE-Cy7. Выделение лимфоидного региона проводили с учетом экспрессии CD45. В работе исследовали количественные характеристики основных и малых популяций лимфоцитов. Оценивали Т-клетки (CD3⁺), Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺), активированные Т-лимфоциты (CD3⁺HLA-DR⁺), В-лимфоциты (CD3⁺CD19⁺), В1-лимфоциты (CD3⁺CD19⁺CD5⁺), В2-лимфоциты (CD3⁺CD19⁺CD5⁺), NK-клетки (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), NKT-клетки (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), а также субпопуляции Т-хелперов: активированные Т-хелперы (Th act, CD4⁺CD25⁺CD127^{high}), регуляторные Т-клетки (Treg, CD4⁺CD25⁺CD127^{low}), Th2-лимфоциты (Th2, CD3⁺CD4⁺CD294⁺), Th17-лимфоциты (Th17, CD3⁺CD4⁺CD161⁺).

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с помощью пакета Statistica 6.0 (США). Данные в таблицах представлены в виде медианы (верхний – нижний квартиль). Достоверность различий между группами оценивали непараметрическим критерием Манна–Уитни.

Различия при $p < 0,05$ считались достоверными. Анализ диагностической значимости исследуемых иммунологических параметров, а также оценку уровня пороговых значений показателей осуществляли методом характеристических кривых (receiver operator characteristic, ROC-анализ) с использованием программы SPSS 16.0 (США).

Результаты

На первом этапе исследования оценивали содержание основных популяций лимфоцитов периферической крови у детей с ВЗК до начала биологической терапии и у детей группы сравнения.

Получено, что абсолютное количество Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов не отличалось в группах сравнения, при этом процент Т-лимфоцитов у пациентов с ВЗК был несколько выше, особенно у детей с нестабильным эффектом терапии (группа 2); изменений соотношения Т-хелперы/Т-цитотоксические лимфоциты не выявлено (табл. 1). Абсолютное число Т-лимфоцитов с фенотипом поздней активации CD3⁺HLA-DR⁺ у детей с ВЗК было выше, чем в группе сравнения.

При анализе содержания В-лимфоцитов выявлено достоверное снижение их уровня (по проценту и абсолютному числу) у детей группы 2 относительно группы сравнения и группы 1, тогда как у детей группы 1 (стойкий положительный эффект) уровень В-лимфоцитов не отличался от группы сравнения. Количество NK-клеток у пациентов группы 1 и группы 2 было снижено относительно группы сравнения (табл. 2). Различий в уровне NKT-клеток в изучаемых группах не отмечено.

В целом анализ основных популяций лимфоцитов у пациентов с разным эффектом ИНФ показал более низкий относительный и абсолютный уровень В-лимфоцитов у пациентов группы 2 (минимальный эффект терапии) по сравнению с детьми группы 1 (стойкий положительный эффект) (рис. 1).

Анализ субпопуляционного состава В-лимфоцитов показал дисбаланс в соотношении В1- и В2-клеток с уменьшением содержания В1-клеток у пациентов с ВЗК относительно группы сравнения. При этом у пациентов группы 2 выявлено значимое снижение популяции В2-клеток относительно группы сравнения и относительно группы 1.

Оценка содержания малых популяций Т-лимфоцитов выявила ряд особенностей у пациентов с минимальным терапевтическим эффектом (группа 2) – достоверное увеличение уровня активированных Т-хелперов (CD4⁺CD25⁺CD127^{high}) и Th17-лимфоцитов

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ВЗК ДО НАЧАЛА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. THE NUMBER OF MAJOR SUBSETS OF LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD IN CHILDRENS WITH IBD BEFORE START OF BIOLOGICAL THERAPY (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Популяции лимфоцитов Subsets of lymphocytes		Содержание клеток Number of cells		
		Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа сравнения Comparison group
CD3 ⁺	%	76,7 (71,2-83,7)*	79,1 (75,6-85,3)*	72,2 (67,1-76,0)
	кл/мм ³ cell/mm ³	1568 (1300-1838)	1468 (1025-2507)	1554 (1284-1850)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	47,0 (38,5-51,2)*	48,7 (42,2-52,3)*	40,9 (36,8-46,2)
	кл/мм ³ cell/mm ³	912 (673-1132)	875 (651-1466)	861 (764-1048)
CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	25,6 (22,7-33,0)	28,7 (22,3-34,5)*	25,8 (22,0-30,0)
	кл/мм ³ cell/mm ³	572 (415-730)	499 (387-933)	549 (468-712)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺		1,9 (1,4-2,1)	1,6 (1,2-2,3)	1,5 (1,3-2,0)
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	%	6,3 (3,4-14,3)	7,9 (5,8-14,6)*	6,1 (3,6-8,5)
	кл/мм ³ cell/mm ³	159 (66-318)*	180 (116-224)*	128 (73-169)
CD3 ⁺ CD19 ⁺	%	16,7 (7,7-20,2)#	10,1 (7,0-15,4)*	15,0 (12,4-17,0)
	кл/мм ³ cell/mm ³	330 (159-479)#	178 (117-359)*	304 (260-371)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	%	6,5 (5,5-9,5)*	7,2 (2,7-14,2)*	13,6 (8,6-18,3)
	кл/мм ³ cell/mm ³	145 (98-226)*	137 (41-258)*	253 (185-380)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	%	2,1 (1,4-4,4)	3,0 (1,8-4,8)	1,9 (1,3-2,9)
	кл/мм ³ cell/mm ³	61 (29-78)	51 (28-108)	43 (29-58)

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно группы сравнения; # – $p < 0,05$ при сравнении группы 1 и группы 2, тест Манн–Уитни.

Note. *, $p < 0.05$ the differences against comparison group; #, $p < 0.05$ the differences group 1 against group 2, Mann–Whitney test.

(CD3⁺CD4⁺CD161⁺) относительно группы 1 и группы сравнения. Снижения уровня Treg в обследованной когорте пациентов с ВЗК не выявлено, более того, у детей группы 2 уровень Treg в составе Т-хелперов оказался достоверно выше, чем в группе сравнения (табл. 3). Изменений в содержании Th2-лимфоцитов у детей с ВЗК относительно группы сравнения не выявлено.

Для выявления наиболее информативных показателей иммунофенотипа лимфоцитов в прогнозировании эффективности биологической терапии был проведен ROC-анализ полученных данных (табл. 4). Хорошее качество разделительной модели ($AUC > 0,7$) получено для относительного количества субпопуляций Th17-лимфоцитов, активированных Т-хелперов и В-лимфоцитов.

Наиболее значимым иммунологическим показателем, позволяющим с высокой вероятностью прогнозировать эффективность биологической терапии у детей с ВЗК, явилось исходное содержание Th17-лимфоцитов - $AUC = 0,857$ (0,769-0,945), $p < 0,05$ (рис. 2).

При этом было получено, что исходное относительное количество Th17-лимфоцитов (% от CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов), превышающее 18,6%, позволяет прогнозировать нестабильный эффект от инфликсимаба в течение первого года терапии (чувствительность – 70%, специфичность 87%, $p < 0,05$). В группе детей с нестабильным эффектом высокий уровень Th17-лимфоцитов сохранялся в течение всего 1 года терапии и на момент оценки эффекта терапии (8 инфузий препарата) составлял 24,1% (21,0-30,8) против 12,9 % (11,8-20,3) у детей со стойким эффектом ($p = 0,00014$).

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ ГРУППЫ 1 И ГРУППЫ 2 ДО НАЧАЛА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ И ДЕТЕЙ ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. THE NUMBER OF B-LYMPHOCYTES SUBSETS OF PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS OF GROUP 1 AND GROUP 2 BEFORE THE START OF BIOLOGICAL THERAPY AND CHILDREN IN THE COMPARISON GROUP (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Популяции В-лимфоцитов Subsets of lymphocytes		Содержание клеток Number of cells		
		Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа сравнения Comparison group
В1-лимфоциты B1 lymphocytes (CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁺)	%	2,0 (1,0-3,5)*	2,0 (0,9-3,0)*	4,6 (3,0-7,1)
	% CD19	13,1 (9,7-19,9)**	18,2 (12,1-23,1)*	34,6 (24,6-47,7)
	кл/мм ³ cell/mm ³	35 (18-92)*	31 (18-85)*	105 (68-152)
В2-лимфоциты B2 lymphocytes (CD3-CD19 ⁺ CD5 ⁻)	%	14,7 (7,3-18,1)**	8,2 (5,4-11,7)	9,2 (7,6-10,6)
	% CD19	87,0 (80,1-90,3)*	81,9 (77,0-88,0)*	65,4 (52,3-75,4)
	кл/мм ³ cell/mm ³	229 (152-408)**	160 (96-312)*	201 (150-241)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Обсуждение

Потребность в совершенствовании методов диагностики и лечения ВЗК обусловлена тяжестью и хроническим течением данных заболеваний, наличием серьезных осложнений и высоким риском инвалидизации больных [31]. У 30% пациентов, страдающих ВЗК, дебют заболевания происходит в возрасте до 18 лет, что неизбежно приводит к нарушению роста и развития орга-

низма, а значит, снижает качество жизни пациента в будущем [7].

Применение блокаторов TNF α , в частности ИНФ, в терапии ВЗК позволяет достичь ремиссии в короткие сроки у 70% пациентов, однако в течение первого года терапии доля пациентов, находящихся в ремиссии, снижается на треть. Потеря ответа на терапию ИНФ развивается в результате выработки антител к препарату и/или вовлечения альтернативных, TNF α -независимых, патогенетических путей [2, 9, 21, 25, 31]. Персонализированный выбор терапии, учитывающий особенности иммунопатогенеза ВЗК у конкретного больного, позволит определить пациентов с повышенным риском потери ответа на терапию, своевременно провести коррекцию схемы введения блокатора TNF α и тем самым увеличит терапевтическую и экономическую эффективность лечения.

Количественный анализ популяций лимфоцитов периферической крови выявил исходное снижение NK-клеток у детей с ВЗК. У всех обследованных пациентов с ВЗК выявлено значительное снижение содержания В1-лимфоцитов до начала терапии относительно группы сравнения. В группе пациентов с нестойким эффектом биологической терапии отмечено также исходное снижение содержания В2-лимфоцитов, что привело к достоверному снижению общего уровня В-клеток.

Описано, что к факторам, снижающим количество периферических В-лимфоцитов и NK-клеток при ВЗК, относят, в первую очередь, прием цитостатиков и кортикостероидов [11]. Pravven K. Yadav и соавт. (2011) выявили азати-

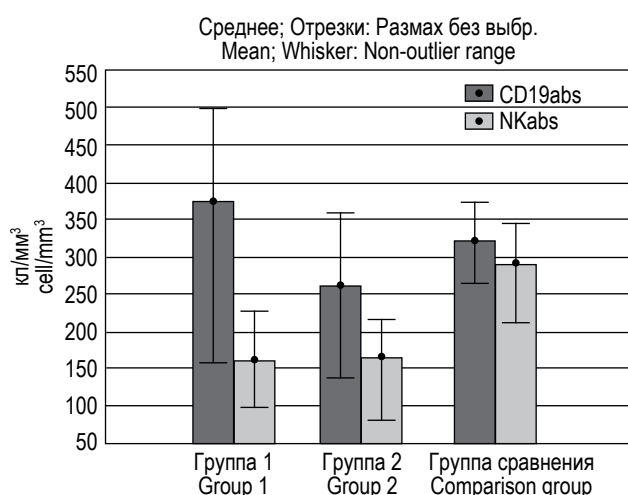


Рисунок 1. Содержание В-лимфоцитов и NK-клеток в периферической крови у пациентов со стойким положительным (группа 1), нестабильным (группа 2) эффектом инфликсимаба и детей группы сравнения

Figure 1. The number of B lymphocytes and NK cells in the peripheral blood in patients with persistent positive (group 1) and unstable (group 2) effect of infliximab and children comparison group

оприн-индуцированный апоптоз NK-клеток собственной пластинки у пациентов с ВЗК [30]. К предполагаемым факторам, приводящим к сокращению численности В-лимфоцитов, относят также локальный синтез индукторов апоптоза [15] и повышенный синтез высокоактивных хемоаттрактантов, привлекающих клетки в очаг воспаления [19].

Анализ популяционного состава Т-лимфоцитов выявил существенное увеличение исходного содержания активированных Т-лимфоцитов, активированных Т-хелперов, Th17-лимфоцитов у всех пациентов с ВЗК, при этом снижения Тreg выявлено не было. У детей с нестойким эффектом ИНФ отмечен наиболее высокий уровень Th17-лимфоцитов и активированных Т-хелперов.

Согласно данным литературы, у пациентов с ВЗК наблюдается массивная инфильтрация стенки кишки активированными Т-хелперами, Th17-лимфоцитами и Тreg-лимфоцитами [8, 10, 13, 14, 18, 29]. Предполагается, что это обусловлено активной миграцией лимфоцитов в зону воспаления и их интенсивной пролиферацией на фоне снижения восприимчивости к сигналам апоптоза [20]. У взрослых пациентов с ВЗК в пе-

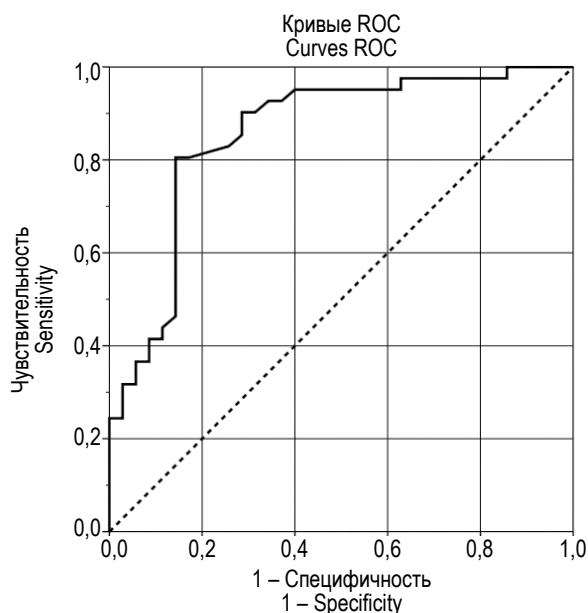


Рисунок 2. ROC-анализ относительного содержания Th17-лимфоцитов (% от CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов) в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с ВЗК

Figure 2. ROC analysis of the relative content of Th17 lymphocytes (% of CD3⁺CD4⁺ lymphocytes) in the prognosis of the effectiveness of biological therapy in children with IBD

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ВЗК ДО НАЧАЛА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. THE NUMBER OF SUBSETS OF T-HELPERs IN PERIPHERAL BLOOD IN CHILDREN WITH IBD BEFORE THE START OF BIOLOGICAL THERAPY (Me, Q_{0,25}-Q_{0,75})

Популяции лимфоцитов Subsets of lymphocytes		Содержание клеток Number of cells		
		Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа сравнения Comparison group
Th2 (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD294 ⁺)	%	0,5 (0,4-0,7)	0,9 (0,5-1,0)	0,5 (0,3-1,0)
	% CD4	1,1 (0,8-1,7)	1,9 (1,0-2,4)	1,2 (0,7-2,5)
	кл/мм ³ cell/mm ³	10 (6-15)	17 (12-31)	10 (8-19)
Treg (CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low})	%	3,8 (2,5-4,4)	4,1 (2,9-5,5)*	3,1 (2,7-3,6)
	% CD4	7,5 (6,5-9,3)	9,1 (6,5-10,7)*	7,4 (6,7-8,8)
	кл/мм ³ cell/mm ³	67 (53-103)	79 (50-127)	68 (56-79)
Th act (CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{high})	%	5,6 (4,3-7,7)*	7,9 (5,3-11,2)*	4,4 (3,7-6,0)
	% CD4	12,4 (10,2-16,9)	17,0 (12,7-22,7)	11,1 (9,2-14,6)
	кл/мм ³ cell/mm ³	120 (76-159)	167 (96-262)*	91 (70 -119)
Th17 (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD161 ⁺)	%	7,9 (6,9-9,9)	11,2 (7,4-15,0)*	7,4 (5,8-8,5)
	% CD4	16,4 (13,3-25,5)	21,5 (18,6-29,3)*	18,3 (14,3-22,5)
	кл/мм ³ cell/mm ³	144 (121-237)	229 (145-286)*	161 (139-184)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 4. РОС-АНАЛИЗ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ВЗК ДО НАЧАЛА ЛЕЧЕНИЯ ДЛЯ ПРОГНОЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

TABLE 4. ROC ANALYSIS OF QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD FROM CHILDREN WITH IBD BEFORE STARTING TREATMENT FOR PREDICTION OF EFFECTIVENESS OF BIOLOGICAL THERAPY

Популяции лимфоцитов Subsets of lymphocytes	Площадь под ROC-кривой, 95% доверительный интервал Area under the ROC curve 95% confidence interval AUC, $p < 0,05$
Th17, % CD4 ⁺	0,857 (0,769-0,945)
Th17, %	0,787 (0,623-0,852)
Th act, % CD4 ⁺	0,728 (0,634-0,823)
B, %	0,723 (0,623-0,823)
B1, % CD19 ⁺	0,683 (0,576-0,789)
B2, % CD19 ⁺	0,683 (0,576-0,789)
NK, %	0,668 (0,567-0,769)
Th act, %	0,650 (0,508-0,723)
B, abs	0,650 (0,547-0,753)
Treg, % CD4 ⁺	0,645 (0,541-0,749)
Th, %	0,619 (0,514-0,724)
T act, %	0,616 (0,508-0,723)
Treg, %	0,600 (0,501-0,704)

риод обострения заболевания выявлено повышение количества эффекторных Т-лимфоцитов и активированных Т-клеток на фоне сниженного числа Treg-лимфоцитов [12, 18]. У детей с ВЗК показано увеличение содержания циркулирующих активированных Т-хелперов и Treg-лимфоцитов вне зависимости от стадии заболевания, что, по мнению авторов, отражает особенности воспалительной реакции при ВЗК и является следствием компенсаторной адаптационной реакции иммунной системы, направленной на подавление воспалительного ответа [11, 16, 23].

Проведенная нами оценка значимости показателей клеточного иммунитета, выполненная с использованием ROC-анализа, выявила, что наиболее информативным показателем в прогнозе эффективности биологической терапии является относительное содержание Th17-лимфоцитов (% CD3⁺CD4⁺CD161⁺ от CD3⁺CD4⁺) до начала терапии (AUC-0,857, $p < 0,05$). Ранее было показано, что эта субпопуляция постепенно увеличивается с возрастом, поэтому рассчитанный нами пороговый критерий для уровня Th17-лимфоцитов в периферической крови является таковым только для детей в возрасте 12-18 лет [5].

Таким образом, оценка состояния клеточного иммунитета у детей с ВЗК выявила ряд значимых отклонений показателей как в основных, так и в минорных популяциях лимфоцитов, что позволяет рекомендовать включение данного исследования в мониторинг состояния пациентов с ВЗК. Количество Th17-лимфоцитов (% от CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов) с высокой долей вероятности позволяет прогнозировать эффект терапии блоком TNF α .

Список литературы / References

1. Белоусова Е.А., Морозова Н.А., Великанов Е.В., Гаганов Л.Е.. Инфликсимаб при язвенном колите: обзор исследований и собственные результаты // Фарматека, 2011. № 2. С. 72-77. [Belousova E.A., Morozova N.A., Velikanov E.V., Gaganov L.E. Infliximab in ulcerative colitis: review of studies and own results. *Pharmateka*, 2011, no. 2, pp. 72-77. (In Russ.)]
2. Маянская И.В., Маянский А.Н. Неиммунные и иммунные механизмы, участвующие в развитии хронических воспалительных заболеваний кишечника // Вопросы диагностики в педиатрии, 2013. Т. 5, № 4. С. 14-23. [Mayanskaya I.V., Mayansky A.N. Non-immune and immune mechanisms participating in chronic inflammatory bowel diseases. *Voprosy diagnostiki v pediatrii = Pediatric Diagnostics*, 2013, Vol. 5, no. 4, pp. 14-23. (In Russ.)]
3. Мирошкина Л.В., Петричук С.В., Цимбалова Е.Г., Потапов А.С., Венедиктова М.М., Топтыгина А.П., Курбатова О.В., Измайлова Т.Д., Семикина Е.Л., Варичкина М.А. Цитокиновый профиль у детей с воспалительными заболеваниями кишечника как предиктор эффективности терапии инфликсимабом // Вопросы диагностики в педиатрии, 2013. Т. 5, № 4. С. 33-38. [Miroshkina L.V., Petrichuk S.V., Tsimbalova E.G., Potapov A.S., Venediktova M.M., Toptygina A.P., Kurbatova O.V., Izmaylova T.D., Semikina E.L., Varichkina M.A. Cytokine profile as predictor of infliximab therapy effectiveness in children with inflammatory bowel diseases. *Voprosy diagnostiki v pediatrii = Pediatric Diagnostics*, 2013, Vol. 5, no. 4, pp. 33-38. (In Russ.)]
4. Сагынбаева В.Э., Лазебник Л.Б., Князев О.В., Ефремов Л.И. Антитела к инфликсимабу и к антигенам HLA I-II класса как свидетели иммунного ответа на биологическую терапию воспалительных заболеваний кишечника // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2011. № 12. С. 7-14. [Sagynbaeva V.E., Lazebnik L.B., Knyazev O.V., Efremov L.I. Antibodies to infliximab and antigens HLA I-II class as the witnesses of immune response to the biological treatment of inflammatory bowel disease. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2011, no. 12, pp. 7-14. (In Russ.)]

5. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Петричук С.В., Закиров Р.Ш., Курбатова О.В., Копыльцова Е.А., Комах Ю.А. Изменение уровня субпопуляций Т-регуляторных клеток и Т-хелперов 17 в периферической крови здоровых людей в зависимости от возраста // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 409-420. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Petrichuk S.V., Zakirov R.Sh., Kurbatova O.V., Kopyltsova E.A. Age-dependent changes of T-regulatory and Th17 subset levels in peripheral blood from healthy humans. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 409-420. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-409-420.
6. Хайдуков С.В., Байдун Л.В., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состав лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал, 2014. № 4 (17). С. 974-992. [Khaydukov S.V., Baydun L.V., Zurochka A.V., Totolyan A.A. The standardised technique: «Study subpopulations of peripheral blood lymphocytes by using flow cytometry». *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, no. 4 (17), pp. 974-992. (In Russ.)]
7. Abraham C., Cho J.H. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.*, 2009, Vol. 361, pp. 2066-2078.
8. Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V., Maggi L., Liotta F., Mazzinghi B., Parente E., Fili L., Ferri S., Frosali F., Giudici F., Romagnani P., Parronchi P., Tonelli F., Maggi E., Romagnani S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 8, pp. 1849-1861.
9. Arnott I.D., McNeill G., Satsangi J. An analysis of factors influencing short-term and sustained response to infliximab treatment for Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2003, Vol. 17, no. 12, pp. 1451-1457.
10. Bogaert S., Laukens D., Harald Peeters H., Melis L., Olievier K., Boon N., Verbruggen G., Vandesompele J., Elewaut D., De Vos M. Differential mucosal expression of Th17-related genes between the inflamed colon and ileum of patients with inflammatory bowel disease. *BMC Immunology*, 2010, Vol. 11, pp. 1-11.
11. Cseh A., Vasarhelyi B., Molnar K., Szalay B., Svec P., Treszl A., Dezsofi A., Lakatos P.L., Arato A., Tulassay T., Veres G. Immune phenotype in children with therapy naïve remitted and relapsed Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.*, 2010, Vol. 16, no. 47, pp. 6001-6009.
12. Chamouard P., Monneaux F., Richert Z., Voegeli A.C., Lavaux T., Gaub M.P., Baumann R., Oudet P., Muller S. Diminution of circulating CD4⁺CD25^{high} T cells in naïve Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.*, 2009, Vol. 54, pp. 2084-2093.
13. Danese S. Immune and nonimmune components orchestrate the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2011, Vol. 300, pp. 716-722.
14. Elgbratt K., Kurlberg G., Hahn-Zohric M., Hörnquist E.H. Rapid migration of thymic emigrants to the colonic mucosa in ulcerative colitis patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 2010, Vol. 162, no. 2, pp. 325-336.
15. El-Hodhod M.A., Aly R.H., Youssef S.R., Mohamedet S.I. Enhanced blood lymphocytes apoptosis in children with inflammatory bowel disease. *ISRN Gastroenterology*, Vol. 2013, pp. 415-417.
16. La Scaleia R., Morrone S., Stoppacciaro A., Scarpino S., Antonelli M., Bianchi E., di Nardo G., Oliva S., Viola F., Cucchiara S., Santoni A., Palmieri G., Uccini S. Peripheral and intestinal CD4⁺ T cells with a regulatory phenotype in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2010, Vol. 51, no. 5, pp. 563-572.
17. Lierop P.P., Samsom J.N., Escher J.C., Nieuwenhuis E. Role of the innate immune system in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2009, Vol. 48, no. 2, pp. 142-151.
18. Maul J., Loddenkemper C., Mundt P., Berget E., Giese T., Stallmach A., Zeitz M., Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25^{high} T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2005, Vol. 128, pp. 1868-1878.
19. Mishima Y., Ishihara S., Amano Y., Oshima N., Kadota Ch., Otani A. Alterations of peripheral blood CD5⁺ B cells in inflammatory bowel disease. *Scand J. Gastroenterol*, 2009, Vol. 44, no. 2, pp. 172-179.
20. Monteleone G., Fina D., Caruso R., Pallone F. New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2006, Vol. 22, no. 4, pp. 361-364.
21. Ogawa K., Matsumoto T., Esaki M., Torisu T., Iida M. Profiles of circulating cytokines in patients with Crohn's disease under maintenance therapy with infliximab. *J. Crohn's Colitis*, 2012, Vol. 6, no. 5, pp. 529-535.
22. Orlando A., Colombo E., Kohn A., Biancone L., Rizzello F., Viscido A., Sostegni R., Benazzato L., Castiglione F., Papi C., Meucci G., Riegler G., Mocciaro F., Cassinotti A., Cosentino R., Geremia A., Morselli C., Angelucci E., Lavagna A., Rispo A., Bossa F., Scimeca D., Cottone M., Italian Multicentric Study Group on Infliximab. Infliximab in the treatment of Crohn's disease: predictors of response in an Italian multicentric open study. *Dig. Liver Dis.*, 2005, Vol. 37, no. 8, pp. 577-583.
23. Reikvam D.H., Perminow G., Lyckander L.G., Gran J.M., Brandtzaeg P., Vatn M., Carlsen H.S. Increase of regulatory T cells in ileal mucosa of untreated pediatric Crohn's disease patients. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2011, Vol. 46, pp. 550-560.
24. Ricciardelli I., Lindley K.J., Londei M., Quarantino S. Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology*, 2008, Vol. 125, no. 2, pp. 178-183.
25. Sanchez-Muñoz F., Dominguez-Lopez A., Yamamoto-Furusho J.K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 2008, Vol. 14, no. 27, pp. 4280-4288.
26. Souza H., Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2016, Vol. 13, pp. 13-27.

