

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ноябрь-декабрь

2018, том 20

№ 6

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spb.aaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197136, Санкт-Петербург, а/я 58.

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

© Медицинская иммунология

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

Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

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

Издательство «Человек»

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

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 08.11.2018 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 21. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 788

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

Михалец 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

November-December

2018, volume 20

No. 6

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaja
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

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

Address for correspondence:

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

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

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

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

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

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

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 08.11.2018. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 21. 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

Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П. ТРОМБОЦИТЫ КАК АКТИВАТОРЫ И РЕГУЛЯТОРЫ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ. ЧАСТЬ 1. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРОМБОЦИТОВ КАК ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК.....	785
Воронина Е.В., Лобанова Н.В., Яхин И.Р., Романова Н.А., Серегин Ю.А. РОЛЬ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ-АЛЬФА В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ И ЕГО ЗНАЧИМОСТЬ В РАЗВИТИИ АНТИЦИТОКИНОВОЙ ТЕРАПИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ	797
Арефьева А.С., Бабаян А.А., Степанова Е.О., Донцова Т.В., Павлович С.В., Кречетова Л.В., Николаева М.А. РОЛЬ CD200/CD200R-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ФОРМИРОВАНИИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И БЕРЕМЕННОСТИ	807

Оригинальные статьи

Калашникова А.А., Ворошилова Т.М., Чиненова Л.В., Давыдова Н.И., Калинина Н.М. СУБПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И У ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ	815
Карпунина Т.И., Годовалов А.П., Бусырев Ю.Б. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ЦИТОКИНОВОГО БАЛАНСА И ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ОБТУРАЦИИ ЖЕЛЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА.....	825
Кологривова И.В., Суслowa Т.Е., Винницкая И.В., Кошельская О.А., Бощенко А.А., Трубачева О.А. ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ДИСБАЛАНС И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕРДЦА У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА	833
Нестерова И.В., Малиновская В.В., Хайдуков С.В., Нгуен Тхи Зеу Лен, Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В. ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЕ ВЛИЯНИЯ ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛДИПЕПТИДА НА НЕТРАНСФОРМИРОВАННЫЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ТРАНСФОРМИРОВАННЫЙ ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИИ CD62L ⁺ CD63 ⁺ CD66d ⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЛИЦ	847

Краткие сообщения

Калинина Е.П., Виткина Т.И., Кнышова В.В., Федосеева Е.А., Новгородцева Т.П., Гвозденко Т.А. КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ СОПОСТАВЛЕНИЕ ПРИ Th-ЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМАХ ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ.....	855
Куртасова Л.М., Шакина Н.А., Шмидт А.Р., Иккес Л.А. ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОФЕРОНА НА КЛЕТОЧНУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ИНТЕРФЕРОНУ- $\alpha 2$ IN VITRO У БОЛЬНЫХ ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ, ВЫЗВАННЫМ ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА-БАРР	865
Панкратенко Т.Е., Москалец О.В., Абасеева Т.Ю. РАСТВОРИМЫЕ МОЛЕКУЛЫ АДГЕЗИИ У ДЕТЕЙ С АТИПИЧНЫМ ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ	871
Тарасова И.А., Инвиева Е.В., Буянтян К.А., Цховребов А.Т., Никода В.В., Шестаков А.Л. ВЛИЯНИЕ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ПОДГОТОВКИ УГЛЕВОДАМИ НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ, ИММУННЫЙ И ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС ПАЦИЕНТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ НА ПИЩЕВОДЕ	877
Миронов А.М., Миронова О.Б., Миронова Н.А. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-4-589C>T И ЭКСПРЕССИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 У ПАЦИЕНТОВ С РАЗВИТИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ТРАВМАТИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА	889
Бодиенкова Г.М., Курчеченко С.И. ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВ И БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА ПРИ ВИБРАЦИОННОЙ БОЛЕЗНИ	895
Отавина Е.А., Долгих О.В., Старкова К.Г., Казакова О.А., Мазунина А.А. ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ДЕТЕЙ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ СТРОНЦИЕМ	899
Лебеденко А.А., Шкурят Т.П., Машкина Е.В., Семерник О.Е., Дрейзина Т.К., Тюрина Е.Б. АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ С КЛИНИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ.....	905
Антонюк М.В., Гвозденко Т.А., Новгородцева Т.П., Виткина Т.И., Гельцер Б.И., Юренко А.В., Минеева Е.Е., Кнышова В.В. ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В СОЧЕТАНИИ С ОЖИРЕНИЕМ	913
Сташкевич Д.С., Беляева С.В., Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова А.Л. МЕЖГЕННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ IL1, IL1RA, IL6, IL10 И TNFA У БОЛЬНЫХ СИНДРОМОМ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ	921
Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Костянко М.В., Антонов А.В., Титов В.А., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСБАЛАНС ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РАКЕ ЛЕГКОГО У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ	927