27. Taylor K.D., Plevy S.E., Yang H., Landers C.J., Barry M.J., Rotter J.I. Targan S.R. ANCA pattern and LTA haplotype relationship to clinical responses to anti-TNF antibody treatment in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2001, Vol. 120, no. 6, pp. 1347-1355.
28. Vermeire S., Louis E., Carbonez A., van Assche G., Noman M., Belaiche J., de Vos M., van Gossum A., Pescatore P., Fiasse R., Pelckmans P., Reynaert H., D'Haens G., Rutgeerts P. Demographic and clinical parameters influencing the short-term outcome of anti-tumor necrosis factor (Infliximab) treatment in Crohn's disease. *J. Gastroenterol.*, 2002, Vol. 97, no. 9, pp. 2357-2363.
29. Voiglio E., Salle B., Lemaitre D., Cloix P., Bancel B., Cozon G. Activation of T-lymphocytes in Crohn disease and in ulcerative hemorrhagic rectocolitis. Therapeutic implications. *Pathol. Biol. (Paris)*, 1996, Vol. 44, no. 4, pp. 287-292.
30. Yadav P.K., Chen C., Liu Z. Potential role of NK cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, Vol. 2011, 348530, 6 p. doi: 10.1155/2011/348530.
31. Zhang Y-Z., Li Y-Y. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 1, pp. 91-99.

Авторы:

Петричук С.В. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии лабораторного отдела НИИ педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Мирошкина Л.В. — к.м.н., научный сотрудник лабораторного отдела НИИ педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Семикина Е.Л. — д.м.н., заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры факультетской педиатрии № 1 ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Топтыгина А.П. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Потапов А.С. — д.м.н., профессор, заведующий гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Цимбалова Е.Г. — к.м.н., старший научный сотрудник гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Радыгина Т.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Petrichuk S.V., PhD, MD (Biology), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, Research Institute of Pediatrics, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Miroshkina L.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory Department, Research Institute of Pediatrics, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Head, Centralized Diagnostic Laboratory, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Faculty Pediatrics No. 1, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cytokines, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology, M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Potapov A.S., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Gastroenterology with a Group of Hepatology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Tsimbalova E.G., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Gastroenterology with a Group of Hepatology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Radygina T.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Поступила 13.12.2017
Отправлена на доработку 21.12.2017
Принята к печати 27.12.2017

Received 13.12.2017
Revision received 21.12.2017
Accepted 27.12.2017

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ТКАНЯХ МАТКИ И СЫВОРОТОЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, ЦИТОКИНОВ, ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ ПРИ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

**Шрамко С.В.¹, Зорина В.Н.¹, Зорин Н.А.¹, Ботвиньева И.А.²,
Архипова С.В.¹, Лихачева В.В.¹**

¹ Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

² ГБУЗ «Новокузнецкий перинатальный центр», г. Новокузнецк, Россия

Резюме. Патогенетические механизмы лейомиомы матки, аденомиоза и сочетанной патологии сложны и не до конца изучены, дифференциальная диагностика лейомиосаркомы матки затруднительна.

Цель исследования – сравнительный анализ сыровоточного содержания $\alpha 2$ -МГ, АБГ, некоторых цитокинов, половых стероидов, а также показателей экспрессии генов стероидных рецепторов при различных вариантах пролиферативных заболеваний матки для уточнения их патогенетической роли, диагностической и прогностической значимости.

При аденомиозе экспрессия генов эстрогеновых рецепторов в узлах в 1,5–2 раза выше, чем при лейомиоме, сочетанная патология демонстрирует промежуточные значения, при лейомиосаркоме экспрессия генов *ER* и *PGR* минимальна. При клеточной лейомиоме экспрессия генов рецепторов *ER* в окружающем миометрии в 2–3 раза выше, чем при простой. При этом концентрация эстрогена и прогестерона в крови сопоставима между группами и с нормой. У всех больных обнаруживается дефицит иммуномодуляторного $\alpha 2$ -МГ (12–13% при лейомиоме, 20% при аденомиозе и 23% при злокачественной патологии), при сочетанной патологии и лейомиосаркоме увеличена концентрация иммуносупрессивного АБГ. Параллельно растет содержание IL-6 и TNF α , уровень фактора роста VEGF превышает норму в 4–4,5 раза при лейомиоме, в 5,5 при сочетанной патологии, в 6,5 при аденомиозе и в 10 при лейомиосаркоме.

Полученные результаты подтверждают, что иммуномодуляторные белки, цитокины и усваиваемые клетками гормоны оказывают взаимозависимое влияние друг на друга при изученных заболеваниях, а их достоверные изменения могут использоваться в диагностике и прогнозе.

Ключевые слова: лейомиома, гены стероидных рецепторов, цитокины, альфа-2-макроглобулин

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

С.В. Шрамко, В.Н. Зорина, Н.А. Зорин, И.А. Ботвиньева, С.В. Архипова, В.В. Лихачева «Взаимосвязь экспрессии генов стероидных рецепторов в тканях матки и сыровоточных концентраций иммунорегуляторных белков, цитокинов, половых стероидов при пролиферативных заболеваниях» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 731–738.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-731-738
© Шрамко С.В. и соавт., 2018

For citation:

S.V. Shramko, V.N. Zorina, N.A. Zorin, I.A. Botvinyeva, S.V. Arkhipova, V.V. Likhacheva "Interrelation of steroid receptor gene expression in uterine tissues and serum concentrations of immunoregulatory proteins, cytokines, sex steroids in proliferative diseases", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 731–738.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-731-738

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-731-738

INTERRELATION OF STEROID RECEPTOR GENE EXPRESSION IN UTERINE TISSUES AND SERUM CONCENTRATIONS OF IMMUNOREGULATORY PROTEINS, CYTOKINES, SEX STEROIDS IN PROLIFERATIVE DISEASES

Shramko S.V.^a, Zorina V.N.^a, Zorin N.A.^a, Botvinyeva I.A.^b,
Arkhipova S.V.^a, Likhacheva V.V.^a

^a Novokuznetsk State Institute for the Postgraduate Education of Physicians, Novokuznetsk, Russian Federation

^b Novokuznetsk Perinatal Center, Novokuznetsk, Russian Federation

Abstract. Pathogenetic mechanisms of uterine leiomyoma, adenomyosis and their combination are complicated and poorly understood, a differential diagnosis of leiomyosarcoma of the uterus is difficult. Our study aimed for a comparative analysis of the serum contents of $\alpha 2$ -MG, PAG, some cytokines, sex steroids and the expression of steroid receptor genes in the patients with different variants of uterine proliferative diseases, in order to determine their pathological role, diagnostic and prognostic value.

Expression of estrogen receptor genes adenomyosis nodes was 1.5 to 2-fold higher than in leiomyoma, the combined pathology showed intermediate values, and expression of *ER* and *PGR* genes in leiomyosarcoma was minimal. In cellular leiomyoma, expression of *ER* receptor genes in the surrounding myometrium was 2 to 3-fold higher than in cases of simple leiomyomas. At the same time, concentration of estrogen and progesterone in the blood is comparable between the groups and control groups. All the patients have a deficiency of immunomodulatory $\alpha 2$ -MG (12–13% for leiomyomas, 20% for adenomyosis, and 23% for malignant pathology). The concentration of immunosuppressive PAG is increased in combined conditions and leiomyosarcoma. In addition, the contents of IL-6 and TNF α increase, the VEGF levels exceed normal values 4 to 4.5-fold, in leiomyoma, 5.5-fold, in combined pathology, 6.5, in adenomyosis, and 10-fold, in leiomyosarcoma.

The obtained results confirm that immunomodulatory proteins, cytokines and cell-targeting sex hormones exert an interdependent influence upon each other in the studied diseases, and their significant changes may be used in diagnostics and prognosis.

Keywords: leiomyoma, steroid receptor genes, cytokine, alpha2-macroglobulin

Введение

Лейомиома матки (ЛМ) является распространенным заболеванием среди женщин репродуктивного возраста [8, 13]. Патогенетические механизмы ЛМ до конца не выяснены, но ключевая роль отводится дефектам иммунного надзора, дисбалансу половых гормонов, нарушениям синтеза и рецепции прогестерона [13]. В подавляющем большинстве случаев (85%) миома матки сочетается с аденомиозом (А) — эстроген-зависимой патологией, характеризующейся инвазией железистого и стромального компонента базального слоя эндометрия в миометрий [5]. Противорецидивная терапия сочетанной патологии затруднительна и в ряде случаев безуспешна [2]. Считается, что ЛМ никогда не малигнизируется [15], а злокачественная трансформация А, напротив, активно обсуждается [8]. Значительно реже (3–7/100 000 случаев в год) встречается лейомиосаркома матки (ЛМС) — не ассоциированная с гормональным фоном гладкомышечная

опухоль с агрессивным течением и отсутствием чувствительности к лучевой и химиотерапии [10]. Предоперационная дифференциальная диагностика ЛМС и крупной ЛМ является чрезвычайно сложной задачей [12], приобретающей все большую актуальность в связи с увеличением органосохраняющих оперативных и регрессионных методов лечения ЛМ.

Сложность изучения патогенеза и, соответственно, диагностики заключается в том, что реакция матки на стероидную стимуляцию является многокомпонентным процессом, включающим различные межклеточные взаимодействия [7]. В частности, изменения гормонального профиля взаимосвязаны с концентрацией ряда цитокинов и факторов роста, моделирующих процессы пролиферации в тканях [9]. В свою очередь, полифункциональные белки семейства макроглобулинов (альфа-2-макроглобулин [$\alpha 2$ -МГ], ассоциированный с беременностью альфа-2-гликопротеин [АБГ]) осуществляют транспорт

гормонов и цитокинов к клеткам, одновременно защищая их от разрушения протеазами и контролируя их синтез [3]. Кроме того, АБГ обладает выраженными иммуносупрессивными свойствами, является чувствительным неспецифическим маркером не только беременности, но и злокачественной эстрогензависимой пролиферации [3]. Необходимо учитывать, что деление и апоптоз в тканях регулируется протеинкиназами, протеазами, эндонуклеазами [1] и $\alpha 2$ -МГ, способными ингибировать данные ферменты [4]. Определенные сложности диагностики и прогноза связаны с тем, что степень влияния гормонов на ткани обусловлена не столько их фактической концентрацией в биожидкостях, сколько способностью клетки отвечать на их стимулирующие воздействия, обусловленной состоянием стероидных рецепторов. При этом даже представители одного семейства могут различаться по функциям — изомеры эстрогенового рецептора α ($ER\alpha$) преимущественно способствуют пролиферации, отдельные изомеры $ER\beta$, напротив, подавляют [6].

Таким образом, моделирование пролиферативного процесса в миометрии чрезвычайно многогранно и обусловлено взаимодействием ауто- и паракринных механизмов [7] с участием гормонов и цитокинов (включая факторы роста), баланса содержания иммуномодуляторных, транспортных белков и протеиназ, а также изменениями уровней экспрессии стероидных рецепторов и кодирующих их генов.

Целью исследования был сравнительный анализ сывороточного содержания $\alpha 2$ -МГ, АБГ, некоторых цитокинов, половых стероидов, а также показателей экспрессии генов стероидных рецепторов при различных вариантах лейомиомы и лейомиосаркоме матки для уточнения их патогенетической роли и диагностической значимости.

Материалы и методы

В исследовании участвовали: 41 пациентка с клеточной лейомиомой (КЛМ); 92 — с простой лейомиомой (ЛМ); 31 — с сочетанием простой миомы и аденомиоза (ЛМ+А); 10 женщин с лейомиосаркомой (ЛМС), а также 15 больных аденомиозом (А) в качестве группы сравнения и 21 практически здоровых женщин-доноров (контрольная группа). Все женщины подписали информированное согласие на участие в исследовании, получение образцов для коллекций осуществлялось по стандартному протоколу этического комитета.

Для определения экспрессии генов стероидных рецепторов были использованы образцы ткани матки (узлов аденомиоза, миомы и окружающего их миометрия), удаленные в ходе хи-

рургического вмешательства. Образцы замораживали в жидком азоте для последующего анализа. Выделение суммарной РНК из образцов и ДНК-азную обработку проводили с использованием наборов Qiagen (Rneasy Lipid Tissue Mini Kit и RNase-Free DNase Set соответственно, США), согласно рекомендациям производителя. Количество РНК в пробе определяли спектрофотометрическим методом. Качественный анализ выделенной РНК выполняли методом электрофоретического разделения в 1,5% агарозном геле. Уровень экспрессии исследуемых генов выявляли ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) с использованием Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad, США). В качестве гена сравнения использовали GAPDH. При проведении ПЦР использовали специфические праймеры к последовательностям генов стероидных рецепторов: эстрогеновых α ($ER\alpha$), эстрогеновых β ($ER\beta$), прогестероновых (PGR).

Содержание $\alpha 2$ -МГ, АБГ, IL-6, TNF α , VEGF определялось в сыворотке крови. Образцы крови были получены из локтевой вены до проведения операции, сыворотка отделена центрифугированием (3000 об/мин), образцы замораживались до проведения исследования коллекции. Концентрация $\alpha 2$ -МГ и АБГ определялась методом количественного ракетного иммуноэлектрофореза, с использованием исследовательских тест-систем, разработанных на базе НИЛ иммунологии. Уровень цитокинов оценивался методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем (АО «Вектор-Бест», Россия), а также оборудования и программного обеспечения для ИФА (Bio-Rad, США).

Содержание гормонов определяли при помощи иммунофлуоресцентного анализа на Vidas 60 (Италия) с использованием реагентов BioMerieux (Франция).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы InStat-II (GraphPad, США); статистически значимым считали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным результатам (табл. 1), средние сывороточные концентрации эстрадиола и прогестерона во всех группах больных и здоровых женщин были сопоставимы между собой. Необходимо отметить, что средняя концентрация эстрадиола при ЛМ была на четверть выше, чем при ЛМС, однако статистической значимости различий нами не установлено. Полученные результаты еще раз подтвердили данные о том, что концентрации половых гормонов в общей

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ КОНЦЕНТРАЦИИ ГОРМОНОВ И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ($M \pm m$)

TABLE 1. INDICATORS OF HORMONE CONCENTRATION AND EXPRESSION OF STEROID RECEPTORS GENES ($M \pm m$)

Показатели Indicators		Аденомиоз (А) Adenomyosis	Простая лейомиома (ЛМ) Leiomyoma	Лейомиома + аденомиоз (ЛМ+А) Leiomyoma + adenomyosis	Клеточная лейомиома (КЛМ) Cell leiomyoma	Лейомиосаркома (ЛМС) Leiomyosarcoma
Эстрадиол (пмоль/л) Здоровые Estradiol Control 201,9±25,9 (n = 21)	КР BL	240,2±60,44 n = 13	274,40±96,13 n = 20	252,17±31,22 n = 17	200,0±27,77 n = 20	208,60±43,58 n = 10
Экспрессия гена рецептора ERα Receptor ERα gene expression	УЗ NO	11,12±1,0 n = 11	4,93±1,46 n = 15 $p_1 = 0,002$	6,68±1,22 n = 10 $p_1 = 0,010$	6,03±1,24 n = 11 $p_1 = 0,004$	3,24±1,7 n = 6 $p_1 = 0,007$
	МИ MY	2,65±0,52 n = 11	2,59±0,63 n = 15	2,48±0,51 n = 10	4,89±0,9 n = 11 $p_1 = 0,030$ $p_2 = 0,040$ $p_3 = 0,030$	1,93±0,33 n = 6 $p_4 = 0,030$
Экспрессия гена ERβ Receptor ERβ gene expression	УЗ NO	7,35±2,46 n = 11	3,34±1,02 n = 15	5,77±1,58 n = 10	4,63±1,43 n = 11	1,63±0,6 n = 6
	МИ MY	0,81±0,15 n = 11	1,21±0,33 n = 15	1,2±0,39 n = 10	3,95±1,47 n = 11 $p_1 = 0,030$ $p_2 = 0,040$	2,340,9 n = 6 $p_1 = 0,030$
Прогестерон (нмоль/л) Здоровые Progesterone Control 2,47±0,39 (n = 21)	КР BL	3,63±0,55 n = 14	3,58±0,50 n = 20	3,82±0,79 n = 11	3,94±0,98 n = 14	2,66±1,94 n = 10
Экспрессия гена PGR Receptor PGR gene expression	УЗ NO	7,16±1,06 n = 11	6,83±1,36 n = 15	6,86±1,06 n = 10	9,48±1,69 n = 11	1,41±0,53 n = 6 $p_1 = 0,002$ $p_2 = 0,020$ $p_3 = 0,002$ $p_4 = 0,003$
	МИ MY	2,15±0,59 n = 11	5,87±0,87 n = 15 $p_1 = 0,002$	3,14±1,01 n = 10	6,3±1,13 n = 11 $p_1 = 0,003$	2,36±0,19 n = 6 $p_2 = 0,020$ $p_4 = 0,020$

Примечание. КР – кровь; МИ – окружающий миометрий; УЗ – узел; p_1 – степень значимости различий с группой сравнения (аденомиоз); p_2 – степень значимости различий с группой «лейомиома»; p_3 – степень значимости различий с группой «лейомиома + аденомиоз»; p_4 – степень значимости различий с группой «клеточная лейомиома».

Note. BL, blood; MY, surrounding myometrium; NO, node; p_1 , the significance of differences with the comparison group (adenomyosis); p_2 , the significance of differences with the "leiomyoma" group; p_3 , the significance of differences with the group "leiomyoma + adenomyosis"; p_4 , the significance of differences with the group "cellular leiomyoma".

циркуляции подвержены значительной индивидуальной вариабельности [7, 8], не отражают реального состояния в очаге патологии, а потому не могут использоваться в качестве уточняющих критериев патологических изменений непосредственно в очаге.

Уровень экспрессии генов *ERα*, *ERβ* и *PGR* в узлах при простой, клеточной и сочетанной формах лейомиомы (ЛМ, КЛМ и ЛМ+А) был сопоставим. При «чистом» аденомиозе показатели экспрессии гена *ERα* значительно превышали таковые при любых формах лейомиомы матки (2,5 раза выше, чем в группе с простыми узлами). Показатели экспрессии *ERβ* в узловых образованиях аденомиоза в среднем также определялись в 2 раза выше, чем в узлах ЛМ, но без статистически достоверных отличий. Значительное превышение уровня экспрессии *ERα* и тенденция к повышению экспрессии гена *ERβ* в аденомиозных узлах, при сопоставлении с простой лейомиомой, подтверждает не только данные о роли гиперэстрогемии в патогенезе аденомиоза [5], но и тот факт, что решающее значение имеет «эффективная» на тканевом уровне гиперэстрогения, а не общая концентрация эстрогенов в циркуляции.

Сочетание лейомиомы и аденомиоза характеризовалось промежуточными значениями экспрессии генов стероидных рецепторов по сравнению с «чистыми» группами ЛМ и А. Это объясняет низкую эффективность медикаментозного противорецидивного лечения у такой категории больных [2, 8] за счет «наложения» различных патологических эффектов в общей схеме развития заболевания.

Лейомисаркома выделялась самыми низкими показателями экспрессии генов *ERα*, *ERβ* и *PGR* в узлах. Выявление низкого уровня экспрессии генов стероидных рецепторов непосредственно в узле уже сформированной лейомиосаркомы подтверждает минимизацию экспрессии рецепторов на поверхности сформированного злокачественного образования [11] для максимальной защиты от иммунной системы организма. Этот факт обосновывает отсутствие чувствительности к экзогенным гормонам при данной злокачественной гладкомышечной опухоли [10].

Обращает на себя внимание значительно более активная экспрессия *ERα* и *ERβ* в окружающем миометрии при клеточной форме лейомиомы по сравнению с простой, на фоне самой низкой сывороточной концентрации эстрадиола. Известно, что озлокачествленные клетки активно поглощают эстрогены и экспрессируют рецепторы к ним на ранних этапах развития опухоли при сниженной экспрессии рецепторов эндцитоза [11], поглощающих комплексы $\alpha 2$ -МГ, в том числе с половыми стероидами в сформированном новообразовании. Возможно, в данном случае наблюдается тенденция к малигнизации,

и, при отсутствии адекватного иммунного контроля на фоне сохранения неблагоприятных факторов, процесс может в дальнейшем перейти в онкопатологию. Необходимо отметить, что хотя, согласно общепринятому мнению, лейомиома не малигнизируется [15], ретроспективный клинический анализ 29 обследованных нами больных лейомисаркомой установил в каждом втором случае наличие в анамнезе клинически незначимой лейомиомы матки.

По результатам исследования установлено, что при ЛМ и КЛМ показатели экспрессии *PGR* в тканях окружающего узел миометрия были значительно выше, чем при аденомиозе и злокачественной ЛМС. В целом изучение экспрессии генов стероидных рецепторов в узлах и окружающем миометрии продемонстрировало, что при лейомиоме экспрессия генов прогестероновых рецепторов идет несколько активнее, чем экспрессия эстрогеновых, что совпадает с литературными данными одних авторов [13] и противоречит другим, не выявлявшим различий, вне зависимости от размеров лейомиомы [14].

Анализ сывороточного содержания (табл. 2) иммуномодуляторных белков семейства макроглобулинов позволил выявить, что уровень $\alpha 2$ -МГ во всех группах больных был статистически значимо снижен в сравнении с показателями здоровых женщин и не зависел от морфологического гистотипа миомы матки. Содержание АБГ было значимо повышенным в группах ЛМ+А и ЛМС в сравнении с таковым у здоровых женщин. Выявленное нами значительное снижение содержания $\alpha 2$ -МГ может являться следствием сопутствующего воспаления — данный белок активно расходуется на быстрое связывание и утилизацию протеиназ, высвобождающихся при гибели клеток [3]. Однако нельзя исключать и врожденный дефицит синтеза данного полифункционального белка, способствующий повышенной предрасположенности к возникновению патологических пролиферативных процессов в матке, в том числе за счет менее эффективного влияния на гормональный и цитокиновый профили. Обращает на себя внимание тенденция к повышению АБГ при лейомиоме, превращающаяся в значимое повышение при сочетанной патологии и при злокачественной ЛМС. Данный белок обладает выраженными иммуносупрессивными свойствами, является неспецифическим маркером эстроген-зависимой онкопатологии [3] и однозначно способствует выживаемости трансформированных клеток.