Иммунологические методы

Кудряшова А.М., Михайлова Н.А., Борисова О.В. СРАВНЕНИЕ ИФА С ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ И КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgG-АНТИТЕЛ К ЭРИТРОПОЭТИНУ ЧЕЛОВЕКА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ.....	935
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ	943
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	946
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ.....	946

CONTENTS

Reviews

Serebryanaya N.B., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Yakutseni P.P.

BLOOD PLATELETS AS ACTIVATORS AND REGULATORS OF INFLAMMATORY AND IMMUNE REACTIONS.

PART 1. BASIC CHARACTERISTICS OF PLATELETS AS INFLAMMATORY CELLS..... 785

Voronina E.V., Lobanova N.V., Yakhin I.R., Romanova N.A., Seregin Yu.A.

ROLE OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA IN IMMUNE PATHOGENESIS OF DIFFERENT DISEASES AND ITS SIGNIFICANCE FOR EVOLVING ANTICYTOKINE THERAPY WITH MONOCLONAL ANTIBODIES 797

Arefieva A.S., Babayan A.A., Stepanova E.O., Dontsova T.V., Pavlovich S.V., Krechetova L.V., Nikolaeva M.A.

THE ROLE OF CD200/CD200R INTERACTIONS IN THE FORMATION OF IMMUNOLOGICAL TOLERANCE IN TRANSPLANTATION AND PREGNANCY 807

Original articles

Kalashnikova A.A., Voroshilova T.M., Chinenova L.V., Davydova N.I., Kalinina N.M.

MONOCYTE SUBSETS IN HEALTHY ADULTS AND SEPSIS PATIENTS 815

Karpunina T.I., Godovalov A.P., Busyrev Yu.B.

TECHNICAL ASPECTS OF EVALUATING CYTOKINE PROFILE AND LEUKOCYTE REACTION IN BILE DUCT OBSTRUCTION OF DIFFERENT ORIGIN 825

Kologrivova I.V., Suslova T.E., Vinnitskaya I.V., Koshelevskaya O.A., Boshchenko A.A., Trubacheva O.A.

IMMUNOREGULATORY IMBALANCE AND FUNCTIONAL STATE OF THE HEART IN THE PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2... 833

Nesterova I.V., Malinovskaya V.V., Khaydukov S.V., Nguyen Thi Dieu Lien, Chudilova G.A., Lomtadze L.V.

DIFFERENTIATED EFFECTS OF GLUCOSAMINYLMURAMILDIPEPTIDE ON THE NON-TRANSFORMED AND EXPERIMENTALLY TRANSFORMED PHENOTYPE OF CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺ NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CONVENTIONALLY HEALTHY PEOPLE 847

Short communications

Kalinina E.P., Vitkina T.I., Knyshova V.V., Fedoseeva E.A., Novgorodtseva T.P., Gvozdenko T.A.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL COMPARISONS IN Th-DEPENDENT IMMUNE RESPONSE MECHANISMS AMONG PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE 855

Kurtasova L.M., Shakina N.A., Smidt A.R., Ikkes L.A.

INFLUENCE OF CYCLOFERON ON THE CELLULAR SUSCEPTIBILITY TO INTERFERON- α 2 *IN VITRO* IN PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS CAUSED BY EPSTEIN-BARR VIRUS..... 865

Pankratenko T.E., Moskalets O.V., Abaseeva T.Yu.

SOLUBLE ADHESION MOLECULES IN CHILDREN WITH HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME 871

Tarasova I.A., Inviyaeva E.V., Bunyatyan K.A., Tskhovrebov A.T., Nikoda V.V., Shestakov A.L.

THE INFLUENCE OF THE PREOPERATIVE PRELOAD WITH CARBOHYDRATES UPON METABOLIC, IMMUNE AND CYTOKINE STATUSES AFTER RECONSTRUCTIVE ESOPHAGEAL SURGICAL INTERVENTIONS 877

Miromanov A.M., Mironova O.B., Miromanova N.A.

IL4-589C>T GENE POLYMORPHISM AND EXPRESSION OF INTERLEUKIN-4 IN PATIENTS WITH DEVELOPING CHRONIC TRAUMATIC OSTEOMYELITIS 889

Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I.

EVALUATION OF CYTOKINES AND HEAT SHOCK PROTEIN IN VIBRATION DISEASE 895

Otavina E.A., Dolgikh O.V., Starkova K.G., Kazakova O.A., Mazunina A.A.

CHANGES OF IMMUNOREGULATORY INDEXES IN CHILDREN EXPOSED TO STRONTIUM..... 899

Lebedenko A.A., Shkurat T.P., Mashkina E.V., Semernik O.E., Dreyzina T.K., Tyurina E.B.

ASSOCIATION OF MATRIX METALLOPROTEINASES GENE POLYMORPHISM WITH CLINICAL MANIFESTATIONS OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN 905

Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A., Novgorodtseva T.P., Vitkina T.I., Geltser B.I., Yurenko A.V., Mineeva E.E., Knyshova V.V.

FEATURES OF CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA COMBINED WITH OBESITY 913

Stashkevich D.S., Belyaeva S.V., Filippova Yu.Yu., Burmistrova A.L.

INTERGENIC INTERACTIONS OF CYTOKINE GENES IL1, IL1RA, IL6, IL10 AND TNFA IN PATIENTS WITH IRRITABLE BOWEL SYNDROME AND ULCERATIVE COLITIS IN RUSSIAN POPULATION OF THE CHELYABINSK REGION..... 921

Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Titov V.A., Verzhbitskaya N.E., Vafin I.A.

IMMUNOLOGICAL IMBALANCE IN BREAST CANCER AND LUNG CANCER IN POSTMENOPAUSAL WOMEN 927

Immunological methods

Kudryashova A.M., Mikhailova N.A., Borisova O.V.

COMPARISON OF COLORIMETRIC AND CHEMILUMINESCENT ELISA TESTS FOR DETECTION OF IgG ANTIBODIES TO HUMAN EPO IN THE SERA OF EXPERIMENTAL ANIMALS..... 935

INSTRUCTIONS TO AUTHORS..... 943

AUTHOR INDEX..... 946

SUBJECT INDEX 946

ТРОМБОЦИТЫ КАК АКТИВАТОРЫ И РЕГУЛЯТОРЫ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ. ЧАСТЬ 1. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРОМБОЦИТОВ КАК ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Серебряная Н.Б.^{1,2,3}, Шанин С.Н.¹, Фомичева Е.Е.¹, Якуцени П.П.⁴