Концентрация IL-6 в крови была выше нормы во всех группах больных. При простой лейомиоме содержание IL-6 определялось в 1,5-2 раза ниже, чем в других группах. Наименее выраженное (статистически значимое) повышение уровня TNF α и VEGF по сравнению с контролем

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ И ЦИТОКИНОВ (M±m)

TABLE 2. CONCENTRATION OF IMMUNOREGULATORY PROTEINS AND CYTOKINES (M±m)

Показатели Indicators	$\alpha 2$ -МГ (г/л) $\alpha 2$ -macro- globulin ($\alpha 2$ -MG) g/l	АБГ (г/л) Pregnancy associated $\alpha 2$ - glyco-protein (PAG) g/l	IL-6 (пкг/мл) pkg/ml	TNF α (пкг/мл) pkg/ml	VEGF (пкг/мл) pkg/ml
Здоровые Healthy donors n = 21	2,48±0,08	0,010±0,001	1,29±0,11	0,28±0,01	74,8±16,7
Аденомиоз (А) Adenomyosis	1,99±0,15 n = 15 p ₀ = 0,0030	0,013±0,003 n = 11	3,54±0,64 n = 11 p ₀ < 0,0001	3,15±0,50 n = 11 p ₀ < 0,0001	485,6±98,5 n = 15 p ₀ < 0,0001
Простая лейомиома (ЛМ) Leiomyoma	2,03±0,05 n = 92 p ₀ = 0,0001	0,018±0,003 n = 92	2,46±0,33 n = 45 p ₀ = 0,0200	1,76±0,24 n = 44 p ₀ < 0,0001 p ₁ = 0,0100	288,1±27,4 n = 65 p ₀ < 0,0001 p ₁ = 0,0090
Лейомиома + аденомиоз (ЛМ+А) Leiomyoma + adenomyosis	2,19±0,09 n = 31 p ₀ = 0,0200	0,020±0,002 n = 31 p ₀ = 0,0003	4,48±0,60 n = 20 p ₀ < 0,0001 p ₂ = 0,0020	4,26±0,71 n = 19 p ₀ < 0,0001 p ₂ < 0,0001	436,1±84,6 n = 18 p ₀ < 0,0001; p ₂ = 0,0030
Клеточная лейомиома (КЛМ) Cell leiomyoma	2,16±0,10 n = 41 p ₀ = 0,0300	0,015±0,002 n = 41	4,25±0,95 n = 30 p ₀ = 0,0100 p ₂ = 0,0400	3,41±0,43 n = 29 p ₀ < 0,0001 p ₂ = 0,0006	349,7±51,9 n = 34 p ₀ = 0,0002
Лейомиосаркома (ЛМС) Leiomyosarcoma	1,91±0,34 n = 10 p ₀ = 0,0010	0,019±0,002 n = 10 p ₀ < 0,0001	5,70±1,04 n = 10 p ₀ < 0,0001 p ₂ = 0,0004	6,70±0,90 n = 10 p ₀ < 0,0001 p ₁ = 0,0020 p ₂ < 0,0001 p ₃ = 0,0400 p ₄ = 0,0008	764,0±37,7 n = 10 p ₀ < 0,0001 p ₁ = 0,0300 p ₂ < 0,0001 p ₃ = 0,0090 p ₄ = 0,0001

Примечание. p₀ – статистическая значимость отличий от здоровых; p₁ – от группы сравнения (аденомиоз); p₂ – от группы простой лейомиомы (ЛМ); p₃ – от группы ЛМ+А; p₄ – от группы КЛМ.

Note. p₀, statistical significance of differences from healthy donors; p₁, from the comparison group (adenomyosis); p₂, from the group of simple leiomyoma; p₃, from the group "leiomyoma + adenomyosis"; p₄, from group of cell leiomyoma.

также зафиксировано при простой лейомиоме. Самые высокие средние концентрации провоспалительного TNF α , фактора роста VEGF и иммуномодуляторного IL-6 отмечены при ЛМС.

Известно, что синтез белков семейства макроглобулинов взаимозависимо стимулируется IL-6. Наблюдаемый нами дефицит $\alpha 2$ -МГ, несмотря на повышение уровня IL-6 у больных, особенно при ЛМС, свидетельствует в пользу теории дефекта синтеза иммунорегуляторных белков у женщин, предрасположенных к развитию пролиферативных процессов в матке, особенно злокачественной трансформации. Подобные тенденции, совпадающие с литературными данными [9], демонстрирует и содержание TNF α в крови больных. При этом известно, что у окисленного продуктами воспалительной реакции

$\alpha 2$ -МГ повышено сродство к TNF α и снижено к рецепторам [4], в то время как экспрессия стероидных рецепторов взаимосвязана с уровнями цитокинов [13], а транспорт стероидных гормонов – с белками семейства макроглобулинов [3]. Свою лепту в патогенез, особенно при злокачественной пролиферации, несомненно, вносит и гиперсинтез васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGF), транспортируемого к клеткам при помощи $\alpha 2$ -МГ [4].

Необходимо отметить, что если содержание VEGF и выраженность экспрессии генов стероидных рецепторов в группе ЛМ+А занимали промежуточное место между различающимися «чистыми группами», то концентрация АБГ, IL-6 и TNF α у больных с сочетанной патологией оказалась не только достоверно выше, чем при ЛМ,

но и немного выше, чем при А. Концентрация IL-6 и TNF α при КЛМ определялась статистически значимо повышенной по сравнению с простой лейомиомой.

Заключение

Таким образом, патогенез пролиферативных заболеваний матки является сложным и многоуровневым процессом, в реализации которого задействованы взаимозависимый дефицит иммунорегуляторного $\alpha 2$ -МГ и повышение концентрации иммуносупрессивного АБГ, гиперсинтез цитокинов (включая факторы роста) на системном уровне, а также изменения выраженности экспрессии генов стероидных рецепторов, зависящие от вида патологии, на фоне стабильных концентраций стероидных гормонов крови. При этом аденомиоз имеет ряд отличий от простой лейомиомы (в уровне экспрессии генов эстрогеновых рецепторов в узлах и прогестероновых – в окружающей миометрии, в синтезе TNF α и VEGF). Сочетание лейомиомы и аденомиоза

сопровождается усреднением большинства изученных показателей и наложением патогенетических механизмов, что оказывает влияние на эффективность лечения. Клеточная лейомиома характеризуется более активной экспрессией генов эстрогеновых рецепторов в окружающем узел миометрии и синтезом провоспалительных цитокинов по сравнению с простой, что, вероятнее всего, является единым взаимозависимым механизмом в патогенезе. Лейомиосаркома характеризуется минимальной экспрессией генов рецепторов стероидных гормонов на фоне максимальных концентраций изученных цитокинов, включая фактор роста, а также значимого повышения уровня иммуносупрессивного АБГ и дефицита регуляторно-транспортного $\alpha 2$ -МГ в циркуляции, что создает условия злокачественной трансформации и способствует прогрессии заболевания. Данные различия могут быть использованы при составлении комплексного алгоритма для верификации диагноза и выбора оптимальной тактики ведения.

Список литературы / References

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // Российский онкологический журнал, 1996. № 1. С. 64-66. [Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V. Programmed cell death (apoptosis). *Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal = Russian Cancer Journal*, 1996, no. 1, pp. 64-66. (In Russ.)]
2. Гурьев Т.Д., Сидорова И.С., Унанян А.Л. Сочетание миомы матки и аденомиоза. М.: МИА, 2012. 251 с. [Guriev T.D., Sidorova I.S., Unanyan A.L. Combination of uterine fibroids and adenomyosis]. Moscow: Moscow News Agency, 2012. 251 p.
3. Зорин Н.А., Зорина В.Н. Эволюция белков семейства макроглобулинов – от бактерий до приматов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 2017. Т. 53, № 6. С. 389-397. [Zorin N.A., Zorina V.N. Evolution of macroglobulin family proteins – from bacteria to primates. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2017, Vol. 53, no. 6, pp. 389-397. (In Russ.)]
4. Левченко В.Г., Зорина В.Н., Баженова Л.Г., Зорина Р.М., Зорин Н.А. Некоторые аспекты патогенеза преэклампсии у беременных // Российский вестник акушера-гинеколога, 2010. Т. 10, № 3. С. 21-25. [Levchenko V.G., Zorina V.N., Bazhenova L.G., Zorina R.M., Zorin N.A. Some aspects of preeclampsia pathogenesis at pregnancy. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*, 2010, Vol. 10, no. 3, pp. 21-25. (In Russ.)]
5. Печеникова В.А., Акопян Р.А., Кветной И.М. К вопросу о патогенетических механизмах развития и прогрессии внутреннего генитального эндометриоза – аденомиоза // Журнал акушерства и женских болезней, 2015. Т. LXIV, вып. 6. С. 51-57. [Pechenikova V.A., Akopyan R.A., Kvetnoy I.M. To a question of pathogenetic mechanisms of development and a progression of internal genital endometriosis – an adenomyosis. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2015, Vol. LXIV, issue 6, pp. 51-57. (In Russ.)]
6. Родионова М.В., Воротников И.К., Родионов В.В., Чхиквадзе Н.В., Дудко Е.А., Рябчиков Д.А., Ошкина Е.В., Богуш Т.А. Эстрогеновые рецепторы бета как маркеры эффективности гормональной терапии рака молочной железы // Российский биотерапевтический журнал, 2015. Т. 14, № 2. С. 39-46. [Rodionova M.V., Vorotnikov I.K., Rodionov V.V., Chkhivadze N.V., Dudko E.A., Ryabchikov D.A., Oshkina E.V., Bogush T.A. Role of estrogen receptor beta in the development and treatment of breast cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2015, Vol. 14, no. 2, pp. 39-46. (In Russ.)]
7. Сидорова И.С., Унанян А.Л., Агеев М.Б., Ведерникова Н.В., Жолобова Н.М. Современное состояние вопроса о патогенезе, клинике, диагностике и лечении миомы матки у женщин репродуктивного возраста // Акушерство, гинекология, репродукция, 2012. Т. 6, № 4. С. 22-28. [Sidorova I.S., Unanyan A.L., Ageev M.B., Vedernikova N.V., Zholobova N.M. The current state of the issue of the pathogenesis, clinic, diagnosis and treatment of uterine fibroids in women of reproductive age. *Akusherstvo, ginekologiya, reproduksiya = Obstetrics, Gynecology, Reproductology*, 2012, Vol. 6, no. 4, pp. 22-28. (In Russ.)]
8. Стрижаков А.Н., Давыдов А.В., Пашков В.М., Лебедев В.А. Доброкачественные заболевания матки. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 304 с. [Strizhakov A.N., Davydov A.V., Pashkov V.M., Lebedev V.A. Benign uterine diseases. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 304 p.]

9. Сысоев К.А., Кулагина Н.В., Тотолян А.А. Особенности экспрессии цитокинов в перитонеальной жидкости у больных с лейомиомой матки // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 4. С. 547-556. [Sysoev K.A., Kulagina N.V., Totolian A.A. Cytokine expression profiles of peritoneal fluid in patients with uterine leiomyoma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 4, pp. 547-556. doi: 10.15789/1563-0625-2006-4-547-556.
10. Cui R.R., Wright J.D., Hou J.Y. Uterine leiomyosarcoma: a review of recent advances in molecular biology, clinical management and outcome. *BJOG*, 2017, Vol. 124, no. 7, pp. 1028-1037.
11. Foca C., Moses E.K., Quinn M.A., Rice G.E. Differential expression of the alpha(2)-macroglobulin receptor and the receptor associated protein in normal human endometrium and endometrial carcinoma. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000, Vol. 6, no. 10, pp. 921-927.
12. Kobayashi H., Uekuri C., Akasaka J., Ito F., Shigemitsu A., Koike N., Shigetomi H. The Biology of uterine sarcomas: A review and update. *Mol. Clin. Oncol.*, 2013, Vol. 1, no. 4, pp. 599-609.
13. Manta L., Suciu N., Toader O., Purcărea R.M., Constantin A., Popa F. The etiopathogenesis of uterine fibromatosis. *J. Med. Life.*, 2016, Vol. 9, no. 1, pp. 39-45.
14. Plewka D., Marczyński J., Morek M., Bogunia E., Plewka A. Receptors of hypothalamic-pituitary-ovarian-axis hormone in uterine myomas. *Biomed. Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 521313. doi: 10.1155/2014/521313.
15. Zhang Q., Ubago J., Li L., Guo H., Liu Y., Qiang W., Kim J.J., Kong B., Wei J.J. Molecular analyses of 6 different types of uterine smooth muscle tumors: Emphasis in atypical leiomyoma. *Cancer*, 2014, Vol. 120, no. 20, pp. 3165-3177.

Авторы:

Шрамко С.В. — к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

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

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

Ботвиньева И.А. — к.б.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией, ГБУЗ «Новокузнецкий перинатальный центр», г. Новокузнецк, Россия

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

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

Authors:

Shramko S.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Novokuznetsk State Institute for the Postgraduate Education of Physicians, Novokuznetsk, Russian Federation

Zorina V.N., PhD, MD (Biology), Main Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute for the Postgraduate Education of Physicians, Novokuznetsk, Russian Federation

Zorin N.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute for the Postgraduate Education of Physicians, Novokuznetsk, Russian Federation

Botvinyeva I.A., PhD (Biology), Head, Clinical Diagnostic Laboratory, Novokuznetsk Perinatal Center, Novokuznetsk, Russian Federation

Arkhipova S.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute for the Postgraduate Education of Physicians, Novokuznetsk, Russian Federation

Likhacheva V.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Novokuznetsk State Institute for the Postgraduate Education of Physicians, Novokuznetsk, Russian Federation

Поступила 11.01.2018

Отправлена на доработку 17.01.2018

Принята к печати 08.02.2018

Received 11.01.2018

Revision received 17.01.2018

Accepted 08.02.2018

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ХЕМОКИНОВ, ИХ РЕЦЕПТОРОВ, ГЕНОВ БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ И ГЕНА CD4 ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ОЖИРЕНИЯ У ЖЕНЩИН

Кочетова О.В., Ахмадишина Л.З., Корытина Г.Ф., Викторова Т.В.

ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук», г. Уфа,
Республика Башкортостан, Россия

Резюме. В настоящей работе была исследована частота генотипов и аллелей генов хемокинов (*CXCL12* rs1801157, *CCL2* rs1024611), рецепторов хемокинов (*CCR5* del32, *CX3CR1* rs3732378), гена белков острой фазы воспаления *SAA* rs1136743 и гена *CD14* rs2569190 у женщин-татарок из Республики Башкортостан, страдающих ожирением и избыточной массой тела.

Группу пациенток составили неродственные между собой женщины с ожирением ИМТ ≥ 30 кг/м² (n = 225), женщины с избыточной массой тела ИМТ 25,0–29,9 кг/м² (n = 184) и женщины контрольной группы (n = 327) ИМТ < 25,0 кг/м². Генотипирование выполнено методом ПЦР-ПДРФ анализа. Группы пациенток и контроля отличались по таким показателям, как масса тела (p = 0,00001), уровень индекса массы тела (p = 0,001) и уровень глюкозы натощак (p = 0,0001).

При проведении исследования была выявлена ассоциация с ожирением генотипов *AG-AA* (p = 0,007) и аллеля *A* (p = 0,003) полиморфного локуса rs3732378 гена *CX3CR1* и генотипа *TT* (p = 0,027) и аллели *T* (p = 0,021) полиморфного локуса rs1136743 гена *SAA*. Показано, что генотип *AA* полиморфного локуса rs3732378 гена *CX3CR1* ассоциирован с повышенной массой тела (p = 0,002) и повышенным уровнем ИМТ (p = 0,018); генотип *GG* полиморфного локуса rs1024611 гена *CCL2* ассоциирован с повышенным уровнем глюкозы натощак (p = 0,001).

На основе клинико-генетических данных и с использованием логистической регрессии выявлены статистически значимые различия, позволяющие прогнозировать развитие ожирения у женщин-татарок.

Ключевые слова: ожирение, генетические маркеры, хемокины, рецепторы хемокинов, воспаление

Адрес для переписки:

Кочетова Ольга Владимировна
ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского
научного центра Российской академии наук»
450054, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа,
пр. Октября, 71.
Тел.: 8 (917) 428-12-02.
E-mail: Olga_MK78@mail.ru

Address for correspondence:

Kochetova Olga V.
Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Center
450054, Russian Federation, Bashkortostan Republic, Ufa,
October Prospect, 71.
Phone: 7 (917) 428-12-02.
E-mail: Olga_MK78@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Кочетова, Л.З. Ахмадишина, Г.Ф. Корытина,
Т.В. Викторова «Анализ полиморфных вариантов генов
хемокинов, их рецепторов, генов белков острой фазы
воспаления и гена CD4 при формировании ожирения
у женщин» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5.
С. 739–746. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-739-746
© Кочетова О.В. и соавт., 2018

For citation:

O.V. Kochetova, L.Z. Akhmadishina, G.F. Korytina,
T.V. Victorova "Gene polymorphism analysis of chemokines,
chemokine receptors, acute phase proteins, and CD14 in
female obesity development", *Medical Immunology (Russia)/*
Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 739–746.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-739-746
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-739-746

GENE POLYMORPHISM ANALYSIS OF CHEMOKINES, CHEMOKINE RECEPTORS, ACUTE PHASE PROTEINS, AND CD14 IN FEMALE OBESITY DEVELOPMENT

Kochetova O.V., Akhmadishina L.Z., Korytina G.F., Victorova T.V.

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Center, Ufa, Bashkortostan Republic, Russian Federation

Abstract. In the present study, we have investigated frequency of genotypes and functional alleles of genes encoding chemokines (*CXCL12* rs1801157, *CCL2* rs1024611), chemokine receptors (*CCR5* del32, *CX3CR1* rs3732378), acute phase proteins *SAA* rs1136743, and *CD14* rs2569190 polymorphisms among Tatar obese or overweight women from the Republic of Bashkortostan.

The group of patients comprised unrelated women with obesity (BMI ≥ 30 kg/m², n = 225), females with overweight (BMI 25.0-29.9 kg/m², n = 184), and control group of women (n = 327) BMI < 25.0 kg/m². Genotyping was performed by PCR-RFLP analysis. Patients and controls differed in such parameters as body weight (p = 0.00001), BMI level (p = 0.001) and fasting glucose level (p = 0.0001).

An association was revealed between obesity and *AG-AA* genotypes (p = 0.007) and *A* allele (p = 0.003) of polymorphic locus rs3732378 of *CX3CR1* gene, as well as *TT* genotype (p = 0.027) and *T* allele (p = 0.021) of polymorphic locus rs1136743 of *SAA* gene. It has been shown that the *AA* genotype of polymorphic locus rs3732378 of the *CX3CR1* gene is associated with increased body weight (p = 0.002) and elevated BMI (p = 0.018); the *GG* genotype of polymorphic locus rs1024611 of the *CCL2* gene is associated with elevated fasting glucose level (p = 0.001).

As based on clinical and genetic data and using logistic regression, some statistically significant differences were revealed, which allow to predict development of obesity in Tatar women.

Keywords: obesity, genetic markers, chemokines, chemokine receptors, inflammation

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов, связанных с рукописью.

Работа получила частичную финансовую поддержку РГНФ и РФФИ р_Поволжье и программу поддержки биоресурсных коллекций ФАНО.

Введение

Многочисленные исследования последних лет показали значительную роль хронического низкоинтенсивного воспаления жировой ткани в развитие ожирения. Воспаление жировой ткани (ВЖТ) принимает участие в формировании избыточной массы тела, сахарного диабета 2 типа (СД2), метаболического синдрома (МС) и других осложнений. Жировая ткань (ЖТ) секретирует молекулы, регулирующие широкий спектр метаболических и иммунных процессов [1]. Питательные вещества, поступающие в большом количестве, запасаются в жировой ткани, это обуславливает увеличение объема клеток адипоцитов и развитию окислительного стресса, приводящего к воспалению. Непосредственно в жировой ткани наблюдаются реакции, присущие воспалению: инфильтрация нейтрофилами, лимфоцита-

ми, макрофагами, секреция хемокинов и молекул адгезии, преобразование моноцитов в макрофаги. Так поддерживается высокий воспалительный фон в жировой ткани и в организме в целом. Наибольшее значение в этом случае придается хемокину MCP-1 или CCL2. Рядом авторов было установлено повышение уровня CCL2 у больных сахарным диабетом 2 типа и выявлена роль полиморфных вариантов гена *CCL2* в механизмах инсулиновой резистентности [4]. У мышей с таргетной делецией гена *CCL2* или его рецептора наблюдается сниженное количество макрофагов в ЖТ, тогда как повышенная экспрессия гена *CCL2* приводит к повышению макрофагов в ЖТ. Доказано, что выраженность этого воспаления строго коррелирует со степенью ожирения. Позже было показано, что в жировой ткани продуцируется большое число различных хемокинов CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, а также происходит активация рецепторов хемокинов CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 [1].

Известно, что некоторые нуклеотидные полиморфизмы могут увеличивать или уменьшать транскрипционную активность гена. Выявление

данных о распределении полиморфных вариантов генов, продукты которых принимают участие в патогенезе низкоинтенсивного хронического воспаления, является актуальным. Имеющиеся данные о роли генов системы воспаления при ожирении зачастую противоречивы. Данный момент обусловлен, прежде всего, этническими различиями испытуемых, что и обуславливает актуальность и необходимость данного исследования.

Целью исследования явился анализ вклада полиморфных вариантов генов хемокинов (*CCL2*, *CXCL1*), рецепторов хемокинов (*CCR5*, *CX3CR1*), гена белков острой фазы воспаления (*SAAI*) и гена *CD4* при формировании ожирения у женщин татарской этнической принадлежности, проживающих на территории Республики Башкортостан.

Материалы и методы

Группу пациенток татарской этнической принадлежности составили неродственные между собой женщины с ожирением, индекс массы тела (ИМТ) более 30 кг/м² (N = 225); женщины с избыточной массой тела, ИМТ которых варьировал от 25,0 до 29,9 кг/м² (N = 184). Контрольная выборка включала 327 женщин-татарок. Контрольная группа была подобрана в соответствии с уровнем ИМТ (менее 25 кг/м²) и средним возрастом, сопоставимым со средним возрастом пациенток. Проведенное исследование одобрено Комитетом по этике ИБГ УНЦ РАН, протокол № 8 от 14.03.2012 г. От всех участников было получено информированное добровольное согласие на использование биологического материала в планируемых исследованиях.

Клиническая характеристика испытуемых представлена в таблице 1. Сравнение клинических характеристик показало статистически значимые различия при сравнении групп пациенток и контроля по параметрам массы тела ($p = 0,00001$), уровня индекса массы тела (ИМТ) ($p = 0,001$) и уровня глюкозы натощак ($p = 0,0001$). Также различия были получены при сравнении женщин с избыточной массой тела и контрольной группой по массе тела ($p = 0,00001$), ИМТ ($p = 0,001$) и уровня глюкозы натощак ($p = 0,008$).

Отбор генов системы воспаления, включенных в анализ, основывался на анализе литературных данных результатов ранее проведенных исследований по ожирению и СД 2 типа. Образцы ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфного локу-

са гена *CCR5* del32 проводили с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплифицировали фрагмент размером 276 п.н., несущий потенциальную делецию в 32 парах нуклеотидов. Генотипирование полиморфных маркеров генов *CXCL12* (rs1801157), *CD14* (rs2569190), *CCL2* (rs1024611), *CX3CR1* (rs3732378), *SAAI* (rs1136743) анализировали при помощи ПЦР с последующим расщеплением продукта соответствующими рестриктазами. Условия проведения ПЦР, последовательности праймеров описаны в таблице 2.

Ассоциация между полиморфными вариантами исследуемых генов и ожирением оценивалась с использованием критерия χ^2 Пирсона. Сравнивались попарно группы женщин с ожирением и контроль, женщины с избыточной массой тела и женщины контрольной группы. Равновесие Харди–Вайнберга рассчитывали в программе [8]. Регрессионный анализ применяли для оценки взаимодействия полиморфного локуса и клинических данных с использованием пакета программ SNPStats [12].

Мы получили данные о распределении частот аллелей и генотипов шести однонуклеотидных полиморфных маркеров генов: *CCR5* (del32), *CXCL12* (rs1801157), *CD14* (rs2569190), *CCL2* (rs1024611), *CX3CR1* (rs3732378), *SAAI* (rs1136743) у женщин с ожирением и избыточной массой тела и контрольной группой. В таблице 3 представлены данные о распределении частот аллелей и генотипов исследованных полиморфных маркеров генов, показавших ассоциацию с ожирением, значения χ^2 , уровень значимости (p). Отклонения от равновесия Харди–Вайнберга у женщин контрольной группы не выявлено (табл. 3).

Частота распределения генотипов и аллелей исследованных генов у пациенток и сравнительный анализ распределения частот генотипов показали, что у женщин с ожирением наблюдается повышение частоты генотипов *AG* и *AA* полиморфного локуса rs3732378 гена *CXCR1* по сравнению с контрольной группой ($p = 0,007$, OR = 1,7 CI 95% 1,17-2,38). Ассоциация подтвердилась и в случае сравнения частоты встречаемости аллелей, было выявлено снижение частоты аллеля *G* и увеличение аллеля *A* в группе женщин с ожирением ($p = 0,003$, OR = 1,6 CI 95% 1,18-2,18). Анализ распределения генотипов и аллелей локуса rs3732378 гена *CXCR1* в группе женщин с избыточной массой тела также выявил ассоциацию генотипов *AG* и *AA* и аллеля *A* с ожирением ($p = 0,001$, OR = 1,0 CI 95% 0,68-1,47 и $p = 0,002$, 1,68 CI 95% 1,22-2,31 соответственно).

ТАБЛИЦА 1. АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИХ И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ИСПЫТУЕМЫХ

TABLE 1. CLINICAL AND METABOLIC PARAMETERS OF SUBJECTS UNDER STUDY

Показатель Parameters	Ожирение Obesity (n = 225)	Избыточная масса тела Overweight (n = 184)	Контроль Control group (n = 327)	p*	p**
Возраст, г Age, year	43,1±2,6	39,8±2,4	39,1±2,9	0,47	0,81
Рост, см Height, cm	163,0±5,6	161,7±5,4	162,8±5,6	0,62	0,40
Масса тела, кг Body mass, kg	90,2±3,7	77,6±3,4	56,9±3,4	0,00001	0,00001
Индекс массы тела, кг/м ² Body mass index, kg/m ²	40,1±1,7	26,6±1,5	21,2±1,8	0,001	0,001
Продолжительность забо- левания, г Disease duration, year	20,5±2,1	–	–	–	–
Уровень глюкозы натощак, ммоль/л Fasting glucose, mmol/L	5,9±1,3	5,1±1,9	4,1±0,8	0,0001	0,008

Примечание. χ^2 , p* – χ^2 и уровень значимости при сравнении контроля с группой ожирения; χ^2 , p** – χ^2 и уровень значимости при сравнении контроля с группой избыточной массы тела.