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

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

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

⁴ ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Тромбоциты — самые мелкие клетки крови, которые суммарно имеют объем и площадь поверхности больше, чем все типы лейкоцитов вместе. Источником тромбоцитов являются мегакариоциты костного мозга, мегакариоциты в микрососудах легких. В легких производится приблизительно 50% всех тромбоцитов, что позволяет характеризовать их как основной сайт образования тромбоцитов. В малом круге кровообращения тромбоцитов примерно на 30% больше, чем в большом. Этот «избыток» тромбоцитов необходим для стабилизации эндотелиального барьера сосудов легких, регулятором которого является тромбоцитарный медиатор сфингозин-1-фосфат, поддерживающий плотные соединения эндотелиальных клеток. Удивительной особенностью тромбоцитов в циркуляции является способность «отпочковывать» новые про- и пре- тромбоциты, давая начало новым тромбоцитам. Удаление тромбоцитов из циркуляции осуществляется при их фагоцитозе макрофагами селезенки (в случае если тромбоциты покрыты IgG или связаны с иммунными комплексами) или Купферовскими клетками печени и гепатоцитами (если тромбоциты имеют неполные гликаны или десалирированные белки). В гомеостатических состояниях большая часть тромбоцитов удаляется в печени. При бактериальных инфекциях и сепсисе клиренс тромбоцитов ускорен из-за активности бактериальных сиалидаз. Распознавание десалирированных структур тромбоцитов осуществляется клетками печени через рецептор Asgr. Несмотря на отсутствие ДНК, тромбоциты способны синтезировать белки на матрицах мРНК, которые присутствуют в тромбоцитах в большом количестве. Активация тромбоцитов приводит к агрегации и экзоцитозу содержимого гранул, продукции иммуномодулирующих молекул. Однако активация тромбоцитов может быть неполной и приводить только к некоторым из перечисленных событий. При неклассической форме активации тромбоциты могут выпускать микрочастицы, которые содержат около 600 различных белков. В крови здоровых доноров около 75% микрочастиц — производные тромбоцитов. Подобно клеткам иммунной системы, тромбоциты активируются многочисленными эндогенными лигандами (аларминами), в числе которых АДФ и АТФ, которые связываются с пуринэргическими рецепторами P2Y₁, P2Y₁₂ и P2X₁. Тромбоциты

Адрес для переписки:

Серебряная Наталья Борисовна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 9а.
Тел.: 8 (812) 234-15-83.
Факс: 8 (812) 234-94-93.
E-mail: nbvma@mail.ru

Address for correspondence:

Serebryanaya Natalya B.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 9a.
Phone: 7 (812) 234-15-83.
Fax: 7 (812) 234-94-93.
E-mail: nbvma@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Б. Серебряная, С.Н. Шанин, Е.Е. Фомичева, П.П. Якуцени «Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Часть 1. Основные характеристики тромбоцитов как воспалительных клеток» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 785–796.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-785-796

© Серебряная Н.Б. и соавт., 2018

For citation:

N.B. Serebryanaya, S.N. Shanin, E.E. Fomicheva, P.P. Yakutseni “Blood platelets as activators and regulators of inflammatory and immune reactions. Part 1. Basic characteristics of platelets as inflammatory cells”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 785–796.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-785-796

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-785-796

накапливают и сохраняют 99% серотонина, имеющегося в организме. Индукции воспаления тромбоциты способствуют путем высвобождения провоспалительных цитокинов, хемокинов и липидных медиаторов. Кроме того, тромбоциты являются источником ферментов и субстратов, дополняющих возможности нейтрофилов и эндотелия при производстве противовоспалительных липидных медиаторов, позволяющих перейти к процессам восстановления ткани после острой фазы воспаления.

Ключевые слова: тромбоциты, мегакариоциты, микрочастицы, рецепторы, АТФ, липидные медиаторы

BLOOD PLATELETS AS ACTIVATORS AND REGULATORS OF INFLAMMATORY AND IMMUNE REACTIONS. PART 1. BASIC CHARACTERISTICS OF PLATELETS AS INFLAMMATORY CELLS

Serebryanaya N.B.^{a, b, c}, Shanin S.N.^a, Fomicheva E.E.^a, Yakutseni P.P.^d

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

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

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

^d Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Platelets are the smallest blood cells, and yet their total volume and surface area exceed those of all types of leukocytes combined. Platelets are produced by the bone marrow megakaryocytes and megakaryocytes in the lung microvessels. Approximately 50% of all platelets are produced in the lungs, which makes it possible to characterize them as the main site for the production of platelets. In small circuit of blood circulation, there are approximately 30% more platelets than in large circuit. This “excess” of platelets is necessary for the stabilization of the endothelial barrier of the lung vessels regulated by the platelet mediator sphingosine-1-phosphate, a regulator of tight junctions of endothelial cells. The circulating platelets have an amazing ability to “bud” new pro- and pre-platelets, giving rise to new platelets. The removal of platelets from circulation proceeds *via* their phagocytosis by spleen macrophages (if platelets are covered with IgG or are bound to immune complexes), or Kupffer liver cells and hepatocytes (if platelets have incomplete glycans or desialated proteins). In homeostatic conditions, most of the platelets are removed in liver. Platelet clearance in bacterial infections and sepsis is accelerated because of the activity of bacterial sialidases. Recognition of desialized platelet structures is carried out by the liver cells through the Asgr receptor. Despite DNA absence, the platelets are able to synthesize proteins at mRNAs that are present in majority of platelets. Activation of platelets leads to aggregation and exocytosis of the granule contents, and production of immunomodulating molecules. However, activation of platelets may be incomplete and has various consequences. In a non-classical activation model, platelets can release microparticles that contain about 600 different proteins. About 75% of microparticles in the blood of healthy donors are derived from platelets. Like as immune system cells, platelets are activated by numerous endogenous ligands (alarms), including ADP and ATP, which bind to purinergic receptors P2Y1, P2Y12 and P2X1. Platelets accumulate and retain 99% of the serotonin stored in the body. The platelets contribute to induction of inflammation by releasing proinflammatory cytokines, chemokines, and lipid mediators. In addition, platelets are the source of enzymes that accomplish the capacities of neutrophils and endothelium for production of anti-inflammatory lipid mediators that contribute to tissue repair following acute phase of inflammation.

Keywords: platelets, megakaryocytes, microparticles, receptors, ATP, lipid mediators

Введение

Впервые кровяные пластинки описал в 1841 г. французский исследователь Донне, в 1882 г. итальянский ученый Биццочеро [8] определил их как третий клеточный элемент крови (наряду с эритроцитами и лейкоцитами), а в 1901 г. немец

М. Декхюйзен ввел термин «тромбоциты» на основании выявленной у пластинок способности регулировать гемостаз и гемокоагуляцию. Однако даже через 155 лет от начала их изучения у нас нет ответов на многие фундаментальные вопросы, связанные с образованием и функцией тромбоцитов.

Тромбоциты (при содержании ~ 300 000 клеток в микролитре, среднем объеме ~ 7 (6-10) фл и площади поверхности ~ 8 мкм²) имеют суммарный объем и площадь поверхности больше, чем все типы лейкоцитов вместе. При этом тромбоциты — самые мелкие клетки крови, их диаметр около 3 (2-5) мкм, что в 4 раза меньше, чем у эритроцитов, и в циркуляции тромбоцитов примерно в 25 раз меньше, чем эритроцитов. В сосудистом русле эритроциты занимают центральную позицию, а тромбоциты располагаются преимущественно вдоль сосудистой стенки, что дает им возможность немедленно реагировать на ее повреждение [63].