Note. χ^2 , p*, comparison between the obese women and control group; χ^2 , p**, comparison between the overweight women and control control.

ТАБЛИЦА 2. ПОЛИМОРФНЫЕ МАРКЕРЫ, ИХ ЛОКАЛИЗАЦИЯ, НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ, РЕСТРИКТАЗЫ И АЛЛЕЛИ

TABLE 2. POLYMORPHIC MARKERS, THEIR LOCATION, PRIMERS SEQUENCES, RESTRICTION ENZYMES AND ALLELES

Ген, хромосомная локализация Gene, chromosomal location	Полиморфизм, локализация Polymorphism, location	Праймеры, рестриктаза Primers, restriction enzyme	Аллель, размеры фрагментов, п.н. Allele, the sizes of fragments, b.p.
CCR5 3p21	32 I/D p.Ser185Ile rs333	F 5'-tgc cgc cca gtg gga ctt tg-3' R 5'-cgg cag gac cag ccc caa g-3'	D 318 I 350
CXCL12 10q11	rs1801157 12197A>G 3'-конец 3'-flanking regions	F 5'-ctg ggg gtg cca gga cca gt-3' R 5'-ccc tgc tgc cct ccc aga aga-3' MspI	A-147 G-116 and 31
CD14 5q31	rs2569190 c.-260T>C	F 5'-cag ttc cct cct ctg tga acc-3' R 5'-atc atc ctt ttc cca cac cca-3' HaeIII	A-249 G-108 and 141
CCL2 17q12	rs1024611 -2518A>G 5'-конец 5'-flanking regions	F 5'-ctc acg cca gca ctg acc tcc-3' R 5'-agc cac aat cca gag aag gag acc-3' PvuII	A-300 G-228 and 72
CX3CR1 3p21.3	rs3732378 T280M экзон 2 exon 2	F 5'-gga ctg agc gcc cac aca gg-3' R 5'-agg ctg gcc ctc agt gtg act-3' BstNAI	A-148 G-128 and 20
SAA1 11p15.1	rs1136743 A70V экзон 3 exon 3	F 5'-ccc ctc taa ggt gtt gtt gga-3' R 5'-ctc cac aag gag ctc gtc tc-3' BshNI	T-289 C-183 and 106

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ИССЛЕДОВАННЫХ ГЕНОВ У ПАЦИЕНТОК И КОНТРОЛЯ

TABLE 3. DISTRIBUTION OF GENOTYPES AND ALLELES OF THE STUDIED GENES IN PATIENTS AND CONTROL GROUP

Генотип/ аллель Genotype/ allele	Ожирение Obesity (n = 225)	Избыточная масса тела Overweight (n = 184)	Контроль ИМТ Control group (n = 327)	χ^2 , p*	χ^2 , p**
CCR5 del32					
I/I	194 86.22	144 78.26	264 80.73	2,95	0,45
D/I	30 13.33	38 20.65	60 18.35	0,22	0,79
D/D	1 0.44	2 1.09	3 0.92		
I	418 92.89	326 88.59	588 89.91	2,57	0,306
D	32 7.11	42 11.41	66 10.09	0,109	0,58
CXCL12 rs1801157					
G/G	113 50.22	97 52.72	163 49.85	0,66	1,46
A/G	103 45.78	81 44.02	146 44.65	0,72	0,48
A/A	9 4.00	6 3.26	18 5.50		
G	329 73.11	275 74.73	472 72.17	0,08	0,19
A	121 26.89	93 25.27	182 27.83	0,78	0,66
CD14 rs2569190					
T/T	53 23.56	50 27.17	73 22.32	2,74	2,07
C/T	109 48.44	90 48.91	180 55.05	0,25	0,36
C/C	63 28.00	44 23.91	74 22.63		
T	215 47.78	190 51.63	326 49.85	0,38	0,23
C	235 52.22	178 48.37	328 50.15	0,54	0,63
CCL2 rs1024611					
A/A	122 54.22	100 54.35	165 50.46	2,16	0,72
A/G	94 41.78	73 39.67	140 42.81	0,34	0,70
G/G	9 4.00	11 5.98	22 6.73		
A	338 75.11	273 74.18	470 71.87	1,27	0,53
G	112 24.89	95 25.82	184 28.13	0,26	0,47
CX3CR1 rs3732378					
G/G	132 58.67	100 54.35	230 70.34	9,80,	13,28
A/G	81 36.00	79 42.93	90 27.52	0,007	0,001
A/A	12 5.33	5 2.72	7 2.14		
G	345 76.67	279 75.82	550 84.10	9,11	10,01
A	105 23.33	89 24.18	104 15.90	0,003	0,002
SAA rs1136743					
C/C	63 28.00	57 30.98	111 33.94	7,20	0,65
T/C	112 49.78	103 55.98	171 52.29	0,027	0,72
T/T	50 22.22	24 13.04	45 13.76		
C	238 52.89	217 58.97	393 60.09	0,357	0,08
T	212 47.11	151 41.03	261 39.91	0,021	0,77

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Анализ распределения частот генотипов и аллелей выявил тенденцию к увеличению частоты генотипов *TT* и *CT* полиморфного локуса rs1136743 гена *SAA1* в группе пациенток с ожирением по сравнению с контрольной группой ($p = 0,033$, $OR = 1,41$ CI 95% 0,97-2,05) (табл. 2). При сравнении аллелей было выявлено статистически значимое повышение частоты аллеля *T* в группе пациенток, показатель OR составил 1,35 (CI 95% 1,06-1,72), $p = 0,017$.

Было проведено сравнение количественных клинических и антропометрических характеристик пациенток с ожирением в соответствии с генотипами полиморфных локусов исследованных генов. Статистически значимые различия были получены только в группе пациенток. В результате исследования была выявлена тенденция к увеличению массы тела у носителей генотипа *AA* полиморфного локуса rs1801157 гена *CXCL12* ($\beta = 11,66$ (CI 95% 0,63-22,69), $p = 0,056$). Анализ полиморфного локуса rs3732378 гена *CX3CR1* выявил ассоциацию генотипа *AA* с повышенной массой тела ($\beta = 19,27$ (CI 95% 8,39-30,16), $p = 0,002$), носители генотипа *GG* имели в среднем 75,73 кг массы тела, носители генотипа *AG* – 75,7 кг, а генотипа *AA* – 95 кг; также была выявлена ассоциация с уровнем ИМТ ($\beta = 5,48$ (CI 95% 1,67-9,28), $p = 0,018$), носители генотипа *GG* имели 34,35 кг/м², носители генотипа *AG* – 28,87 кг/м², индивиды с генотипом *AA* – 34,35 кг/м².

Было установлено, что полиморфный маркер rs1024611 гена *CCL2* ассоциирован с уровнем глюкозы натощак. Носители генотипа *AA* (rs1024611 гена *CCL2*) имели пониженный уровень глюкозы, который составил 5,18 ммоль/л по сравнению с 7,33 ммоль/л и 6,58 ммоль/л у носителей аллеля *G* в гомозиготном и гетерозиготном состоянии соответственно ($\beta = 0,67$ [CI 95% 0,23-0,89], $p = 0,001$). Анализ количественных признаков и полиморфных вариантов генов *CCR5*, *CD14*, *SAA* статистически значимых различий не выявил.

В настоящий момент уже достаточно хорошо известна роль генов хемокинов и их рецепторов, а также других генов системы воспаления в развитии ожирения и СД 2 типа [1]. Учитывая наличие генетического разнообразия этнических групп, актуальным и необходимым является проведение репликативных исследований новых маркеров с риском развития ожирения. Проведенный анализ полиморфных вариантов генов системы воспаления у женщин с ожирением выявил статистически значимые различия по следующим генетическим маркерам: *CXCR1*

(rs3732378), *SAA1* (rs1136743), *CXCL12* (rs1801157), *CCL2* (rs1024611). Полученные результаты согласуются с исследованием других авторов. Выявленная нами ассоциация полиморфного локуса rs3732378 гена *CX3CR1* (рецептора фракталкина) с риском развития ожирения у женщин-татарок соответствует результатам, полученным Sirois-Gagnon D. и соавт. [11]. Известно, что вариант T280M, обусловленной заменой треонина на метионин в положении 280 2-го экзона, влияет на экспрессию гена *CX3CR1*. Полиморфный вариант *M* гена *CXCR1* (rs3732378) ассоциирован с ожирением, резистентностью к инсулину, СД2 и атеросклерозом [7, 11]. Сниженное количество фракталкина и его рецептора было обнаружено в сыворотке крови у больных с нервной анорексией. Повышенная экспрессия этих хемокинов была выявлена в адипоцитах лиц, страдающих ожирением [15]. Фракталкин CX3CL1 и его рецептор CX3CR1 рассматривают в качестве важных маркеров активации воспалительного процесса, связанного с хемотаксисом различных лейкоцитов в зону воспаления. Было показано, что система *CX3CL1-CX3CR1* модулирует адгезию моноцитов к адипоцитам [15]. И можно утверждать, что комплекс *CX3CL1-CX3CR1* представляет собой важное звено хемокинов, модулирующих адгезию моноцитов к адипоцитам и отвечающих за воспаление жировой ткани.

Ассоциация полиморфных вариантов локуса rs1136743 гена *SAA1* с ожирением также находит свое подтверждение, по данным других авторов [13]. *SAA1* относят к основным белкам острой фазы воспаления. *SAA1* также способствует миграции моноцитов и лимфоцитов, повышая уровень экспрессии хемокинов. Было обнаружено, что *SAA1* ассоциируется с уровнем холестерина в крови. Известно, что повышенный уровень *SAA1* вызывает амилоидоз и является фактором риска развития атеросклероза, а также определяет клинические осложнения СД2. Вместе с тем механизм, который может связывать генетический полиморфизм *SAA1* с ожирением, пока неизвестен.

В отношении полиморфных вариантов локуса rs1024611 гена *CCL2* получены противоречивые данные. В ряде исследований была выявлена протективная ассоциация полиморфного варианта *G* гена *CCL2* (rs1024611) с уровнем глюкозы натощак. Так, в работе Teler J. и соавт. [14] была установлена защитная роль аллеля *G* в развитии гестационного сахарного диабета. Simeoni E. и соавт. [10] провели большое исследование среди европеоидов, включающее 3307 человек,

и выявили, что аллель *G* негативно коррелирует с уровнем CCL2 в плазме крови и распространенностью резистентности к инсулину и СД2. Вместе с тем в нашем исследовании протективная ассоциация выявлена с аллелем *A*, что согласуется с данными других авторов, проводивших исследование, в польской и индийской популяциях [2, 5]. Показано, что полиморфизм промоторного региона g.2493A>G (rs1024611) влияет на экспрессию гена *CCL2* [9]. По сравнению с аллелем *A*, присутствие аллеля *G* усиливает транскрипцию гена *CCL2* и увеличивает продукцию белка *CCL2* *in vitro* и *in vivo*. Лейкоциты индивидуумов с генотипами *GG* и *AG* производят значительно более высокие уровни CCL2, чем носители генотипа *AA* [2]. В работе Kim C.S. и соавт. [6] было показано, что уровень циркулирующего CCL2 значительно повышен у пациентов с ожирением, так же как и уровень экспрессии

CCL2 в жировой ткани пациентов с ожирением значительно выше, чем у испытуемых с нормальной массой тела. CCL2 считается ответственным за накопление макрофагов в жировой ткани. Предыдущие исследования показали, что повышенный уровень в сыворотке крови CCL2 у людей коррелирует с маркерами метаболического синдрома, ожирением, резистентностью к инсулину, диабету, гипертонией и увеличением концентрации триацилглицерола в сыворотке [3].

В заключение следует отметить, что результаты нашей работы подтверждают предположение о влиянии полиморфизма генов *CCL2*, *CXCL1*, *CCR5*, *CX3CR1*, *SAAL1*, *CD4* на процессы, играющие важную роль в патогенезе воспаления жировой ткани. Проведенное исследование еще раз подчеркивает важность молекулярно-генетических исследований ожирения в зависимости от популяционной структуры населения.

Список литературы / References

1. Шварц В. Жировая ткань как эндокринный орган // Проблемы эндокринологии, 2009. Т. 55, № 1. С. 38-43. [Schwartz V. Adipose tissue as an endocrine organ. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2009, Vol. 55, no. 1, pp. 38-43. (In Russ.)]
2. Dabrowska-Zamojcin E., Romanowski M., Dziedzic V., Maciejewska-Karlowska A., Sawczuk M., Safranow K., Domanski L., Pawlik A. CCL2 gene polymorphism is associated with post-transplant diabetes mellitus. *Int. Immunopharmacol.*, 2016, Vol. 32, pp. 62-65.
3. Dworacka M., Krzyżagórska E., Iskakova S., Bekmukhambetov Y., Urazayev O., Dworacki G. Increased circulating RANTES in type 2 diabetes. *Eur. Cytokine Netw.*, 2014, Vol. 25, no. 3, pp. 46-51.
4. Jiang Z., Hennein L., Xu Y., Bao N., Coh P., Tao L. Elevated serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and its genetic polymorphism is associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with Type 2 diabetes. *Diabet. Med.*, 2016, Vol. 33, no. 1, pp. 84-90.
5. Kaur S., Panicker S.R., James T., Sarma P.S., Thankappan K.R., Kartha C.C. Association of monocyte chemoattractant Protein-1-2518 polymorphism with metabolic syndrome in a South Indian cohort. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, 2009, Vol. 7, no. 3, pp. 193-198.
6. Kim C.S., Park H.S., Kawada T., Kim J.H., Lim D., Hubbard N.E., Kwon B.S., Erickson K.L., Yu R. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int. J. Obes. (Lond.)*, 2006, Vol. 30, pp. 1347-1355.
7. Moatti D., Faure S., Fumeron F., Amara Mel-W., Seknadji P., McDermott D.H., Debré P., Aumont M.C., Murphy P.M., de Prost D., Combadière C. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 7, pp. 1925-1928.
8. Rodriguez S., Gaunt T.R., Day I.N. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studie. *Am. J. Epidemiol.*, 2009, Vol. 169, no. 4, pp. 505-514.
9. Rovin B.H., Lu L., Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, Vol. 259, no. 2, pp. 344-348.
10. Simeoni E., Hoffmann M.M., Winkelmann B.R., Ruiz J., Fleury S., Boehm B.O., März W., Vassalli G. Association between the A-2518 G polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 gene and insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2004, Vol. 47, no. 9, pp. 1574-1580.
11. Sirois-Gagnon D., Chamberland A., Perron S., Brisson D., Gaudet D., Laprise C. Association of common polymorphisms in the fractalkine receptor (CX3CR1) with obesity. *Obesity*, 2011, Vol. 19, no. 1, pp. 222-227.
12. Sole X., Guino E., Valls J., Iniesta R., Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 2006, Vol. 22, no. 15, pp. 1928-1929.
13. Sun L., Ye R.D. Serum amyloid A1: Structure, function and gene polymorphism. *Gene*, 2016, Vol. 583, no. 1, pp. 48-57.

14. Teler J., Tarnowski M., Safranow K., Maciejewska A., Sawczuk M., Dziedziejko V., Sluczanska-Glabowska S., Pawlik A. CCL2, CCL5, IL4 and IL15 gene polymorphisms in women with gestational diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.*, 2017, Vol. 49, no. 1, pp 10-15.

15. Zhang S., Tang H., Gong C., Liu J., Chen J. Assessment of serum CX3CL1/fractalkine level in Han Chinese girls with anorexia nervosa and its correlation with nutritional status: a preliminary cross-sectional study. *J. Investig. Med.*, 2016, Vol. 65, no. 2, pp. 333-337.

Авторы:

Кочетова О.В. — к.б.н., научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук», г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Ахмадишина Л.З. — к.б.н., научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук», г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Корытина Г.Ф. — д.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук», г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Викторова Т.В. — д.м.н., главный научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук», г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Authors:

Kochetova O.V., PhD (Biology), Research Associate, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Center, Ufa, Bashkortostan Republic, Russian Federation

Akhmadishina L.Z., PhD (Biology), Research Associate, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Center, Ufa, Bashkortostan Republic, Russian Federation

Korytina G.F., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Center, Ufa, Bashkortostan Republic, Russian Federation

Victorova T.V., PhD, MD (Medicine), Main Research Associate, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Center, Ufa, Bashkortostan Republic, Russian Federation

Поступила 19.10.2017
Принята к печати 23.10.2017

Received 19.10.2017
Accepted 23.10.2017

ДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГРАНУЛИЗИНА И КАТЕЛИЦИДИНА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ, БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Авербах М.М. (мл.), Панова Л.В., Губкина М.Ф., Евсеева Н.И.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Резюме. Цитолитические молекулы системы врожденного иммунитета гранулизин и кателицидин являются важными защитными факторами при инфицировании микобактериями туберкулеза. Нами получены данные о высоких показателях гранулизина и кателицидина у группы инфицированных МБТ детей и подростков. У больных туберкулезом органов дыхания показано низкое содержание сывороточного кателицидина при деструктивных формах, а гранулизина — при «малых» формах туберкулеза до начала специфической химиотерапии. Проведенная химиотерапия не оказывала влияния на содержание гранулизина и кателицидина в сыворотке у больных с деструктивным туберкулезом, тогда как у больных «малыми» формами (ТВГЛУ/очаговый туберкулез) выявлено достоверное увеличение содержания гранулизина через 6 месяцев лечения и кателицидина — через 3 месяца химиотерапии с последующим возвращением к исходному уровню.

Ключевые слова: туберкулез, дети, подростки, врожденный иммунитет, гранулизин, кателицидин

DYNAMIC CHANGES OF GRANULYSIN AND CATHELICIDIN IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH DIFFERENT FORMS OF PULMONARY TUBERCULOSIS

Averbakh M.M. (Jr), Panova L.V., Gubkina M.F., Evseeva N.I.

Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Abstract. Granulysin and cathelicidin, the cytolytic molecules of innate immune system are important protective factors during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. We present original data concerning high levels of granulysin and cathelicidin among the group of children and adolescents with latent TB infection.

Адрес для переписки:

Авербах Михаил Михайлович (мл.)
ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
Факс: 8 (499) 785-91-08.
E-mail: amtm50@mail.ru

Address for correspondence:

Averbakh Michael M. (Jr)
Central Research Institute for Tuberculosis
107564, Russian Federation, Moscow, Yauzskaya all., 2.
Phone: 7 (499) 785-90-72.
Fax: 7 (499) 785-91-08.
E-mail: amtm50@mail.ru

Образец цитирования:

М.М. Авербах (мл.), Л.В. Панова, М.Ф. Губкина, Н.И. Евсеева «Динамические изменения гранулизина и кателицидина у детей и подростков, больных различными формами туберкулеза органов дыхания» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 747–752.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-747-752
© Авербах М.М. (мл.) и соавт., 2018

For citation:

M.M. Averbakh (Jr), L.V. Panova, M.F. Gubkina, N.I. Evseeva
“Dynamic changes of granulysin and cathelicidin in children and adolescents with different forms of pulmonary tuberculosis”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 747–752. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-747-752
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-747-752

Patients with tuberculosis of the respiratory system exhibit significantly lower amounts of serum cathelicidin in destructive forms, as well as granulysin levels in “minor” forms of tuberculosis before starting the specific chemotherapy. The chemotherapy performed did not influence the serum granulysin and cathelicidin contents in patients with destructive tuberculosis, whereas the patients with “minor” forms (TLN/focal tuberculosis) revealed a significant increase in granulysin content after 6 months of treatment, and same trend for cathelicidin concentrations after 3 months of chemotherapy, followed by subsequent return to baseline values.

Keywords: tuberculosis, children, adolescent, innate immunity, granulysin, cathelicidin

Введение

Актуальность

Гранулизин и кателицидин, а также другие цитолитические молекулы (β -дефензин, перфорин, гранзим) относятся к веществам, обеспечивающим различные механизмы врожденного иммунитета. Гранулизин синтезируется в гранулах активированных цитотоксических $CD8^+$ Т-клетках и НК-клетках в виде молекулы 15 kDa и частично 9 kDa и оказывает цитотоксическое действие на опухолевые клетки и широкий спектр грамположительных и грамотрицательных бактерий и внутриклеточных бактерий. Применительно к *M. tuberculosis* гранулизин повреждает клеточную стенку через нарушение метаболизма липидов [14]. Кроме того, гранулизин индуцирует экспрессию генов различных провоспалительных цитокинов и хемокинов (RANTES, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , IL-10, IL-1, IL-6 и IFN α). Также показано, что небольшая часть субпопуляции $CD4^+$ Т-клеток может лизировать *M. tuberculosis*-инфицированные макрофаги с использованием молекул гранулизина и перфорина [7]. Кроме того, показано, что при вакцинации БЦЖ образуются $CD4^+$ Т-клетки памяти, обладающие способностью экспрессировать гранулизин и перфорин [8]. В дальнейшем было показано, что у больных туберкулезом детей и подростков имеются Т-клетки памяти с фенотипом $CD4^+CD45RO^+$, специфичные к *M. tuberculosis* и экспрессирующие гранулизин, причем основным источником являются пролиферирующие Т-клетки памяти с фенотипом CFSE^{low} $CD4^+CD45RO^+$ [10].

Кателицидин человека hCAP-18/LL-37 (human cationic antimicrobial protein, 18 kDa — название относится к пептиду 18 кДа, полученному внеклеточным протеолизом из С-конца CAP человека [катионный антимикробный белок]) вырабатывается в плоскоклеточном эпителии

дыхательных путей, рта, языка, пищевода и кишечника. Кроме того, этот пептид секретируется в поту, слюне, раневой жидкости и в семенной плазме.

Методами иммуногистохимии и гибридизации *in situ* показана продукция hCAP18/LL-37 моноцитами, Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами, НК-клетками, эпителиальными клетками и тучными клетками, что приводит к реализации его основной функции в виде аккумуляции на поверхности бактерий и повреждает их мембраны посредством образования ионных каналов, ведущих к гипосмотическому лизису микроорганизмов. Он способен индуцировать секрецию хемокинов, включая CXCL8 (IL-8) и CCL2 (MCP-1), которые рекрутируют дендритные клетки, моноциты и нейтрофилы на место повреждения, и увеличивает индуцированную IL-1 секрецию IL-6, IL-10 [1].

Исследования, посвященные клинической значимости содержания гранулизина и кателицидина в сыворотке крови при туберкулезе не многочисленны по сравнению с исследованиями различных звеньев адаптивного иммунитета. Так, Sahiratmadja E. и соавт. [11] показали, что содержание сывороточного гранулизина у взрослых, больных туберкулезом, до начала противотуберкулезной терапии было достоверно низким по сравнению с контрольной группой. При легкой/средней выраженности туберкулезных изменений (по Международной классификации туберкулеза) его количество составляло 1,1 нг/мл (0,1-11,2) и при значительной — 0,9 нг/мл (0,1-12,4), тогда как в контроле находилось на уровне 2,6 нг/мл (0,2-44,6). Через 2 месяца химиотерапии показатели повышались до 2,7 нг/мл (0,3-8,5) и 2,4 нг/мл (0,3-14,5) и к окончанию лечения составляли 4,1 нг/мл (1,1-28,8) и 3,8 нг/мл (0,5-22,5) соответственно. В аналогичных исследованиях на больных

туберкулезом детского возраста уровень сывороточного гранулизина до начала лечения составлял 0,45 нг/мл (0,33-2,98), а в контрольной группе был достоверно выше 1,4 нг/мл (0,22-6,00). После 4-месячного курса лечения уровень гранулизина достоверно возрастал и достигал уровня контрольной группы [6]. Прямая антимикробная активность hCAP18/LL-37 показана как в культуре *M. tuberculosis*, так и на экспериментальной микобактериальной инфекции при интратрахеальном заражении микобактериями (штамм H37Rv) у мышей Balb/c [4]. Исследования о содержании кателицидина в биологических жидкостях у больных туберкулезом единичны. Так, показано увеличение его концентрации в жидкости БАЛ у больных туберкулезом по сравнению со здоровым контролем [3]. Также было показано, что концентрация кателицидина была выше у больных активным туберкулезом при положительном посеве на микобактерии и незначительно снижалась в первые 2 месяца химиотерапии [15]. Однако к настоящему моменту не ясна степень выраженности гранулизина и кателицидина у больных детско-подросткового возраста при деструктивных процессах и «малых» формах туберкулеза, учитывая появляющиеся данные о возможном клиническом применении синтетических аналогов гранулизина и особенно кателицидина в комплексе с терапией витамином Д [12].

Целью настоящего исследования явилось изучение содержания гранулизина и кателицидина плазмы крови у детей и подростков больных раз-

личными формами туберкулеза в процессе противотуберкулезной химиотерапии.