Образование, циркуляция и секвестрация тромбоцитов

Каждый день у человека образуется приблизительно 1×10^{11} тромбоцитов, которые в среднем сохраняются в циркуляции 7-10 дней. Источником тромбоцитов являются мегакариоциты, формирование которых происходит в костном мозге. При терминальной дифференцировке мегакариоциты разделяются на деградирующее ядро и 10-20 протромбоцитов, которые начинают образовываться как выпячивания цитоплазмы и в течение долгого времени протягиваются в синусоидальное пространство, удлиняются, утончаются и неоднократно ветвятся. Протромбоциты фрагментируются, образуя приблизительно 2000-5000 новых тромбоцитов [22]. Кроме того, доказанным считается наличие сайтов экстрамедуллярного образования тромбоцитов: основным резервуаром резидентных мегакариоцитов и гемопоэтических клеток-предшественников определены легкие [35]. Мегакариоциты в микрососудах легкого являются источником протромбоцитов, претромбоцитов и тромбоцитов, причем, по современным данным, в легких мышей производится приблизительно до 50% всех тромбоцитов, что позволяет характеризовать легкие как основной сайт образования тромбоцитов [61]. Одним из следствий этого процесса является то, что в малом круге кровообращения тромбоцитов ~ на 30% больше, чем в большом [10]. Присутствие большого пула недавно сформированных тромбоцитов в сосудах легких создает широкие возможности для их взаимодействия с нейтрофилами. Нейтрофилы, как и мегакариоциты, испытывают затруднения при прохождении по микрососудам легких из-за деформационного сопротивления, что приводит к их накоплению в микрососудах легких, создавая пул пристеночных лейкоцитов. Таким образом, создаются условия для близкого контакта и взаимодействия тромбоцитов и нейтрофилов в микрососудах легких. Тромбоциты стабилизируют эндотелиальный барьер сосудов легких, так как экспрес-

сируют и/или выпускают факторы стабилизации (прототипный фактор — сфингозин-1-фосфат, S1P), которые взаимодействуют с рецепторами на клетках эндотелия. Рецепторы для стабилизирующих факторов связаны с внутриклеточными сигнальными путями, которые регулируют свойства эндотелиального барьера, обеспечиваемые белками плотных соединений [62].

Процесс образования тромбоцитов все еще не изучен в деталях и не перестает удивлять исследователей самыми неожиданными сценариями. Недавно было выявлено, что, находясь в циркуляции, сами тромбоциты могут стать источником новых тромбоцитов, которые «отпочковываются» от этих безъядерных клеток и проходят последовательно стадии созревания как про- и претромбоциты [27].

Срок жизни тромбоцитов в циркуляции сильно зависит от сопутствующих факторов и состояний. Удаление (секвестрация) тромбоцитов из циркуляции осуществляется при фагоцитозе макрофагами селезенки (в случае если тромбоциты покрыты IgG или связаны с иммунными комплексами) или макрофагами печени и гепатоцитами (если тромбоциты имеют неполные гликаны или десиалированные белки). В гомеостатических состояниях большая часть тромбоцитов удаляется в печени. При бактериальных инфекциях и сепсисе уменьшается время рециркуляции тромбоцитов, что связывают с их ускоренным клиренсом, к которому приводит десиалирование белков поверхности тромбоцита ферментами бактерий (сиалидазами). Распознавание тромбоцитов с десиалированными структурами осуществляется клетками печени через рецептор Asgr (asialoglycoprotein receptor), известный также как рецептор Эшвелла—Морелла (Ashwell—Morell) [47]. В тех случаях, когда антитела связывают вирусные или лекарственные антигены на тромбоцитах, фиксация иммунных комплексов на мембране тромбоцитов ведет к ускоренному удалению тромбоцитов макрофагами селезенки.

Тромбоциты как клетки

Основными клеточными характеристиками тромбоцитов являются отсутствие ядра и присутствие многочисленных органелл, включая эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, митохондрии, гликосомы (везикулы, содержащие ферменты гликолиза) и гранулы. Тромбоцит содержит ~ 70 гранул, которые подразделяют на 3 типа: α -гранулы, плотные гранулы и лизосомальные гранулы [46]. Из них α -гранулы являются самыми многочисленными (50-60 на тромбоцит) и самыми крупными (200-400 нм), в них хранится около 300 различных белков, включая фактор фон Виллебранда, фибронектин, фи-

бриноген, Р-селектин, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), белок-предшественник амилоида, матриксные металлопротеиназы, различные факторы коагуляции и факторы роста [26, 38]. Плотные гранулы меньше (~ 150 нм), менее многочисленны (3-8 на тромбоцит) и содержат малые молекулы (серотонин, аденозиндифосфат, аденозинтрифосфат и кальций). Лизосомальные гранулы немногочисленны и содержат гликогидролазы и деградационные ферменты [27]. При стимуляции тромбоцита гранулы подвергаются регулируемому экзоцитозу и высвобождают свое содержимое во внеклеточную среду. При этом происходит «раскрытие» гранул таким образом, что молекулы, обычно располагающиеся на внутренней поверхности мембран гранул, представляются теперь на поверхности клетки [44].