Материалы и методы

Исследование проведено на 49 больных, разделенных на три группы. В группу больных с деструктивным туберкулезом включено 15 человек в возрасте от 14 до 17 лет. Инфильтративный туберкулез в фазе распада и обсеменения диагностирован у 8 человек, диссеминированный туберкулез в фазе распада — у 3 человек, множественные туберкуломы в фазе распада и обсеменения — у 2 человек, фиброзно-кавернозный туберкулез — у 1 человека и казеозная пневмония — у 1 человека.

В исследование включено 25 больных в возрасте от 3 до 16 лет с «малыми» формами туберкулеза органов дыхания. Туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ) диагностирован у 11 человек, в том числе с очагами отсева в легочную ткань — 2 человека; очаговый туберкулез легких — 14 человек. Большинство процессов были выявлены в фазе начинающейся кальцинации — 10 человек и реже в фазе уплотнения — 10 человек, и в фазе инфильтрации — 5 человек.

Группу инфицированных МБТ составили 9 пациентов в возрасте от 5 до 14 лет, обратившихся по поводу контакта с больными туберкулезом и имевших положительные реакции на пробу Манту с 2 ТЕ и Диаскинтест.

Гранулизин определяли в К₃ЭДТА плазме методом иммуноферментного анализа с помощью набора SEB517Hu (Cloud-Clone Corp.) согласно инструкции изготовителя. Диапазон определе-

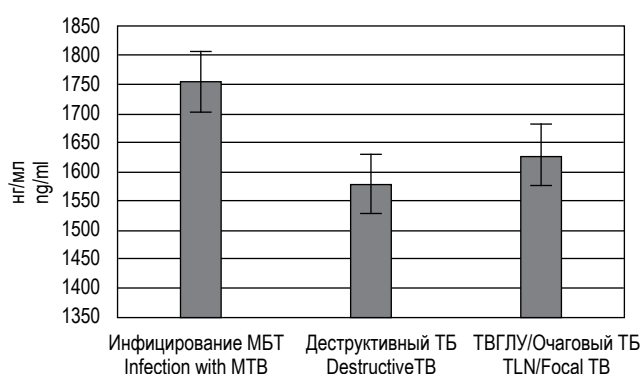


Рисунок 1. Содержание кателицидина до начала лечения

Figure 1. Cathelicidin content before treatment

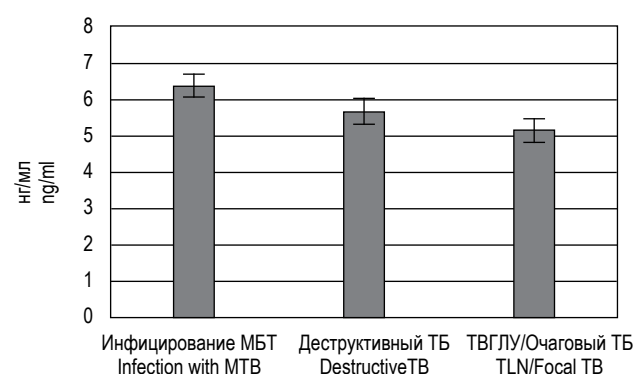


Рисунок 2. Содержание гранулизина до начала лечения

Figure 2. Granulysin content before treatment

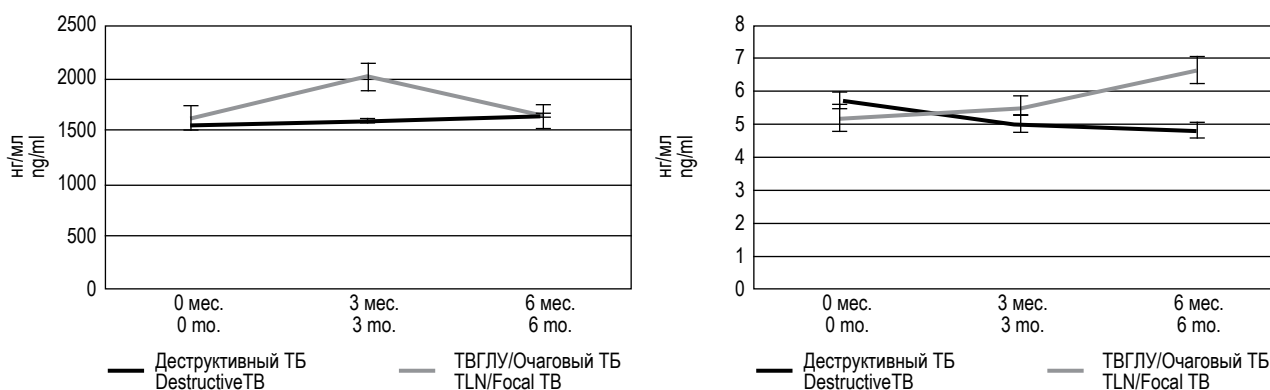


Рисунок 3. Динамические изменения кателицидина и гранулизина

Figure 3. Dynamic changes of cathelicidin and granulysin

ния тест-системы – 0,25-15 нг/мл, минимальная определяемая концентрация – 0,08 нг/мл.

Кателицидин определяли в К₃ЭДТА плазме методом иммуноферментного анализа с помощью набора СЕС419Hu (Cloud-Clone Corp.) согласно инструкции изготовителя. Диапазон определения тест-системы 123,5-10 000 нг/мл, минимальная определяемая концентрация 47,4 нг/мл, концентрация белка в ЭДТА плазме у волонтеров составила 161-1041 нг/мл. Результаты обрабатывались статистически с помощью пакета Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Сравнение результатов содержания в плазме исследуемых факторов у 3 исследуемых групп показало, что до начала лечения уровень содержания кателицидина не имел достоверных различий между исследуемыми группами (деструктивный, ТВГЛУ/очаговый и инфицированные – $1578,1 \pm 123,14$, $1549,08 \pm 97,26$ и $1752,43 \pm 225,3$ соответственно) (рис. 1). Содержание гранулизина было более низкое в группе больных с ТВГЛУ/очаговым туберкулезом по сравнению с группой инфицированных МБТ ($5,14 \pm 0,18$ нг/мл и $6,37 \pm 0,12$ нг/мл, $p = 0,009449$ соответственно) (рис. 2).

В результате проводимой противотуберкулезной химиотерапии содержание кателицидина в плазме в группе деструктивного туберкулеза не менялось, а в группе больных «малыми» формами туберкулеза достоверно возрастало к 3-м месяцам до $2011,3 \pm 134,1$ нг/мл ($p = 0,042984$) и затем снижалось до уровня первоначальных показателей (рис. 3).

Содержание гранулизина плазмы крови у больных деструктивным туберкулезом не меня-

лось в процессе лечения (до лечения $-6,17 \pm 0,78$, через 3 и 6 месяцев – $4,96 \pm 0,63$ и $4,79 \pm 0,69$ соответственно), а в группе больных «малыми» формами туберкулеза достоверно возрастало к 6-ти месяцам с $5,13 \pm 0,18$ нг/мл до $6,56 \pm 0,5$ нг/мл ($p = 0,023631$), что было сравнимо с показателями у группы инфицированных МБТ пациентов ($6,37 \pm 0,12$ нг/мл).

В экспериментальных и клинических исследованиях по иммунологии туберкулеза клеточным и гуморальным компонентам врожденного иммунитета традиционно отведена вторичная роль, и в основном рассматриваются такие компоненты, как нейтрофильные лейкоциты, Toll-подобные рецепторы, НК-клетки и в значительно меньшей степени цитолитические молекулы (гранулизын, кателицидин, β -дефензин, перфорин, гранзим) [9]. Существует представление, что реакции врожденного иммунитета преимущественно активны на стадии «латентной» фазы туберкулеза при наличии положительных кожных проб и IGRA-тестов и малозначимы при активном функционировании специфического адаптивного иммунитета [5].

Нами получены данные о высоких показателях гранулизина и кателицидина у группы инфицированных МБТ детей и подростков, и даже достоверно более высоких для гранулизина по сравнению с группой ТВГЛУ/очагового туберкулеза. В процессе лечения в последнем случае уровень фактора достоверно возрастал до уровня группы инфицированных МБТ. Сходная динамика изменения этого фактора у детей представлена в исследовании di Liberto D. и соавт. [6]. Вероятно, это можно связать с возрастанием субпопуляции CD8 T-лимфоцитов, которая увеличивается в результате успешной химиотерапии [2].

Нами выявлено достоверное возрастание концентрации кателицидина у больных ТВГЛУ/очаговым туберкулезом через 3 месяца после начала специфической химиотерапии с последующим возвращением к исходному уровню у нелеченых больных. Нам представляется, что данный эффект может возникать вследствие временной активизации моноцитарно-макрофагального звена иммунитета и выработки кателицидина моноцитами. Подобный эффект описан Fiske С.Т. и соавт. [7], которые показали подъем продукции хемокинов CCL2 (MCP-1) у этой категории больных в результате проведенного лечения [7].

Таким образом, активная продукция цитолитических молекул гранулизина и кателицидина характерна для инфицированных МБТ пациентов. Значимость продукции этих факторов при деструктивных формах туберкулеза невелика вследствие преобладания реакций Т-клеточного звена адаптивного иммунитета. Однако роль кателицидина и особенно гранулизина более заметна при «малых» формах туберкулеза, где в результате специфической химиотерапии происходит подъем уровня их продукции до уровня инфицированных МБТ пациентов.

Список литературы / References

1. Agerberth B., Charo J., Werr J., Olsson B., Idali F., Lindbom L., Kiessling R., Jornvall H., Wigzell H., Gudmundsson G.H. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 2000, Vol. 96, pp. 3086-3093.
2. Caccamo N., Meraviglia S., La Mendola C., Guggino G., Dieli F., Salerno A. Phenotypical and functional analysis of memory and effector human CD8 T cells specific for mycobacterial antigens. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, pp. 1780-1785.
3. Cakir E., Torun E., Gedik A.H., Umutoglu T., Aktas E.C., Topuz U., Deniz G. Cathelicidin and human β -defensin 2 in bronchoalveolar lavage fluid of children with pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, 2014, Vol. 18, pp. 671-675.
4. Castañeda-Delgado J., Hernández-Pando R., Serrano C.J., Aguilar-León D., León-Contreras J., Rivas-Santiago C., Méndez R., González-Curiel I., Enciso-Moreno A., Rivas-Santiago B. Kinetics and cellular sources of cathelicidin during the course of experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2010, Vol. 161, pp. 542-550.
5. Dheda K., Schwandre S.K., Zhu B., van Zyl-Smit S.K., Zhang V. The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirology*, 2010, Vol. 15, pp. 433-450.
6. di Liberto D., Buccheri S., Caccamo N., Serena Meraviglia S., Amelia Romano A., di Carlo P., Titon L., Francesco Dieli F., Krensky A.M., Salerno A. Decreased serum granulysin levels in childhood tuberculosis which reverse after therapy. *Tuberculosis (Edinb)*, 2007, Vol. 87, pp. 322-328.
7. Fiske C.T., de Almeida C.N., Shintani A.K., Kalam A., Sterlina T.R. Abnormal immune responses in persons with previous extrapulmonary tuberculosis in an *in vitro* model that simulates *in vivo* infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2012, Vol. 19, pp. 1142-1149.
8. Gansert J.L., Kiessler V., Engele M., Wittke F., Röllinghoff M., Krensky A.M., Porcelli S.A., Modlin R.L., Stenger S. Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, pp. 3154-3161.
9. Korbel D.S., Schneider B.E., Schaible U.E. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect.*, 2008, Vol. 10, 995e1004. doi: 10.1016/j.micinf.2008.07.039.
10. Mueller H., Fae K.C., Magdorf M., Ganoza C.A., Wahn U., Gühlich U., Feiterna-Sperling C., Kaufmann S.H.E. Granulysin-expressing CD4⁺ T cells as candidate immune marker for tuberculosis during childhood and adolescence. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, Issue 12, e29367. doi: 10.1371/journal.pone.0029367.
11. Sahiratmadja E., Alisjahbanad B., Buccheri S., Di Liberto D., de Boera T., Adnanc I., van Crevel R., Kleina M.R., van Meijgaarden K.E., Nelwang R.H.H., van de Vosse E., Dielie F., Ottenhoff T.H.M. Plasma granulysin levels and cellular interferon- γ production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon- γ levels correlate with tuberculosis disease activity in adults. *Tuberculosis*, 2007, Vol. 87, pp. 312-321.
12. Selvaraj P. Vitamin D, vitamin D receptor, and cathelicidin in the treatment of tuberculosis. *Vitam. Horm.*, 2011, Vol. 86, pp. 307-324.

13. Soehnlein O., Zernecke A., Eriksson E.E., Rothfuchs A.G., Pam C.T., Herwald H., Bidzhekov K., Rottenberg M.E., Weber C., Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*, 2008, Vol. 112, pp. 1461-1567.
14. Krensky A.M., Clayberger C. Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue Antigens*, 2009, Vol. 73, pp. 193-198.
15. Yamshchikov A.V., Kurbatova E.V., Kumari M., Blumberg H.M., Ziegler T.R., Ray S.M., Tangpricha V. Vitamin D status and antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37) concentrations in patients with active pulmonary tuberculosis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010, Vol. 92, pp. 603-611.

Авторы:

Авербах М.М. (мл.) — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Панова Л.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник детско-подросткового отдела ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Губкина М.Ф. — д.м.н., ведущий научный сотрудник детско-подросткового отдела ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Евсеева Н.И. — младший научный сотрудник детско-подросткового отдела ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Authors:

Averbakh M.M. (Jr), PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Department of Immunology, Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Panova L.V., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Pediatric Department, Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Gubkina M.F., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Pediatric Department, Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Evsееva N.I., Junior Research Associate, Pediatric Department, Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.09.2017
Отправлена на доработку 10.10.2017
Принята к печати 08.11.2017

Received 29.09.2017
Revision received 10.10.2017
Accepted 08.11.2017

АНАЛИЗ СПЕКТРА АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ У ПАЦИЕНТОВ С ТРОМБОЗАМИ И ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Ткаченко О.Ю.¹, Лапин С.В.¹, Шмонин А.А.^{1, 2, 3}, Соловьева Л.Н.²,
Бондарева Е.А.¹, Сельков С.А.⁴, Чепанов С.В.⁴, Тотолян Арег А.^{1, 5},
Роггенбук Дирк^{6, 7}

¹ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² СПб ГБУЗ «Городская больница № 26», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

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

⁶ Бранденбургский технический университет, Коттбус-Зенфтенберг, Зенфтенберг, Германия

⁷ GA Generic Assays GmbH, Далевиц, Германия

Резюме. Лабораторная диагностика антифосфолипидного синдрома (АФС) состоит в выявлении антифосфолипидных антител (АФА) методом иммуноферментного анализа (ИФА), а именно в детекции антикардиолипиновых (аКл) антител и антител к бета-2-гликопротеину (аβ2GPI). Использование классических ИФА тест-систем затруднено их недостаточной стандартизацией. Новым подходом к детекции антифосфолипидных антител является использование мультиплексного лайн-блоттинга (ЛБ), преимуществом которого является сорбция антигенов на гидрофобной PVDF-мембране и детекция спектра АФА.

Целью данного исследования является анализ диагностической ценности нового ЛБ в постановке серологического диагноза АФС.

Нами была собрана коллекция образцов сывороток 45 пациентов с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, 19 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей и 44 пациента с привычным невынашиванием беременности, а также 50 клинически здоровых доноров. В данных сыворотках были измерены аКл IgG, аКл IgM, аβ2GPI методом ИФА с помощью тест-систем фирм Euroimmun (ПР1) и Orgentec Diagnostica (ПР2) и аКл IgG, аКл IgM, аβ2GPI, а также некритериальные АФА – методом иммуноблоттинга на тест-системе фирмы Medipan (ПР3).

При использовании ИФА тест-систем ПР1 аКл и аβ2GPI детектировались у 30,5 % пациентов. ИФА

Адрес для переписки:

Ткаченко Ольга Юрьевна
ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова»
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого,
6-8, корп. 28.
Тел.: 8 (921) 095-94-98.
E-mail: tkachenie@mail.ru

Address for correspondence:

Tkachenko Olga Yu.
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg, L. Tolstoy str., 6-8,
bldg 28.
Phone: 7 (921) 095-94-98.
E-mail: tkachenie@mail.ru

Образец цитирования:

О.Ю. Ткаченко, С.В. Лапин, А.А. Шмонин,
Л.Н. Соловьева, Е.А. Бондарева, С.А. Сельков,
С.В. Чепанов, Арег А. Тотолян, Дирк Роггенбук «Анализ
спектра антифосфолипидных антител у пациентов
с тромбозами и привычным невынашиванием
беременности» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20,
№ 5. С. 753-762. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-753-762
© Ткаченко О.Ю. и соавт., 2018

For citation:

O. Yu. Tkachenko, S. V. Lapin, A. A. Shmonin, L. N. Solovyova,
E. A. Bondareva, S. A. Selkov, S. V. Chepanov, Areg A. Totolian,
Dirk Roggenbuck "Ranging of antiphospholipid antibodies in the
patients with thrombophilia and recurrent miscarriage", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20,
no. 5, pp. 753-762. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-753-762
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-753-762

методом на тест-системах ПР2 АФА были обнаружены у 38% пациентов. Методом ЛБ аКл и аβ2GP1 были выявлены у 30% пациентов. Встречаемость средних и высоких титров АФА, измеренных методом ИФА на тест-системах ПР1 и ПР2, составила 12 и 11% соответственно, а методом ЛБ – 16,6%. При анализе спектра АФА методом ЛБ чаще всего обнаруживались аβ2GP1, аФс, аКл, аАн V, аФк.

Метод мультиплексного лайн-блоттинга ЛБ показывает более высокую чувствительность при детекции средних и высоких титров АФА, а также позволяет выявить пациентов с множественной АФА позитивностью.

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром, антифосфолипидные антитела, иммуноферментный анализ, лайн-блоттинг, новые методы

RANGING OF ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES IN THE PATIENTS WITH THROMBOPHILIA AND RECURRENT MISCARRIAGE

Tkachenko O.Yu.^a, Lapin S.V.^a, Shmonin A.A.^{a, b}, Solovyova L.N.^b,
Bondareva E.A.^a, Selkov S.A.^d, Chepanov S.V.^d, Totolian Areg A.^{a, e},
Roggenbuck Dirk^{f, g}

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

^b City Hospital No. 26 of St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation

^c V. Almazov North-West Federal Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

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

^e St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

^f Brandenburg University of Technology, Cottbus-Senftenberg, Senftenberg, Germany

^g GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz, Germany

Abstract. Laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS) is based on detection of antiphospholipid antibodies (aPLs). E.g., aPLs are directed against conformational epitopes of the so-called “co-factor” proteins: β2-glycoprotein 1 (β2-GP1), annexin V (An V) and prothrombin (Pt) that are formed during interaction with phospholipids – cardiolipin (CL), phosphatic acid (Pha), phosphatidylcholine (Pch), phosphatidylethanolamine (Pe), phosphatidylglycerol (Pg), phosphatidylinositol (Pi), phosphatidylserine (Ps). A routine methodology of detection based on ELISA testing is challenged by new tests when the antigen is absorbed on another kind of support like microbeads or membranes that can influence density of conformational epitopes for aPL's binding. The aim of our study was to compare the results of aPLs detection by ELISA and multi-line immunodot assay (MLD).

We collected blood serum samples from 45 patients with noncardioembolic ischemic strokes, 19 patients with recurrent deep vein thrombosis of lower limbs, 44 females with recurrent miscarriages, and 50 clinically healthy donors. To compare the results of aPL detection by ELISA and MLD kits, the test systems from different manufacturers were evaluated. We used an ELISA kits for detection of antibodies to CL IgG, aCL IgM, β2-GP1 produced by Euroimmun AG (Mr1) and Orgentec Diagnostica GmbH (Mr2) and MLD – for detection of antibodies to CL, β2-GP1, Pch, Pe, Pg, Pi, Ps, AnV and Pt (Medipan GmbH, Mr3).

When a cut-off titer was used as the main index, 30.5% of patients were aPLs-positive with ELISA method by Mr1 and 38%, with Mr2. By MLD aPLs were detected in 30% of patients. In the same cohort, medium and high aPLs titers (> 40 U/mL) were determined in 12% of patients using ELISA kits. Positive and highly positive aPLs titers were determined in 16% when using a new method by Mr3. Medium and high titer were detected only for antibodies to β2-GP1, CL, An V, Pha and Pch.

The use of ELISA approach for detection of aPLs in patients with thrombosis and obstetric pathology is associated with relatively high number of low-positive ELISA results. Due to higher sensitivity for medium and high aPLs titers, MLD testing may be used as a confirming method for APS diagnosis.

Keywords: antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, enzyme-linked immunosorbent assays, multi-line dot assay, new methods

Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда. Соглашение РНФ № 16-15-00118.

Введение

Антифосфолипидные антитела (АФА) — семейство аутоантител, направленных против конформационных эпитопов плазменных белков, которые образуются в результате их взаимодействия с анионными фосфолипидами [2, 3, 12]. Это семейство включает антитела, направленные против фосфолипид-связывающих, или «кофакторных», белков, а именно β 2-гликопротеина 1 ($\alpha\beta$ 2GP1), аннексина V (aAn V) и протромбина (aПт). Также выделяют антитела к отрицательно заряженным фосфолипидам — к кардиолипину (aКл), фосфатидилглицеролу (aФг), фосфатидилинозитолу (aФи), фосфатидилсерину (aФс), фосфатидиловой кислоте (aФк), и нейтрально заряженным фосфолипидам — фосфатидилэтаноламину (aФэ), фосфатидилхолину (aФх) [16, 25].

Выявление aКл и $\alpha\beta$ 2GP1 в качестве диагностического показателя включено в лабораторные критерии антифосфолипидного синдрома (АФС) [19], а детекция aКл — в лабораторные критерии системной красной волчанки (СКВ) SLICC 2012 [24]. Однако АФА обнаруживаются у пациентов с другими аутоиммунными, инфекционными и лимфопролиферативными заболеваниями, а также у здоровых доноров, не проявляя себя тромбозами или акушерской патологией [8, 9, 14, 27, 28]. По мнению ряда авторов [17], разные представители семейства АФА различаются по уровню патогенности, который также зависит от используемого лабораторного метода их определения.

Исторически АФА определяли с помощью метода радиоиммунного анализа [13], однако в настоящее время широко используется иммуноферментный анализ (ИФА). Отсутствие стандартизации ИФА тест-систем ведет к низкой сопоставимости результатов при использовании тест-систем разных производителей [7]. Использование ИФА приводит к большому количеству ложноположительных результатов и необходимости повторного обследования. В связи с этим актуальна оценка клинико-диагностических параметров новых твердофазных методов для детекции АФА.

Особого внимания заслуживает метод лайн-блоттинга (ЛБ) [11]. Преимуществом ЛБ при сравнении с ИФА является «мультиплексный» подход, позволяющий одновременно детекти-

ровать до 10 разновидностей АФА. Кроме того, уникальные особенности гидрофобной PVDF-мембраны позволяют достичь более высокой плотности антигена. **Целью данного исследования** является анализ диагностической ценности нового метода ЛБ в постановке серологического диагноза АФС.

Материалы и методы

Нами были собраны 44 образца сыворотки крови пациентов с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, 19 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей, 45 пациентов с акушерской патологией, а также 50 здоровых доноров. Все пациенты, включенные в исследование, были моложе 50 лет и не имели других аутоиммунных, лимфопролиферативных и хронических инфекционных заболеваний в анамнезе.

Согласно рекомендациям по детекции АФА для твердофазных тест-систем [6], исследования на АФА были проведены в течение 2–3 дней после взятия крови, пробы поставлены в дублях, проведен расчет внутрилабораторного референтного интервала (РИ) непараметрическим методом 99 перцентиль для каждой из ИФА тест-систем.

Для исследования клинической значимости результатов тестов методом ЛБ и сравнения с результатами ИФА были оценены тест-системы различных производителей. Мы использовали ИФА тест-системы фирмы Euroimmun (Германия), в дальнейшем именуемой Производитель 1 (ПР1), ИФА тест-системы фирмы Orgentec Diagnostica (Германия), Производитель 2 (ПР2), и тест-системы фирмы Medipan (Германия), основанные на методе ЛБ, Производитель 3 (ПР3), в соответствии с инструкцией. Получены результаты измерений ИФА тест-систем в оптических единицах и результаты ЛБ метода в денситометрических единицах, оцененных программой DotBlot-Analyzer как слабopоложительный (+), положительный (++) и восokopоложительный (+++) результаты. В собранных образцах сыворотки крови измерены $\alpha\beta$ 2GP1, aКл классов IgG и IgM, антитела методом ИФА, кроме того широкий спектр аутоантител, в том числе aКл, $\alpha\beta$ 2GP1, aФх, aФэм, aФг, aФэл, aФс, aФк, aAn V и aПр классов IgG и IgM исследовали методом ЛБ.

Для сравнительного анализа полученных результатов были использованы методы описательной статистики (вычисление средних значений, средних квадратических отклонений, медианы) и непараметрические (критерий Хи-квадрат Пирсона) методы статистической обработки.

Результаты

Референтные интервалы (РИ) ИФА тестов всех производителей наборов реактивов были получены путем обследования 50 сывороток здоровых доноров.

Для сравнения методов ИФА и ЛБ была оценена частота выявления АФА в каждой группе пациентов, с учетом верхней границы РИ (табл.1).

В общей когорте пациентов при использовании ИФА тест-систем ПР1 аКл и аβ2GP1 детектировались в 30,5 % образцах, ИФА методом на тест-системах ПР2 АФА были обнаружены у 38% пациентов. Методом ЛБ аКл и аβ2GP1 были выявлены у 30% пациентов.

Так как авторы международных критериев АФС указывают на клиническое значение только средних и высоких титров АФА, мы проанализи-

ТАБЛИЦА 1. ВСТРЕЧАЕМОСТЬ АФА В ГРУППАХ ПАЦИЕНТОВ С НЕКАРДИОЭМБОЛИЧЕСКИМИ ИШЕМИЧЕСКИМИ ИНСУЛЬТАМИ, С РЕЦИДИВИРУЮЩИМИ ТРОМБОЗАМИ ГЛУБОКИХ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ И ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ, ИЗМЕРЕННЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАМИ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

TABLE 1. THE FREQUENCY OF APA IN GROUPS OF PATIENTS WITH NONCARDIOEMBOLIC ISCHEMIC STROKES, RECURRENT DEEP VEIN THROMBOSIS OF THE LOWER EXTREMITIES AND RECCURENCE MISCARRIAGE, MEASURED BY KITS FROM DIFFERENT MANUFACTURERS

ПР MR	АФА aPLs	ВГРИ* ULRR*	Пациенты с острым инсультом Patients with noncardioembolic ischemic strokes (n = 44)	Пациентки с невынашиванием беременности Patients with reccurence miscarriage (n = 45)	Пациенты с тромбозом глубоких вен Patients with recurrent deep vein thrombosis of the lower extremities (n = 19)	Всего All (n = 108)
ПР1 MR1	аКл (IgG + IgM) aCl (IgG + IgM)	> 12 U/ml	1 (2,2%)	19 (42%)	3 (15,7%)	23 (21,2%)
		> 40 U/ml	1 (2,2%)	2 (4,5%)	1 (5,2%)	4 (3,7%)
	аβ2GP1 (IgGAM)	> 20 U/ml	3 (6,8%)	8 (18%)	1 (5,2%)	12 (11,1%)
		> 40 U/ml	1 (2,2%)	7 (15,5%)	1 (5,2%)	9 (8,2%)
ПР2 MR2	аКл (IgG + IgM) aCl (IgG + IgM)	> 10 U/ml	14 (31,8%)	11 (24%)	2 (10,5%)	27 (25%)
		> 40 U/ml	1 (2,2%)	2 (4,5%)	1 (5,2%)	4 (3,7%)
	аβ2GP1 (IgGAM)	> 10 U/ml	10 (22,7%)	16 (35%)	2 (10,5%)	28 (25,9%)
		> 40 U/ml	1 (2,2%)	11 (24%)	1 (5,2%)	8 (12%)
ПР3 MR3	аКл (IgG + IgM) aCl (IgG + IgM)	≥ +	2 (4,5%)	11 (24%)	6 (31,5%)	19 (17,5)
		≥ ++	2 (4,5%)	1 (2,2%)	3 (15,7%)	6 (5,5%)
	аβ2GP1 (IgGAM)	≥ +	10 (22,7%)	11 (24%)	5 (26,3%)	26 (24%)
		≥ ++	4 (9%)	7 (15,5%)	1 (5,2%)	12 (11,1%)

Примечание. ПР1 – Euroimmun (Германия), ПР2 – Orgentec Diagnostica (Германия), ПР3 – Medipan (Германия); ВГРИ – верхняя граница референтного интервала: рассчитана непараметрическим методом 99 перцентиль при детекции АФА в группе 50 здоровых доноров.

Note. MR1, Euroimmun (Germany); MR2, Orgentec Diagnostica (Germany); MR3, Medipan (Germany); ULRR is the upper limit of the reference range: calculated by the nonparametric 99 percentile method on APA detection in the group of 50 healthy donors.

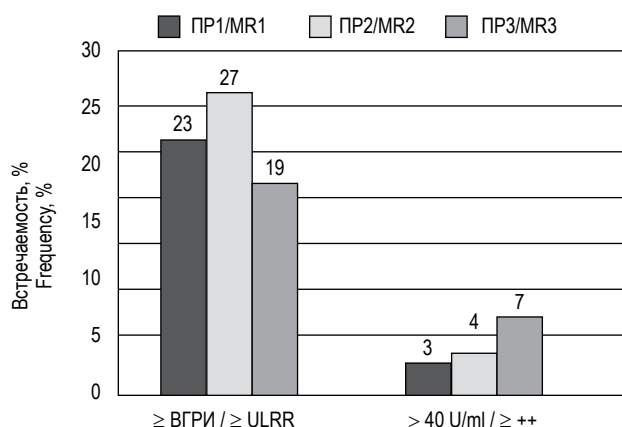


Рисунок 1. Встречаемость антикардиолипиновых антител, измеренных тест-системами ПР1, ПР2, ПР3

Примечание. ВГРП – верхняя граница референсного интервала, ПР1 – ИФА тест-системы фирмы Euroimmun (Германия), ПР2 – ИФА тест-системы фирмы Orgentec Diagnostika (Германия), ПР3 – метод ЛБ фирмы Medipan.

Figure 1. Frequency of anticardiolipin antibodies detected by kits of MR1, MR2, MR3

Note. ULRR, upper limit of reference range; MR1, ELISA kits by Euroimmun (Germany); MR2, ELISA kits by Orgentec Diagnostika; MR3, multi-line immunodot assay by Medipan.

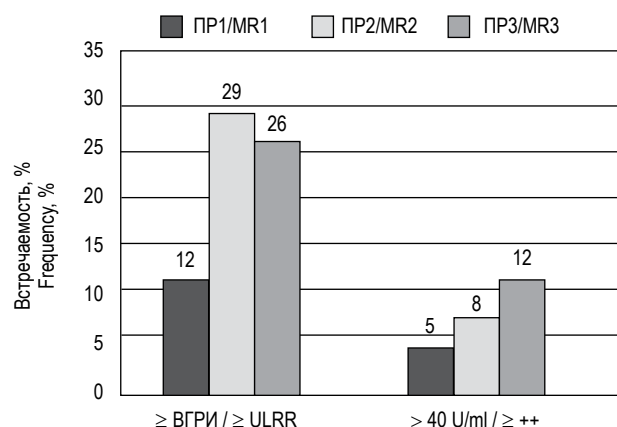


Рисунок 2. Встречаемость антител к β2-гликопротеину 1, измеренных тест-системами ПР1, ПР2, ПР3

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Frequency of antibodies to β2-glycoprotein 1 detected by kits of MR1, MR2, MR3

Note. As for Figure 1.

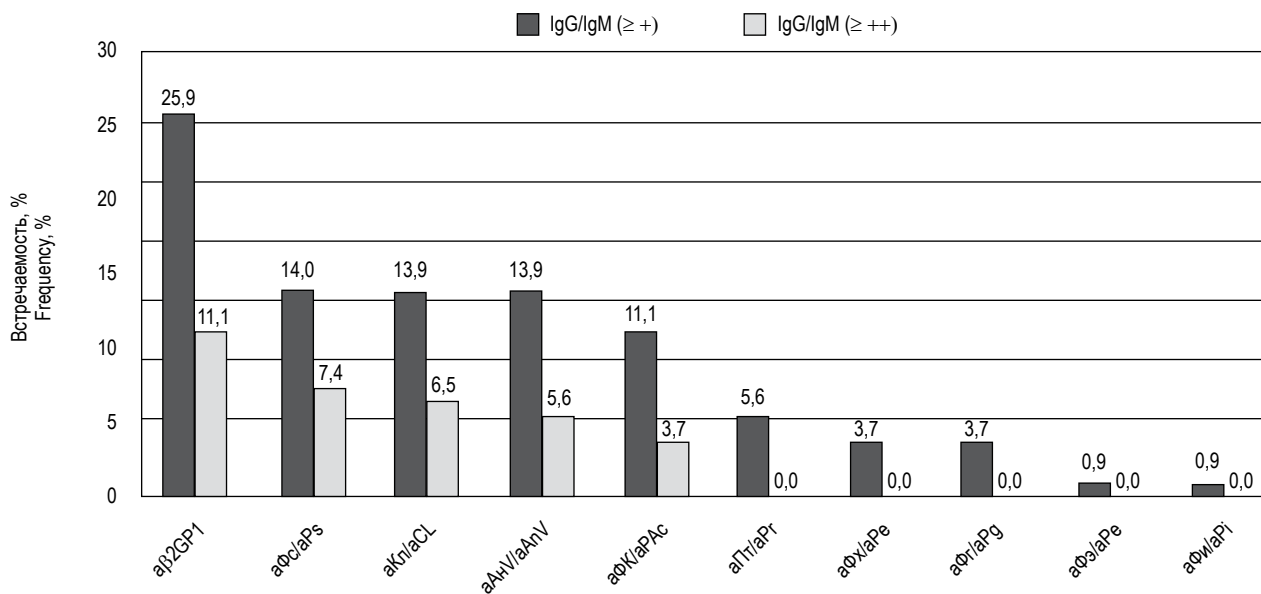


Рисунок 3. Спектр антифосфолипидных антител, измеренный методом лайн-блоттинга

Примечание. АФА – антифосфолипидные антитела, αβ2GP1 – антитела к β2-гликопротеину 1, аКл – антитела к кардиолипину, аАнV – антитела к аннексину V, аПт – антитела к протромбину, аФС – антитела к фосфатидилсерину, аФг – антитела к фосфатидилглицеролу, аФи – антитела к фосфатидилинозитолу, аФк – антитела к фосфатидиловой кислоте, аФэ – антитела к фосфатидилэтаноламину, аФх – антитела к фосфатидилхолину, ПР1 – ИФА тест-системы фирмы Euroimmun (Германия), ПР2 – ИФА тест-системы фирмы Orgentec Diagnostika (Германия), ПР3 – метод ЛБ фирмы Medipan.

Figure 3. Spectrum of aPLs detected by multi-line immunodot assay

Note. aPLs, antiphospholipid antibodies; aβ2GP1, antibodies to β2-Glycoprotein 1; aCL, antibodies to cardiolipins; aAnV, antibodies to annexin V; aPr, antibodies to prothrombin; aPs, antibodies to phosphatidylserine; aPg, antibodies to phosphatidylglycerol; aPi, antibodies to phosphatidylinositol; aPac, antibodies to phosphatidic acid; aPe, antibodies to phosphatidylethanolamine; aPh, antibodies to phosphatidylcholine; MR1, ELISA kits by Euroimmun (Germany); MR2, ELISA kits by Orgentec Diagnostika; MR3, multi-line immunodot assay by Medipan.

зировали встречаемость АФА, учитывая только средние и высокие титры для ИФА тест-систем, а также только положительные и высокоположительные результаты для ЛБ (рис. 2). Частота выявления средних и высоких титров АФА, измеренных методом ИФА на тест-системах ПР1 и ПР2, составила 12 и 11% соответственно, а методом ЛБ — 16,6%. Ввиду небольшого объема выборки положительных пациентов статистически достоверными являются данные, полученные в результате детекции аКл IgG методом ЛБ по сравнению с ИФА тест-системами ПР2 ($p = 0,03$). Таким образом, новый метод ЛБ позволяет добиться более высокой эффективности детекции при средних и высоких титрах АФА (рис. 1, рис. 2).

Так как одним из преимуществ ЛБ является возможность обнаружения 10 видов АФА, была оценена частота выявления как аβ2GPI, аКл, так и других АФА — аФк, аФх, аФэм, аФг, аФэл, аФс, аАн V и аПр (рис. 3). В общей когорте пациентов чаще всего обнаруживались аβ2GPI, аФс, аКл, аАн V, аФк.

Анализ спектра антифосфолипидных антител может играть значимую роль в клинической практике. Мы оценили встречаемость одной разновидности АФА, а также единовременного выявления двух, трех и более АФА в общей когорте пациентов. У 19% пациентов обнаружен только один представитель семейства АФА: в 4,6% случаях детектировался только аβ2GPI, в 3,7% — аАн V и аФс, в 2,7% — аФк, а также аФг, аФэл. В 13% случаев единовременно детектировались два маркера, одним из которых в 6,4% случаев были аβ2GPI, в 4,6% — аФк. Три и более АФА детектировались в 8% случаев, наиболее часто — комбинации аβ2GPI, аАн V и аФс. Нами не было обнаружено ассоциаций между спектром антифосфолипидных антител и клинической картиной на примере данной когорты больных.

Обсуждение

Согласно международным критериям АФС, лабораторная диагностика играет решающую роль в постановке диагноза и дальнейшей тактике ведения больных. Однако несовершенство традиционных методов выявления АФА ведет к необходимости повторного обследования пациентов, что затрудняет своевременную постановку диагноза. Действующие критерии рекомендуют учитывать в диагностике АФС только высокие титры АФА, в то время как на практике низкие титры антител встречаются в разы чаще, но их клиническое значение установить обычно не удается.

Для диагностики АФС активно разрабатываются новые методы детекции аутоантел [1, 2, 4, 5, 6], такие как хемилюминесцентный анализ и мультиплексный метод лайн-блоттинга [15]. Данные методы твердофазного анализа характеризуются новыми подходами к сорбции антигена, обеспечивая большую плотность антигена на твердофазном носителе. Особенностью ЛБ является высокое сродство фосфолипидов к PVDF-мембране, что позволяет ориентировать гидрофильные участки молекул, обеспечивая их взаимодействие с белковыми кофакторами [11]. Результатом оптимизации характеристик твердой фазы становится увеличение аналитической чувствительности теста и расширение диапазона измеряемых показателей.

Для определения встречаемости АФА с помощью разных методов мы исследовали 3 группы пациентов с клиническими проявлениями АФС. В первую вошли 44 пациента с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, во вторую — 19 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей, третья состояла из 45 пациентов с двумя и более выкидышами. В качестве группы сравнения использовались сыворотки крови 50 здоровых доноров. Мы провели сравнительный анализ встречаемости аβ2GPI и аКл между методом ЛБ и ИФА тест-системами ПР1 и ПР2, а также встречаемость спектра 10 разновидностей АФА в группах пациентов с клиническими проявлениями АФС, измеренных с помощью ЛБ.

Сходимость ИФА тест-систем ПР1, ПР2 и ПР3 для детекции аβ2GPI составила 75%, для детекции аКл — 84% соответственно. Большинство АФА при использовании ИФА тест-систем и метода ЛБ в нашем исследовании были обнаружены в низком титре. При оценке встречаемости АФА вне зависимости от титра мы не выявили преимуществ метода ЛБ по сравнению с методом ИФА. Но при анализе частоты средних и высоких титров новый метод показал достоверно более высокую чувствительность для детекции маркера АФС — аКл. Это позволяет избавиться от значительного числа низкоположительных неспецифических реакций АФА, которые могут быть обусловлены транзиторными непатогенными антителами. Значимость выявления АФА в средних и высоких титрах, их выраженная связь с клиническими проявлениями была описана рядом авторов и включена в международные критерии АФС [15, 16].

Важность оценки спектра АФА для определения риска клинических проявлений подчеркивается исследованиями Pengo и соавт. (2005). При

проспективном анализе когорты больных АФС было установлено, что одновременное выявление нескольких разновидностей АФА позволяет установить риск развития тромбоэмболических событий и патологии беременности [22, 23]. Пациенты, у которых одновременно детектируются аКл и аβ2GP1 и ВАК в среднем или высоком титре, состоят в группе наиболее высокого риска развития клинических проявлений АФС. Основываясь на этом наблюдении, для диагностики АФС и стратификации риска развития осложнений Otomo и соавт. [21] разработали диагностический комплекс, включающий 5 коагуляционных тестов для детекции ВАК и 6 ИФА тестов (аКл класса IgG/IgM, аβ2GP1 класса IgG/IgM, фосфатидилсерин-зависимые аПр класса IgG/IgM) [21]. Позже была создана шкала для стратификации риска АФС GAPSS [26], включающая, помимо лабораторных маркеров, демографические и клинические показатели. В связи с этим важным преимуществом метода ЛБ является единовременная детекция аКл,

аβ2GP1, аФх, аФэм, аФг, аФэл, аФс, аФк, аАн V и аПр классов IgG и IgM. Мы оценили встречаемость одного, двух, трех и более АФА в общей когорте пациентов, обследованных с помощью метода ЛБ. В нашем исследовании у 19% пациентов обнаружен только один маркер АФС, два и более маркера – в 21% случаев. Таким образом, можно выделить значительное количество случаев, при котором АФС подтверждается несколькими серологическими биомаркерами. В проведенной работе нам не удалось выявить взаимосвязи между клинической картиной и встречаемостью одного, двух, трех и более АФА у обследованных нами пациентов, что может быть обусловлено небольшим размером группы и коротким временем наблюдения.

Таким образом, метод мультиплексного лайн-блоттинга показывает более высокую чувствительность при детекции средних и высоких титров АФА, а также позволяет выявить пациентов с множественной серологической позитивностью.

Список литературы / References

1. Лапин С.В., Мазинг А.В., Булгакова Т.В., Маслянский А.Л., Иливанова Е.П., Козаренко А.А., Тотолян А.А. Аналитические и диагностические характеристики отечественной тест-системы для выявления антител к циклическому цитруллиновому пептиду // Клиническая лабораторная диагностика, 2011. № 12. С. 12-17. [Lapin S.V., Mazing A.V., Bulgakova T.V., Maslyansky A.L., Ilivanova E.P., Kozarenko A.A., Totolian A.A. Analytical and diagnostic characteristics of the domestic test system for detection of antibodies to cyclic citrulline peptide. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2011, no. 12, pp. 12-17. (In Russ.)]
2. Лапин С.В., Тотолян А.А. Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. СПб.: Человек, 2006. 128 с. [Lapin S.V., Totolian A.A. Immunological laboratory diagnostics of autoimmune diseases]. St. Petersburg: Chelovek, 2006. 128 p.
3. Лапин С.В., Тотолян А.А. Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. СПб.: Человек, 2010. 272 с. [Lapin S.V., Totolian A.A. Immunological laboratory diagnostics of autoimmune diseases]. St. Petersburg: Chelovek, 2006. 272 p.
4. Созина А.В., Иливанова Е.П., Шульман А.М., Шульман М.А., Шемеровская Т.Г., Лапин С.В., Тотолян А.А. Клинико-диагностическое значение выявления антинуклеарного фактора, антител к двуспиральной ДНК и кардиолипину у больных системной красной волчанкой // Клиническая лабораторная диагностика, 2008. № 5. С. 44-47. [Sozina A.V., Ilivanova E.P., Shulman A.M., Shulman M.A., Shemerovskaya T.G., Lapin S.V., Totolian A.A. Clinical and diagnostic significance of detection of the antinuclear factor, antibodies to double-stranded DNA and cardiolipin in patients with systemic lupus erythematosus. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2008, no. 5, pp. 44-47. (In Russ.)]
5. Созина А.В., Неустроева Ю.А., Тихомирова Т.А., Лапин С.В. Сочетанная встречаемость аутоантител у больных с диффузными болезнями соединительной ткани // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 1. С. 69-76. [Sozina A.V., Neustroeva Yu.A., Tikhomirova T.A., Lapin S.V. Combined prevalence of autoantibodies in patients with diffuse connective tissue diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 1, pp. 69-76. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2007-1-69-76.
6. Роггенбук Д., Ширак П., Сак У., Лапин С.В., Мазинг А.В., Тотолян Арег А. Новые подходы к стандартизации выявления аутоантител в лабораторной диагностике аутоиммунных ревматических заболеваний // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 3. С. 221-226. [Roggenbuck D., Schierac P., Sack U., Lapin S.V., Mazing A.V., Totolian A.A. Novel methods for autoantibody detection in laboratory diagnostics of autoimmune

rheumatic diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 3, pp. 221-226. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-3-221-226.

7. Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Лазарева Н.М., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А., Сельков С.А., Чепанов С.В., Тотолян А.А. Сравнительный анализ иммунологических методов детекции антифосфолипидных антител // Клиническая лабораторная диагностика, 2017. Т. 62, № 1. С. 40-44. [Tkachenko O.Yu., Lapin S.V., Mazing A.V., Lazareva N.M., Shmonin A.A., Solovyova L.N., Bondareva E.A., Selkov S.A., Chepanov S.V., Totolian A.A. The comparative analysis of immunologic techniques of detection of antiphospholipid Antibodies. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, Vol. 62, no. 1, pp. 40-44. (In Russ.)]

8. Ambrosino P, Lupoli R, Spadarella G, Tarantino P, di Minno A, Tarantino L, di Minno M.N. Autoimmune liver diseases and antiphospholipid antibodies positivity: A meta-analysis of literature studies. *J. Gastrointest. Liver Dis.*, 2015, Vol. 24, no. 1, pp. 25-34.

9. Dalekos G.N., Zachou K., Liaskos C. The antiphospholipid syndrome and infection. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2001, Vol. 3, no. 4, pp. 277-285.

10. Devreese K.M., Pierangeli S.S., de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel T.L.; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid/Dependent Antibodies. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the IS TH. *J. Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 12, no. 5, pp. 792-795.

11. Egerer K, Roggenbuck D, Büttner T, Lehmann B, Kohn A., von Landenberg P, Hiemann R, Feist E., Burmester G.R., Dörner T. Single-step autoantibody profiling in antiphospholipid syndrome using a multi-line dot assay. *Arthritis Res. Ther.*, 2011, Vol. 13, no. 4, R118. doi: 10.1186/ar3421.

12. Galli M., Comfurius P, Maassen C., Hemker H.C., de Baets M.H., van Breda-Vriesman P.J., Barbui T, Zwaal R.F., Bevers E.M. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*, 1990, Vol. 335, no. 8705, pp. 1544-1547.

13. Harris E.N., Gharavi A.E., Boey M.L., Patel B.M., Mackworth-Young C.G., Loizou S., Hughes G.R. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 1983, Vol. 322, no. 8361, pp. 1211-1214.

14. Jeleniewicz R., Majdan M., Targońska-Śtepiak B., Dryglewska M. Prevalence of antiphospholipid antibodies in rheumatoid arthritis patients and relationship with disease activity. *Pol. Arch. Med. Wewnętrznej*, 2012, Vol. 122, no. 10, pp. 480-486.

15. Krilis S.A., Giannakopoulos B. Laboratory methods to detect antiphospholipid antibodies. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2014, Vol. 2014, no. 1, pp. 321-328.

16. Meroni P, Chighizola C., Rovelli F, Gerosa M. Antiphospholipid syndrome in 2014: more clinical manifestations, novel pathogenic players and emerging biomarkers. *Arthritis Res. Ther.*, 2014, Vol. 16, no. 2, p. 209.

17. Meroni P.L., Borghi M.O., Raschi E., Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2011, Vol. 7, no. 6, pp. 330-339.

18. Misasi R., Capozzi A., Longo A., Recalchi S., Lococo E., Alessandri C., Conti F., Valesini G., Sorice M. New antigenic targets and methodological approaches for refining laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome. *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, 858542. doi:10.1155/2015/858542.

19. Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T, Branch D.W., Brey R.L., Cervera R., Derksen R.H., de Groot P.G., Koike T., Meroni P.L., Reber G., Shoenfeld Y., Tincani A., Vlachoyiannopoulos P.G., Krilis S.A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Thromb. Haemost.*, 2006, Vol. 4, no. 2, pp. 295-306.

20. Neville C., Rauch J., Kassis J., Chang E.R., Joseph L., le Comte M., Fortin P.R. Thromboembolic risk in patients with high titre anticardiolipin and multiple antiphospholipid antibodies. *Thromb. Haemost.*, 2003, Vol. 90, no. 1, pp. 108-115.

21. Otomo K., Atsumi T., Amengual O., Fujieda Y., Kato M., Oku K., Horita T., Yasuda S., Koike T. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum.*, 2012, Vol. 64, no. 2, pp. 504-512.

22. Pengo V., Biasiolo A., Pegoraro C., Cucchini U., Noventa F., Iliceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb. Haemost.*, 2005, Vol. 93, no. 6, pp. 1147-1152.

23. Pengo V., Ruffatti A., Legnani C., Testa S., Fierro T., Marongiu F., de Micheli V., Gesele P., Tonello M., Ghirarduzzi A., Bison E., Denas G., Banzato A., Padayattil Jose S., Iliceto S. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 17, pp. 4714-4718.

24. Petri M., Orbai A.M., Alarcón G.S., Gordon C., Merrill J.T., Fortin P.R., Bruce I.N., Isenberg D., Wallace D.J., Nived O., Sturfelt G., Ramsey-Goldman R., Bae S.C., Hanly J.G., Sánchez-Guerrero J., Clarke A., Aranow C., Manzi S., Urowitz M., Gladman D., Kalunian K., Costner M., Werth V.P., Zoma A., Bernatsky S., Ruiz-Irastorza G.,

Khamashta M.A., Jacobsen S., Buyon J.P., Maddison P., Dooley M.A., van Vollenhoven R.F., Ginzler E., Stoll T., Peschken C., Jorizzo J.L., Callen J.P., Lim S.S., Fessler B.J., Inanc M., Kamen D.L., Rahman A., Steinsson K., Franks A.G. Jr, Sigler L., Hameed S., Fang H., Pham N., Brey R., Weisman M.H., McGwin G. Jr, Magder L.S. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 2012, Vol. 64, no. 8, pp. 2677-2686.

25. Ruiz-Irastorza G., Crowther M., Branch W., Khamashta M.A. Antiphospholipid syndrome. *Lancet*, 2010, Vol. 376, no. 9751, pp. 1498-1509.

26. Sciascia S., Sanna G., Murru V., Roccatello D., Khamashta M.A., Bertolaccini M.L. The global antiphospholipid syndrome score in primary APS. *Rheumatol. (United Kingdom)*, 2014, Vol. 54, no. 1, pp. 134-138.

27. Touré A.O., Ly F., Sall A., Diatta A., Gadji M., Seck M., Faye B., Dieye T., Diop S. Antiphospholipid antibodies and systemic scleroderma. *Turkish J. Haematol.*, 2013, Vol. 30, no. 1, pp. 32-36.

28. Zhou Y., Ying Z., Li R., Zhu J., Li Z. Clinical and immunological relevance of antiphospholipid antibodies in patients with lymphoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2011, Vol. 91, no. 37, pp. 2607-2610.

Авторы:

Ткаченко О.Ю. — врач клинической лабораторной диагностики, лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний, НМЦ по молекулярной медицине Министерства здравоохранения РФ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лапин С.В. — к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине Министерства здравоохранения РФ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Шмонин А.А. — врач-невролог СПб ГБУЗ «Городская больница № 26»; доцент кафедры физических методов лечения и спортивной медицины ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник института экспериментальной медицины ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова

Соловьева Л.Н. — врач-невролог СПб ГБУЗ «Городская больница № 26», Санкт-Петербург, Россия

Бондарева Е.А. — аспирант кафедры неврологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Tkachenko O. Yu., Clinical Laboratory Diagnostician, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lapin S.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Shmonin A.A., Neurologist, City Hospital No. 26 of St. Petersburg; Associate Professor, Department of Physical Methods of Treatment and Sports Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, V. Almazov North-West Federal Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

Solovyova L.N., Neurologist, City Hospital No. 26 of St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation

Bondareva E.A., Postgraduate student, Neurology Department, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Чепанов С.В. — врач клинической лабораторной диагностики, лаборатория клинической иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Роггенбук Дирк — д.м.н., профессор, Бранденбургский технический университет, Коттбус-Зенфтенберг, Зенфтенберг; директор, GA Generic Assays GmbH, Далевиц, Германия

Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honoured Worker of Science of the Russian Federation, Head, Department of Immunology, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Chepanov S.V., Clinical Laboratory Diagnostician, Laboratory of Clinical Immunology, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Roggenbuck Dirk, PhD, MD (Medicine), Professor, Brandenburg University of Technology, Cottbus-Senfthenberg, Senftenberg; director, GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz, Germany

Поступила 30.10.2017

Отправлена на доработку 02.11.2017

Принята к печати 17.01.2018

Received 30.10.2017

Revision received 02.11.2017

Accepted 17.01.2018

МЕТОДИЧЕСКИЕ СЛОЖНОСТИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Арсентьева Н.А.¹, Тотолян Арег А.^{1, 2}

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Цитокины являются важнейшими факторами патогенеза инфекционных, аллергических, аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний и иммунопатологических процессов и служат важнейшими мишенями иммунодиагностики широкого круга заболеваний человека. Для решения диагностических задач обычно проводится определение уровней цитокинов в различных биологических жидкостях с использованием иммунохимических методов.

Проведенный нами анализ отечественной научной литературы иммунологического профиля на примере двух российских журналов «Медицинская иммунология» и «Инфекция и иммунитет» показал, что наибольшее распространение при проведении клинико-иммунологических исследований с определением содержания цитокинов в сыворотке/плазме крови получил твердофазный ИФА и мультиплексный иммуноанализ в формате xMAP- и СВА-технологий.

Значения нормы некоторых цитокинов в плазме/сыворотке крови практически здоровых лиц, полученные с использованием этих технологий и реагентов различных фирм-производителей, варьируются в достаточно широких пределах. Границы нормы, полученные с использованием СВА-технологии, значительно выше границ нормы, полученных методом ИФА и xMAP-технологии. В большинстве исследований присутствовала небольшая контрольная группа, насчитывающая обычно 15–20 человек. В большинстве работ материалом для исследований служила сыворотка крови и лишь в единичных — ЭДТА-плазма крови.

Сделано заключение, что результаты определения цитокинов в сыворотке/плазме периферической крови практически здоровых лиц колеблются в широком диапазоне и зависят от исследуемого материала, применяемой технологии, используемой тест-системы и особенностей анализируемой выборки: число обследованных, их возраст, пол, географический фактор и т.д. Все вышеизложен-

Адрес для переписки:

Арсентьева Наталья Александровна
ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (904) 646-57-58.
E-mail: arsentieva_n.a@bk.ru

Address for correspondence:

Arsentieva Natalya A.
St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone: 7 (904) 646-57-58.
E-mail: arsentieva_n.a@bk.ru

Образец цитирования:

Н.А. Арсентьева, Арег А. Тотолян «Методические сложности при определении содержания некоторых цитокинов в периферической крови практически здоровых лиц» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 763–774.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-763-774

© Арсентьева Н.А., Тотолян Арег А., 2018

For citation:

N.A. Arsentieva, Areg A. Totolian “Methodological issues of determining concentrations of some cytokines in peripheral blood from healthy individuals”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 763–774. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-763-774

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-763-774

ное обосновывает необходимость проведения широкомасштабных мультицентровых клинических исследований по стандартизации оценки содержания цитокинов в периферической крови человека и определения их нормативных значений.

Ключевые слова: цитокины, границы нормы, сыворотка крови, плазма крови, иммунодиагностика, иммуноферментный анализ, мультиплексный анализ

METHODOLOGICAL ISSUES OF DETERMINING CONCENTRATIONS OF SOME CYTOKINES IN PERIPHERAL BLOOD FROM HEALTHY INDIVIDUALS

Arsentieva N.A.^a, Totolian Areg A.^{a, b}

^a St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Cytokines are the most important factors in pathogenesis of infectious, allergic, autoimmune, lymphoproliferative diseases and immunopathological processes. Many cytokines are very useful therapeutic targets for immunodiagnostics of different human diseases. Measurement of the cytokine levels by immunochemical methods in various biological fluids is usually used for diagnostic evaluation.

Content analysis of research articles from two Russian immunological journals, “Meditsinskaya Immunologiya” = “Medical Immunology (Russia)” and “Infektsiya i immunitet” = “Russian Journal of Infection and Immunity”, shows that ELISA, xMAP multiplex immunoassay, and CBA technologies are the most common methods used in clinical and immunological studies aimed for determination of cytokine contents in blood serum/plasma.

Normal ranges of some plasma/serum cytokines in healthy individuals were subject to wide variations when using different methods and specific reagents from various manufacturers. The normal ranges applied by the CBA-technology, are significantly higher than appropriate values obtained by ELISA or xMAP-technologies. Most studies included a small control group, usually limited by 15-20 persons. In most of these works, blood serum samples were used for assays, whereas EDTA-conserved plasma was taken only in few studies.

It has been concluded that the results of cytokine measurements in blood serum/plasma in healthy individuals vary in wide ranges, and depend on many factors, e.g., initial sampling material, mode of technology, type of test systems, and characteristics of the group under study: number of patients, age, gender, geographical factor, etc. The mentioned data demonstrate a need for large-scale multicenter clinical studies, in order to standardize measurements of the cytokine levels in human peripheral blood and to specify their normal values.

Keywords: cytokines, normal range, blood serum, blood plasma, immunodiagnostics, ELISA, multiplex assay

Цитокины являются важнейшими факторами патогенеза инфекционных, аллергических, аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний и иммунопатологических процессов. Определение содержания цитокинов в биологических жидкостях можно использовать не только для изучения иммунопатогенеза заболеваний и адекватного назначения иммунотерапии, но также и для иммунодиагностики. С этих позиций цитокины служат важнейшими мишенями иммунодиагностики широкого круга заболеваний человека [8].

Для решения диагностических задач обычно проводится определение уровней цитокинов

в различных биологических жидкостях с использованием иммунохимических методов: иммуноферментный анализ в различных модификациях (ИФА), радиоиммунный анализ, мультиплексный анализ (МИА), позволяющий с помощью моноклональных антител одновременно определять до 500 белков с использованием флуоресцентных и других меток.

Наибольшее распространение получили иммуноферментные диагностические тест-системы, позволяющие проводить количественный анализ содержания цитокинов в любых биологических жидкостях и обладающие достаточно высокой чувствительностью. В последние годы

широкое распространение получил метод мультиплексного анализа, включающий различные форматы определения цитокинов в биологических жидкостях с применением проточной цитофлуориметрии: СВА (Cytometric Bead Array) и xMAP (Multi-Analyte Profiling). В основе этих видов анализа лежит связывание с моноклональными антителами, фиксированными на поверхности микрочастиц или микрошариков.

Проведенный нами анализ отечественной научной литературы иммунологического профиля на примере двух российских журналов «Медицинская иммунология» и «Инфекция и иммунитет» показал, что наибольшее распространение при проведении клинико-иммунологических исследований с определением содержания цитокинов в сыворотке/плазме крови получил твердофазный ИФА [4, 6, 7, 13, 14, 15, 16, 17, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32] и мультиплексный иммуноанализ в формате xMAP- [2, 9, 19, 20, 21, 22, 30] и СВА-технологий [3, 18].

Значения нормы некоторых цитокинов в плазме/сыворотке крови взрослых практически здоровых лиц, полученные с использованием различных технологий и фирм-производителей, представлены в таблице 1. Как следует из представленных данных, содержание одного и того же цитокина в периферической крови практически здоровых лиц колеблется в достаточно

широких пределах. Различия значений нормы обусловлены в первую очередь технологией, применяемой для определения уровня цитокинов. Так, значения, полученные с использованием СВА-технологии, резко отличаются от значений, полученных методом ИФА и xMAP-технологии. Стоит отметить, что материалом исследования для большинства случаев исследований служила сыворотка крови, в то время как при применении xMAP-технологии авторы использовали и сыворотку, и ЭДТА-плазму крови.

Наиболее часто в работах клинико-иммунологического профиля встречается исследование уровня двух цитокинов: $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$ (рис. 1). Как видно из представленной диаграммы, в большинстве проанализированных исследований оба цитокина у практически здоровых лиц определялись в значимом количестве. Ранее считалось, что многие провоспалительные цитокины в норме не должны циркулировать в крови [8]. По-видимому, присутствие невысоких уровней этих цитокинов в плазме крови здоровых доноров можно объяснить четырьмя основными причинами:

1. Повышение чувствительности используемых в клинико-иммунологических исследованиях лабораторных методов. Чувствительность xMAP- и СВА-технологий существенно выше чувствительности ИФА.

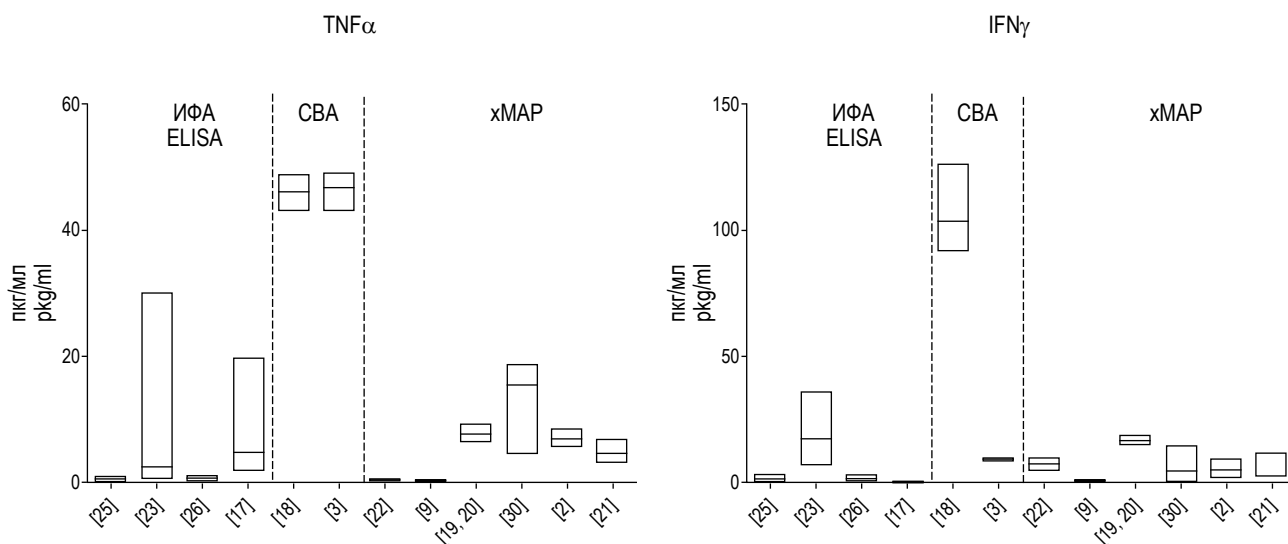


Рисунок 1. Значения нормы $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$ в периферической крови практически здорового человека, полученные при использовании различных технологий и производителей тест-систем

Примечание. На диаграммах представлены медианы и интерквартильный размах: Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$). По оси ординат даны ссылки на источник литературы.

Figure 1. Normal values of $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IFN}\gamma$ in the peripheral blood of healthy adults, obtained using various technologies and manufacturers of test systems

Note. Diagrams show medians and interquartile range: Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$). The y-axis gives references.

ТАБЛИЦА 1. ГРАНИЦЫ НОРМЫ ДЛЯ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ/ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И РАЗЛИЧНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ТЕСТ-СИСТЕМ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), пкг/мл

TABLE 1. THE NORMAL RANGES FOR SOME CYTOKINES IN THE SERUM/PLASMA OF HEALTHY INDIVIDUALS PERIPHERAL BLOOD, OBTAINED USING DIFFERENT TECHNOLOGIES AND DIFFERENT MANUFACTURERS OF TEST SYSTEMS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), pkg/ml

Технология Technology	Производитель тест-системы Test system manufacturer	Содержание цитокинов Cytokines level								Лит. источник References
		TNF α	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IFN- γ	
ИФА ELISA	«Вектор-Бест» (Новосибирск) "Vektor-Best" (Novosibirsk)	5,0 (2-20)	н.д. n.d.	0,1 (0,1-0,1)	5,0 (0,1-8,0)	2,0 (0,1-8,0)	н.д. n.d.	1,8 (0,1-2,4)	0,1 (0,1-0,1)	[17]
		2,75 (0,75-30,36)	1,0 (0,01-4,5)	н.д. n.d.	0,01 (0,01-1,05)	4,0 (1,66-11,42)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	17,93 (7,02-36,56)	[23]
		0,54 (0,38-0,87)	н.д. n.d.	1,1 (0,5-3,05)	7,0 (5,6-7,8)	н.д. n.d.	2,1 (0,5-4,0)	н.д. n.d.	0,6 (0,22-4,0)	[25]
		0,54 (0,38-0,88)	н.д. n.d.	1,1 (0,5-3,05)	2,15 (0,6-4,8)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	14,8 (8,65-26,85)	0,6 (0,22-4,0)	[26]
		6,63 (2,58-11,9)*	н.д. n.d.	5,2 (2,4-7,2)*	2,45 (0,84-4,90)*	н.д. n.d.	н.д. n.d.	15,89 (6,74-27,8)*	н.д.	[27]
	«Цитокин» (Санкт-Петербург) "Cytokine" (St. Petersburg)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	0,95 (0,63-1,30)	6,75 (3,21-11,65)	н.д. n.d.	9,09 (3,3-12,88)	4,07 (2,78-5,90)	[28]
		1,2 (0,9-1,4)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	2,55 (2,1-3,3)	н.д. n.d.	8,9 (7,4-10,2)	н.д. n.d.	[6]
		н.д. n.d.	2,2 (2,1-4,3)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	2,4 (2,1-4,1)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	
	Monobind (США) Monobind (USA)	2,2 (1,4-3,7)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	3,41 (2,94-4,30)	2,98 (1,75-4,31)	н.д. n.d.	[4, 32]
	Invitrogen Biosource (США) Invitrogen Biosource (USA)	46,3 (43,2-48,9)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	77,9 (66,2-81,0)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	32,4 (31,1-33,7)	103,5 (91,6-125,7)	[18]

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Технология Technology	Производитель тест-системы Test system manufacturer	Содержание цитокинов Cytokines level								Лит. источник References
		TNF α	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IFN γ	
CBA	BD Biosciences (США) BD Biosciences (USA)	47,1 (43,1-49,3)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	76,6 (68,5-81,9)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	33,1 (29,6-36,6)	9,8 (9,2-10,3)	[3]
		0,45 (0,36-0,47)	н.д. n.d.	2,56 (2,30-2,89)	н.д. n.d.	1,1 (1,09-2,11)	5,27 (4,78-5,56)	0,29 (0,24-0,36)	8,11 (5,63-10,12)	[22]
		0,09 (0-0,3)	н.д. n.d.	0 (0-0)	0,04 (0-0,28)	0 (0-0)	1,0 (0,15-1,35)	0,01 (0-0,21)	0 (0-0)	[9]**
xMAP	Bio-Plex 100; тест-системы Bio-Rad (США) Bio-Plex 100; Test system Bio- Rad (USA)	7,8 (6,5-9,5)	0,02 (0-0,2)	2,3 (1,7-2,9)	0,9 (0,7-1,4)	1,8 (1,5-2,8)	0,7 (0,5-1,4)	н.д. n.d.	16,6 (15,3-19,2)	[19, 20]
		15,67 (4,78-18,95)	0,08 (0-0,21)	0,86 (0-2,67)	0,87 (0-1,35)	2,21 (1,56-2,68)	0,52 (0-1,19)	0,54 (0-1,32)	4,49 (0,90-14,22)	[30]**
		6,76 (5,98-8,48)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	4,9 (2,51-9,52)	[2]**
	MAGPIX; тест-системы Bio-Rad (США) MAGPIX; Test system Bio- Rad (USA)	4,63 (3,2-7,2)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	3,2 (3,2-3,2)	3,2 (3,2-3,2)	3,2 (3,2-3,2)	3,2 (3,2-3,2)	3,2 (3,2-11,8)	[21]**
	MAGPIX; тест-системы Luminex (США) MAGPIX; Test system Luminex (USA)									

Примечание. н.д. – нет данных; * – значения получены для группы практически здоровых детей; ** – материалом исследования служила ЭДТА-плазма крови, в остальных случаях – сыворотка крови.

Note. n.d., no data; *, data for healthy children; **, EDTA-conserved plasma was used as the study material; in other cases, blood serum.

ТАБЛИЦА 2. ЗНАЧЕНИЯ НОРМЫ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ВЗРОСЛЫХ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ИФА (M±m), пкг/мл
TABLE 2. NORMAL VALUES OF SOME CYTOKINES IN THE SERUM OF HEALTHY ADULTS PERIPHERAL BLOOD, OBTAINED BY ELISA (M±m), pg/ml

Производитель тест-системы Test system manufacturer	Содержание цитокинов Cytokines level									Лит. источник References
	TNFα	IL-1β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IFNα	IFNγ	
«Вектор-Бест» (Новосибирск) "Vektor-Best" (Novosibirsk)	0,18±0,04	3,6±0,6	н.д. n.d.	1,7±0,23	10,3±1,23	н.д. n.d.	3,8±0,29	н.д. n.d.	6,3±0,8	[29]
«Цитокин» (Санкт-Петербург) "Cytokine" (St. Petersburg)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	11,7±1,37	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	
«Вектор-Бест» (Новосибирск) "Vektor-Best" (Novosibirsk)	0,9±0,2	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	0,5±0,1	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	1,8±0,3	[14]
«Вектор-Бест» (Новосибирск) "Vektor-Best" (Novosibirsk)	0±0	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	2,5±0,1	4,5±1,4	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	[13]
«Вектор-Бест» (Новосибирск) "Vektor-Best" (Novosibirsk)	0±0	н.д. n.d.	0±0	н.д. n.d.	1,0±0,3	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	0±0	[15]
«Вектор-Бест» (Новосибирск) "Vektor-Best" (Novosibirsk)	1,9±0,11	н.д. n.d.	н.д. n.d.	0,22±0,05	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	11,6±3,01	[7]
«ПроКон» (Санкт-Петербург) "ProCon" (St. Petersburg)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	18,5±1,9	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	
«Цитокин» (Санкт-Петербург) "Cytokine" (St. Petersburg)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	9,21±1,62	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	
Сутиммуне (Финляндия) Cytimmune (Finland)	н.д. n.d.	3,7±0,93	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Производитель тест-системы Test system manufacturer	Содержание цитокинов Cytokines level									Лит. источник References
	TNF α	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IFN α	IFN γ	
«Вектор-Бест» (Новосибирск) "Vektor-Best" (Novosibirsk)	1,6±0,05	6,5±0,08	н.д. n.d.	3,7±0,09	6,3±0,14	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	13,3±0,27	[31]
Biosource (CША) Biosource (USA)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	79,7±1,41	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	
«Вектор-Бест» (Новосибирск) "Vektor-Best" (Novosibirsk)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	3,35±0,6	[16]
Bender MedSystems GmbH (Австрия) Bender MedSystems GmbH (Austria)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	4,33±0,8	н.д. n.d.	н.д. n.d.	н.д. n.d.	

Примечание. н.д. – нет данных.
Note. n.d., no data.

ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИИ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ИФА (M $\pm$ m), пкг/мл

TABLE 3. NORMAL VALUES OF SOME CYTOKINES IN THE SERUM OF HEALTHY CHILDREN PERIPHERAL BLOOD, OBTAINED BY ELISA (M $\pm$ m), pkg/ml

Возраст Age	Содержание цитокинов Cytokines level								Лит. источник References
	TNF α	IL-1 β	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IFN α	IFN γ	
1-9 лет 1-9 years	26,4 $\pm$ 4,8	51 $\pm$ 8,3	49,8 $\pm$ 13,7	н.д. n.d.	48,6 $\pm$ 10,6	4,8 $\pm$ 2,8	н.д. n.d.	26 $\pm$ 7,7	[10]
1-7 лет 1-7 years	н.д. n.d.	136 $\pm$ 26	8,7 $\pm$ 3,1	48 $\pm$ 10	49 $\pm$ 11	7,6 $\pm$ 1,4	9,9 $\pm$ 7,1	92 $\pm$ 24	[11]
9-17 лет 9-17 years	н.д. n.d.	27 $\pm$ 7	51 $\pm$ 7	48 $\pm$ 10	49 $\pm$ 11	4,8 $\pm$ 2,8	10 $\pm$ 7	26 $\pm$ 8	[1, 12]

Примечание. н.д. – нет данных.
Note. n.d., no data.

2. Соблюдение требований к правильному взятию периферической крови на преаналитическом этапе, поскольку провоспалительные цитокины могут достаточно быстро появляться в кровотоке в ответ на физическую нагрузку, стресс и т.д.

3. Тщательный отбор практически здоровых лиц, поскольку умеренно повышенный уровень некоторых провоспалительных цитокинов может наблюдаться при вялотекущих скрытых воспалительных процессах, а также на ранних (до появления клинических проявлений) стадиях аутоиммунных и аллергических заболеваний.

4. Несовершенство методов иммунохимического анализа, при котором ложноположительные результаты могут быть связаны с присутствием в биологическом материале гетерофильных антител, которые вырабатываются против неизвестных, недостаточно полно охарактеризованных антигенов и обычно обладают низкой avidностью. Такие низкоавидные антитела могут взаимодействовать с различными иммуноглобулинами и присутствуют у 40% здоровых лиц. Поскольку гетерофильные антитела могут связываться с компонентами иммуноаналитических систем (ИФА и МИА), перекрестное связывание может приводить к ложноположительным результатам, реже – к ингибции связывания [8].

Среди данных, полученных с помощью одной и той же технологии, также наблюдаются вариации значений. Так, в таблице 2 представлены результаты измерений некоторых цитокинов в сыворотке крови практически здоровых взрослых доноров с использованием метода ИФА. Наличие таких различий, прежде всего, обусловлено реагентами, которые отличаются у разных фирм-производителей, а также особенностями выборки условно здоровых доноров: число обследованных, их возраст, пол, географический фактор и т.д.

В научной литературе представлены немногочисленные работы с определением норм цитокинов в сыворотке крови детей. Сложность

представляет формирование группы условно здоровых детей, достаточной для статистического анализа. Противоречивые данные получены при анализе уровней цитокинов в сыворотке крови условно здоровых детей с использованием ИФА тест-систем одной и той же фирмы-производителя (табл. 3). Наблюдается сильная вариабельность значений IL-1 β , IL-4, IFN γ , в то время как уровни IL-8 и IL-10 в разных возрастных группах сопоставимы друг с другом.

В связи с вышеизложенным не допускается использовать значения нормы, позаимствованные из литературных источников либо из инструкции фирмы-производителя, как это, например, встречается в некоторых публикациях [5]. Для каждого исследования необходимо формировать свою контрольную группу для определения нормальных значений, сопоставимую по численности, полу, возрасту, условиям проживания, географическому расположению с целевой группой.

Таким образом, далеко не полный анализ отечественной литературы показывает, что при проведении клинико-иммунологических исследований существенное внимание отводится определению различных цитокинов в сыворотке/плазме периферической крови. При этом в большинстве исследований присутствует небольшая контрольная группа, насчитывающая обычно 15-20 человек. Результаты определения цитокинов в сыворотке/плазме периферической крови практически здоровых лиц колеблются в широком диапазоне и зависят от исследуемого материала, применяемой технологии, используемой тест-системы и особенностей анализируемой выборки. Все вышеизложенное обосновывает необходимость проведения широкомасштабных мультицентровых клинических исследований по стандартизации оценки содержания цитокинов в периферической крови человека и определения их нормативных значений.

Список литературы / References

1. Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Жирков А.А., Скрипченко Н.В., Вильниц А.А., Монахова Н.Е., Бессонова Т.В. Субпопуляции лимфоцитов и цитокины в крови и цереброспинальной жидкости при вирусных и бактериальных менингитах у детей // Инфекция и иммунитет, 2016. Т. 6, № 1. С. 33-44. [Aleksееva L.A., Zheleznikova G.F., Zhirkov A.A., Skripchenko N.V., Vilnits A.A., Monakhova N.E., Bessonova T.V. Lymphocyte subsets and cytokines in blood and cerebrospinal fluid in children with viral and bacterial meningitis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, Vol. 6, no. 1, pp. 33-44. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2016-1-33-44.

2. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Любимова Н.Е., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Козлов К.В., Жданов К.В., Тотолян А.А. Содержание цитокинов и хемокинов в плазме крови больных хроническим вирусным гепатитом С // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 1. С. 83-92. [Arsentieva N.A., Semenov A.V., Lyubimov N.E., Basina V.V., Esaulenko E.V., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Totolian A.A. Contents cytokines and chemokines in blood plasma of patients with chronic viral hepatitis C. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 1, pp. 83-92. (In Russ.)]
3. Барабаш Е.Ю., Калинина Е.П., Гвозденко Т.А., Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Антонюк М.В., Ходосова К.К. Регуляция иммунного ответа у пациентов с частично контролируемой и контролируемой бронхиальной астмой // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 65-72. [Barabash E.Yu., Kalinina E.P., Gvozdenko T.A., Denisenko Yu.K., Novgorodtseva T.P., Antonyuk M.V., Khodosova K.K. Regulation of immune response of patients with partially controlled vs controlled bronchial asthma. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 65-72. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-65-72.
4. Бернс С.А., Киприна Е.С., Шмидт Е.А., Веремеев А.В., Барбараш О.Л. Динамика изменений уровней цитокинов на госпитальном этапе у больных с различными клиническими вариантами острого коронарного синдрома // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 33-40. [Berns S.A., Kiprina E.S., Shmidt E.A., Veremeev A.V., Barbarash O.L. Dynamics of cytokine levels in the hospitalized patients with different clinical types of acute coronary syndrome. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 1, pp. 33-40. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-33-40.
5. Волощук Л.В., Головачева Е.Г., Мушкатина А.Л., Осидак Л.В., Заришнюк П.В., Го А.А. Взаимосвязь цитокинового статуса и выраженности интоксикационного синдрома при гриппе // Инфекция и иммунитет, 2013. Т. 3, № 3. С. 263-268. [Voloshchuk L.V., Golovacheva E.G., Mushkatina A.L., Osidak L.V., Zarishnyuk P.V., Go A.A. The interdependence of the cytokine status and the severity of intoxication syndrome in influenza. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, Vol. 3, no. 3, pp. 263-268. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2013-3-263-268.
6. Груздева О.В., Акбашева О.Е., Матвеева В.Г., Дылева Ю.А., Паличева Е.И., Каретникова В.Н., Бородкина Д.А., Коков А.Н., Федорова Т.С., Барбараш О.Л. Цитокиновый профиль при висцеральном ожирении и неблагоприятный кардиоваскулярный прогноз инфаркта миокарда // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 3. С. 211-220. [Gruzdeva O.V., Akbasheva O.E., Matveeva V.G., Dyleva Yu.A., Palicheva E.I., Karetnikova V.N., Borodkina D.A., Kokov A.N., Fedorova T.S., Barbarash O.L. Cytokine profile in visceral obesity and adverse cardiovascular prognosis of myocardial infarction. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 211-220. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-3-211-220.
7. Давыдова Е.В., Зурочка А.В. Клинико-иммунологическая эффективность производного адамантана в терапии астенических расстройств при ранних формах хронической ишемии мозга // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 441-452. [Davydova E.V., Zurochka A.V. Clinical and immunological efficiency of adamantane derivative in therapy of asthenic disorders in early forms of chronic brain ischemia. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 441-452. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-441-452.
8. Долгов В.В., Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная диагностика: Национальное руководство в 2 т. Т. II. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 814 с. [Dolgov V.V., Menshikov V.V. Clinical laboratory diagnostics: National leadership in 2 Vol. Vol. II]. Moscow: GEOTAR-Media, 2013. 814 p.
9. Домашенко О.М., Белобородов П.В., Сысоев К.А., Шавловский М.М., Тотолян Арег А., Поляков Д.С. Содержание цитокинов в плазме крови больных, находящихся на хроническом гемодиализе // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 2-3. С. 211-218. [Polyakov D.S., Domashenko O.M., Beloborodov P.V., Syssoev K.A., Shavlovsky M.M., Totolian A.A. Plasma cytokines levels in patients undergoing long-term haemodialysis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, Vol. 13, no. 2-3, pp. 211-218. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2011-2-3-211-218.
10. Железникова Г.Ф., Бехтерева М.К., Волохова О.А., Монахова Н.Е. Клиническое значение сывороточных уровней цитокинов и общего иммуноглобулина Е при сальмонеллезе у детей разного возраста // Инфекция и иммунитет, 2013. Т. 3, № 3. С. 279-284. [Zheleznikova G.F., Bekhtereva M.K., Volokhova O.A., Monakhova N.E. Clinical significance of serum levels of cytokines and total IgE in children of different age with salmonellosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, Vol. 3, pp. 279-284. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2013-3-279-284.
11. Железникова Г.Ф., Лобзин Ю.В., Скрипченко Н.В., Иванова Г.П., Скрипченко Е.Ю., Монахова Н.Е. Клиническое значение сывороточных уровней цитокинов при ветряной оспе у детей // Инфекция и иммунитет, 2015. Т. 5, № 1. С. 79-84. [Zheleznikova G.F., Lobzin Yu.V., Skripchenko N.V., Ivanova G.P., Skripchenko E.Yu., Monakhova N.E. Clinical significance of cytokines serum levels in children with

chicken pox. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, Vol. 5, no. 1, pp. 79-84. (In Russ.)) doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-79-84.

12. Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В., Иванова Г.П., Суровцева А.В., Монахова Н.Е. Цитокины и герпесвирусы при рассеянном склерозе у детей // *Инфекция и иммунитет*, 2015. Т. 5, № 4. С. 349-358. [Zheleznikova G.F., Skripchenko N.V., Ivanova G.P., Surovtseva A.V., Monakhova N.E. Cytokines and herpesviruses in children with multiple sclerosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, Vol. 5, no. 4, pp. 349-358. (In Russ.)) doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-349-358.

13. Зорина В.Н., Исакова О.В., Зорина Р.М., Баженова Л.Г., Зорин Н.А. Концентрации иммунорегуляторных белков и некоторых цитокинов в крови женщин при приеме менопаузальной терапии // *Медицинская иммунология*, 2016. Т. 18, № 2. С. 177-182. [Zorina V.N., Isakova O.V., Zorina R.M., Bazhenova L.G., Zorin N.A. Concentrations of immunoregulatory proteins and some cytokines in blood of women during menopausal therapy. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 177-182. (In Russ.)) doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-177-182.

14. Зорина В.Н., Маклакова Т.П., Шепель Т.Т., Бойко О.Н., Зорина Р.М., Зорин Н.А. Концентрации тиреоидных гормонов, цитокинов и альфа-2-макроглобулина в сыворотке крови и супернатантах культур клеток крови при диффузном токсическом зобе // *Медицинская иммунология*, 2015. Т. 17, № 1. С. 53-58. [Zorina V.N., Maklakova T.P., Sheppel T.T., Boyko O.N., Zorina R.M., Zorin N.A. Contents of thyroid hormones, cytokines and α 2-macroglobulin in blood sera and in culture supernates of blood cells from the graves disease patients. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 53-58. (In Russ.)) doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-53-58.

15. Зорина В.Н., Промзелева Н.В., Зорин Н.А., Рябичева Т.Г., Зорина Р.М. Продукция провоспалительных цитокинов и альфа-2-макроглобулина клетками периферической крови больных колоректальным раком // *Медицинская иммунология*, 2016. Т. 18, № 5. С. 483-488. [Zorina V.N., Promzeleva N.V., Zorin N.A., Ryabicheva T.G., Zorina R.M. Production of proinflammatory cytokines and alpha-2-macroglobulin by peripheral blood cells in the patients with colorectal cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 483-488. (In Russ.)) doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-483-488.

16. Ковалевич Н.И., Саркисян Н.С., Ракитина Е.Л., Галяс В.А., Санникова И.В., Махиня О.В. Влияние патогенетической терапии на содержание цитокинов у больных острым бруцеллезом // *Инфекция и иммунитет*, 2016. Т. 6, № 4. С. 384-388. [Kovalevich N.I., Sarkisyan N.S., Rakitina E.L., Galyas V.A., Sannikova I.V., Makhinya O.V. The influence of pathogenetic therapy on the lever of cytokines in patients with acute brucellosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, Vol. 6, no. 4, pp. 384-388. (In Russ.)) doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-384-388.

17. Лаптева А.М., Коленчукова О.А., Смирнова С.В. Особенности иммунного статуса и назального микробиоценоза при полипозном риносинусите и астматической триаде // *Медицинская иммунология*, 2016. Т. 18, № 6. С. 563-568. [Lapteva A.M., Kolenchukova O.A., Smirnova S.V. Immune parameters and nasal microflora in patients with polypoid rhinosinusitis and asthmatic triad. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 563-568. (In Russ.)) doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-563-568.

18. Лобанова Е.Г., Калинина Е.П., Денисенко Ю.К. Особенности содержания цитокинов Th1- и Th17-лимфоцитов у лиц с хронической обструктивной болезнью легких // *Медицинская иммунология*, 2016. Т. 18, № 3. С. 287-290. [Lobanova E.G., Kalinina E.P., Denisenko Yu.K. Cytokine contents in Th1- and Th17-type lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 287-290. (In Russ.)) doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-287-290.

19. Мазуров В.И., Долгих С.В., Сысоев К.А., Тотолян Арег А. Роль цитокинов в поддержании иммунновоспалительного процесса при первичных системных некротизирующих васкулитах // *Российский иммунологический журнал*, 2011. Т. 5 (14), № 3-4. С. 228-232. [Mazurov V.I., Dolgikh S.V., Sysoev K.A., Totolian Areg A. Role of cytokines in maintenance immunoinflammatory process in primary systemic necrotizing vasculitis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2011, Vol. 5 (14), no. 3-4, pp. 228-232. (In Russ.))

20. Мазуров В.И., Долгих С.В., Сысоев К.А., Тотолян Арег А. Значимость определения некоторых хемокинов при первичных системных некротизирующих васкулитах // *Российский иммунологический журнал*, 2012. Т. 6 (15), № 1. С. 51-54. [Mazurov V.I., Dolgikh S.V., Sysoev K.A., Totolian Areg A. The importance of chemokines determination in patients with primary systemic necrotizing vasculitis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2012, Vol. 6 (15), no. 1, pp. 51-54. (In Russ.))

21. Петрова О.А., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Тотолян А.А. Содержание некоторых про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных лептоспирозом // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, 2014. № 5. С. 60-64.

[Petrova O.A., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Arsentieva N.A., Lyubimova N.E., Semenov A.V., Totolian A.A. Content of some pro- and anti-inflammatory cytokines in blood sera of leptospirosis patients. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 5, pp. 60-64. (In Russ.)]

22. Прохоренко Т.С., Зима А.П., Саприна Т.В., Новицкий В.В., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С. Цитокиновый статус беременных с метаболическими нарушениями // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 301-306. [Prokhorenko T.S., Zima A.P., Saprina T.V., Novitskiy V.V., Todosenko N.M., Litvinova L.S. Cytokine profile in pregnant women with metabolic disorders. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 301-306. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-301-306.

23. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Гвоздев И.И. Особенности цитокиновой регуляции респираторного взрыва нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 475-482. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetsky D.E., Gvozdev I.I. Cytokine regulation of respiratory burst in blood neutrophils for prediction of abdominal sepsis in patients with extended purulent peritonitis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 475-482. (In Russ.)]. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-475-482.

24. Слепова О.С., Еремеева Е.А., Рябина М.В., Сорожкина Е.С. Цитокины в слезной жидкости и сыворотке крови как ранние биомаркеры возрастной макулярной дегенерации // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 3. С. 245-252. [Slepova O.S., Eremeeva E.A., Ryabina M.V., Sorozhkina E.S. Cytokines in lacrimal fluid and blood serum: early biomarkers of age-related macular degeneration. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 245-252. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-3-245-252.

25. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Поливанова Т.В., Агилова Ю.Н. Особенности цитокиновой регуляции при прогрессировании множественной миеломы // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 3. С. 261-268. [Smirnova O.V., Manchuk V.T., Polivanova T.V., Agilova Yu.N. Cytokine regulation in the course of multiple myeloma progression. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 261-268. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-3-261-268.

26. Смирнова О.В., Цуканов В.В., Титова Н.М., Губанов Б.Г. Особенности цитокиновой регуляции у больных механической желтухой злокачественного генеза // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 135-144. [Smirnova O.V., Tsukanov V.V., Titova N.M., Gubanov B.G. Features of cytokine regulation in patients with mechanical jaundice of malignant genesis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 135-144. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-135-144.

27. Смольникова М.В., Смирнова С.В., Ильенкова Н.А., Коноплева О.С. Иммунологические маркеры неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 453-460. [Smolnikova M.V., Smirnova S.V., Ilyenkova N.A., Konopleva O.S. Immunological markers of uncontrolled atopic bronchial asthma in children. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 453-460. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-453-460.

28. Сорокина Л.Н., Иванов В.А., Минеев В.Н., Лим В.В., Трофимов В.И. Особенности цитокинового спектра у больных неаллергической бронхиальной астмой в сочетании с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 313-318. [Sorokina L.N., Ivanov V.A., Lim V.V., Mineev V.N., Trofimov V.I. Cytokine profile features in the patients with nonallergic bronchial asthma with co-existing type 2 diabetes mellitus. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 313-318. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-313-318.

29. Стагниева И.В., Симбирцев А.С. Эффективность иммуномодулирующей терапии у больных риносинуситом // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 423-430. [Stagnieva I.V., Simbirtsev A.S. Immunotherapy efficiency in rhinosinusitis patients. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 423-430. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-423-430.

30. Сысоев К.А., Чухловин А.Б., Шахманов Д.М., Жданов К.В., Тотолян А.А. Профиль цитокинов и хемокинов в плазме крови пациентов с хроническим гепатитом С // Инфекция и иммунитет, 2013. Т. 3, № 1. С. 49-58. [Sysoev K.A., Chukhlov A.B., Shakhmanov D.M., Zhdanov K.V., Totolian A.A. Cytokines and chemokines in the blood plasma of patients with chronic hepatitis C. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, Vol. 3, no. 1, pp. 49-58. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2013-1-49-58.

31. Хворостухина Н.Ф., Островская А.Е., Новичков Д.А., Степанова Н.Н. Цитокиновый профиль при осложнениях гормонотерапии миомы матки // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 739-748. [Khvorostukhina N.F., Ostrovskaya A.E., Novichkov D.A., Stepanova N.N. Cytokine profile in complications of hormone therapy administered for uterine fibroids. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 739-748. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-739-748.

32. Шмидт Е.А., Бернс С.А., Барбараш О.Л., Юхно Е.С., Зыкова Д.С., Осокина А.В. Динамика уровней цитокинов у больных инфарктом миокарда, перенесших экстренное чрескожное коронарное вмешательство // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 359-364. [Schmidt E.A., Berns S.A., Barbarash O.L., Yukhno E.S., Zyкова D.S., Osokina A.V. Dynamics of cytokine levels in patients with myocardial infarction after urgent percutaneous coronary intervention. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 359-364. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-359-364.

Авторы:

Арсентьева Н.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Тотолян Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Arsentieva N.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 15.11.2017
Принята к печати 27.09.2018

Received 15.11.2017
Accepted 27.09.2018

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С апреля 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, №1. С. 64–69.

Varjushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbircev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64–69.

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с.

Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503–5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Авербах М.М. (мл.)	747	Коненков В.И.	691	Прокофьев В.Ф.	691
Андреева Е.А.	657	Королева Е.Г.	691	Прохоренко Т.С.	639
Арсентьева Н.А.	763	Корытина Г.Ф.	739	Радыгина Т.В.	721
Архипов С.А.	681	Костевич В.А.	699	Роггенбук Дирк	753
Архипова С.В.	711, 731	Костянко М.В.	647	Саприна Т.В.	639
Аутеншлюс А.И.	681	Кочетова О.В.	739	Сельков С.А.	621, 753
Ахмадишина Л.З.	739	Красильникова К.С.	647	Семикина Е.Л.	721
Баженов Д.О.	621	Лапин С.В.	753	Славина Е.Г.	667
Баторов Е.В.	657	Лапутенко Т.А.	711	Смирнова А.Ш.	711
Бондарева Е.А.	753	Лихачева В.В.	731	Соколов А.В.	699
Борунова А.А.	667	Лыкова О.Ф.	711	Соколов Д.И.	621
Ботвиньева И.А.	731	Мальцева Н.В.	711	Соловьева Л.Н.	753
Вараксин Н.А.	681	Мещерякова О.А.	711	Степанова О.И.	621
Васильев В.Б.	699	Мирошкина Л.В.	721	Студеникина А.А.	681
Васильева О.А.	639	Михайлова Е.С.	681	Тихонова М.А.	657
Викторова Т.В.	739	Мусина Н.Н.	639	Ткаченко О.Ю.	753
Глушков А.Н.	647	Нерсисян С.Л.	647	Топтыгина А.П.	721
Голованова А.В.	681	Новиков А.М.	691	Тотолян Арег А.	753, 763
Горбатовский Я.А.	711	Новицкий В.В.	639	Хонина Н.А.	657
Горбунов Н.П.	699	Нуртдинова В.А.	667	Хохлова Е.В.	621
Горудко И.В.	699	Окружнова М.А.	667	Цимбалова Е.Г.	721
Григорьева Д.В.	699	Олейник В.М.	613	Чепанов С.В.	753
Губкина М.Ф.	747	Олейник Е.К.	613	Черных Е.Р.	657
Джамгадзе Н.Т.	667	Оленникова Р.В.	647	Черткова А.И.	667
Евсеева Н.И.	747	Орлов Н.Б.	691	Чуров А.В.	613
Жукова Л.Г.	667	Панасенко О.М.	699	Шахманова Н.С.	639
Зима А.П.	639	Панова Л.В.	747	Шевченко А.В.	691
Зорин Н.А.	731	Пасман Н.М.	657	Шмонин А.А.	753
Зорина В.Н.	731	Петричук С.В.	721	Шоуа Э.К.	667
Кадагидзе З.Г.	667	Поленок Е.Г.	647	Шрамко С.В.	731
Коган И.Ю.	621	Потапов А.С.	721		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

альфа-2-макроглобулин	731	иммуноферментный анализ	754, 764	субпопуляции	613
анемия хронических заболеваний	639	инфликсимаб	722	субпопуляции лимфоцитов	
антитела	648	кателицидин	747	периферической крови	668
антифосфолипидные антитела	754	лайн-блоттинг	754	сыворотка крови	764
антифосфолипидный синдром	754	лейомиома	731	сывороточный секреторный IgA	711
бензо[а]пирен	648	локус гена <i>GSTP1</i> ^{Ile105Val}	711	Т-клетки памяти	613
беременность	622, 639, 657	миелопероксидаза	700	рак молочной железы (РМЖ)	668
бесплодие	657	миома матки	691	туберкулез	747
биомаркер	700	мультиплексный анализ	764	факторы роста ангиогенеза	691
ВЗК	722	новые методы	754	факторы роста гемопоэза	691
воспаление	739	общая выживаемость	668	фолликулярная жидкость	657
врожденный иммунитет	747	ожирение	639, 739	хемокины	739
врожденные пороки развития плода	648	ооциты	657	химиотерапия	668
выживаемость без		опухоли	682	церулоплазмин	700
прогрессирования	668	острый и подострый		цитокины	639, 682, 731, 764
галогемирующий стресс	700	инфекционный эндокардит	711	цитотоксичность	622
генетические маркеры	739	пероксидазная активность	700	ЭКО	657
гены стероидных рецепторов	731	плазма крови	764	эстрадиол	648
гепсидин	639	подростки	747	эффективность терапии	722
гестационный сахарный диабет	639	популяции CD4 ⁺ лимфоцитов	722	FGF-β	691
гетерогенность	613	популяции лимфоцитов	722	G-CSF	691
границы нормы	764	предраковые изменения молочной		IL-5	691
гранулизин	747	железы	682	IL-7	691
дети	722, 747	прогестерон	648	IL-9	691
децидуальная оболочка	622	прогрессирование заболевания	668	PDGF	691
дифференцировка	613	регуляторные Т-клетки	657	Т-лимфоциты	622
иммунодиагностика	764	рецепторы хемокинов	739	Treg-клетки	613
иммунокомпетентные клетки крови	682	сепсис	711	Treg-клетки памяти	613
иммунологическая память	613	сердечно-сосудистые заболевания	700	VEGF	691

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

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

ISSN 1563-0625

Личный кабинет

Логин:

Пароль:

☐ Запомнить меня

главная о журнале регистрация поиск последний выпуск архивы авторам новости

Поиск

Все

Листать

- по выпускам
- по авторам
- по заглавиям

Scopus

EBSCO

LIBRARY.RU

rnmj.ru

DOAJ

ULRICH'S PERIODICALS DIRECTORY

РГБ

Science Index

LocatorPlus

NLM Catalog

Jisc eopac

Open Archives

UNIVERSITY OF OXFORD

WorldCat

INEICON

Google Scholar

THE BRITISH LIBRARY

BASE

JournalTOCs

ROAD

Главная > Медицинская иммунология

Медицинская иммунология

Журнал «Медицинская иммунология» учрежден Санкт-Петербургским региональным отделением Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов и был зарегистрирован Северо-Западным региональным управлением Государственного комитета РФ по печати 26.03.99г. (свидетельство о регистрации № П 3612), а в дальнейшем перерегистрирован в Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций (свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №77-15892 от 30.06.2003г.). В 1999 году журнал получил номер международной регистрации ISSN 1563-0625. Тираж 1000 экз. Периодичность 6 номеров в год. Объем каждого номера составляет 13-14 печатных листов.

Журнал распространяется по всей территории Российской Федерации и в странах СНГ. С 2001 года журнал внесен в реестр подписных изданий: подписной индекс в каталоге «Роспечать» – 83030, в каталоге «Пресса России» – 42311.

В состав редколлегии журнала входят 14 специалистов, представляющие ведущие научные центры Северо-Западного региона, Москвы и Новосибирска. Среди них 6 академиков и 3 член-корреспондент РАН. Международный редакционный совет представлен 8 специалистами из США, Бразилии, Германии, Венгрии, Чехии, Израиля, Южной Кореи.

Целью издания является пропаганда научных достижений фундаментальной и клинической иммунологии для различных областей медицины, публикация обзоров, лекций, статей ведущих отечественных и зарубежных специалистов в области фундаментальной и экспериментальной иммунологии, клинической иммунологии, аллергологии, иммунодиагностики и иммунотерапии инфекционных, аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваний. Все публикуемые в журнале статьи, обзоры и лекции проходят обязательное рецензирование членами редколлегии. В журнале также публикуются работы зарубежных специалистов. Авторами примерно 40% публикаций являются молодые ученые. Традиционными разделами журнала являются: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.

С 2001 года решением ВАК Минобразования России журнал «Медицинская иммунология» регулярно входит в «Перечень периодических научных и научно-технических изданий, выпускаемых в РФ, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук».

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

С 2006 года издание журнала «Медицинская иммунология» регулярно поддерживается грантами Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга.

По состоянию на ноябрь 2017 года согласно данным анализа «Российского индекса научного цитирования» (РИНЦ) импакт-фактор для журнала «Медицинская иммунология» двухлетний составил – 0,907, а пятилетний – 0,636, при показателе самоцитируемости 9,5 % (подробная информация на сайте: www.elibrary.ru)

Отправить рукопись

Главный редактор
Ирина Соломоновна
Фрейдлин

OPEN ACCESS

Облако тегов

цитокины

Atom

We are Crossref Member

АНТИПЛАГИАТ

- ✓ Электронная редакция
- ✓ Подача статей online
- ✓ Online-версия журнала
- ✓ DOI для каждой публикации
- ✓ Весь архив в PDF-формате
- ✓ Поиск статей по ключевым словам, авторам, заглавиям

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

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