На своей поверхности тромбоциты экспрессируют различные рецепторы, включая $\alpha 2$ - и $\beta 2$ -адренорецепторы, рецепторы для серотонина и фибриногена. Плазматическая мембрана тромбоцитов имеет многочисленные поры, продолжением которых является открытая канальцевая система, которая намного увеличивает площадь поверхности тромбоцита. Тромбоциты имеют также особую систему плотных тубулярных канальцев, которые представляют собой депо кальция и ферментов, поддерживающих активацию тромбоцитов. Полагают, что плотные канальцы являются остатком гладкого эндоплазматического ретикулума мегакариоцитов [33].

Тромбоциты – метаболически активные клетки. Несмотря на отсутствие ДНК, тромбоциты способны синтезировать белки. Эта характеристика тромбоцитов была впервые описана в 1967 г. [58], однако из-за несоответствия общепринятым представлениям о механизмах синтеза белка в клетке игнорировалась в течение нескольких десятилетий [61]. В тромбоцитах выявлен неповрежденный сплайсосом (макромолекулярный аппарат для обработки пре-мРНК), большие количества мРНК, которые используются как матрица для синтеза белков при активации тромбоцитов [58, 61]. Активированные тромбоциты могут синтезировать PDGF, фактор активации тромбоцитов 4 (PAF-4), β -тромбоглобулин и тромбоспондин, интерлейкин-1 β (IL-1 β) и другие белки. Интересно, что, несмотря на отсутствие процесса транскрипции, в тромбоцитах присутствуют различные транскрипционные факторы (p65 NF- κ B, PPAR γ , PPAR β/δ , PPAR α , LXR β , RXR α , GR, AHR и STAT3). Тот факт, что первоначально транскрипционные факторы были открыты как особые белковые регуляторные элементы транскрипции, не исключает существования у этих белков и негеномных функций. Транскрипционные факторы участву-

ют в регуляции функций тромбоцитов, активируясь при взаимодействии с активированными молекулами, вовлеченными в проведение сигнала от рецепторов, связавшихся со своими лигандами/агонистами.

В последние годы выявлено, что тромбоциты, как и ядродержащие клетки, подвергаются апоптозу. Апоптоз тромбоцитов индуцируется многими проапоптотическими химическими и физическими стимулами. Маркерами тромбоцитарного апоптоза являются: изменение формы тромбоцита (сжатие, фрагментация до микрочастиц и вытяжение филоподий), изменение клеточной мембраны тромбоцита (пузырение и экспозиция фосфатидилсерина), изменение митохондрий (деполяризация внутренней мембраны, выход цитохрома С, экспрессия про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2), и активация цитоплазматических белков (каспазы 3) [20].

Гемостатическая и негемостатическая роль тромбоцитов

Основной и критической функцией тромбоцитов, по которой они получили свое название, является поддержка гемостаза. Однако для контроля над гемостазом достаточно, чтобы количество тромбоцитов немного превышало 10 000/мкл, в то время как нормальное количество тромбоцитов у человека находится в диапазоне 180 000–400 000/мкл [50]. Такое количественное несоответствие позволяет предположить, что тромбоциты имеют еще ряд важных функций, не связанных с тромбозом и гемостазом.

Хотя тромбоциты очень динамичны, в циркуляции они обычно находятся в неактивном состоянии и активируются, только когда повреждается кровеносный сосуд. Неактивированные тромбоциты имеют уникальную дискообразную форму, которую обеспечивают структуры цитоскелета, окруженные несколькими петлями периферических микроканальцев [31]. При воздействии слабых агонистов тромбоциты могут активироваться частично и обратимо (т.н. прайминг), и эта активация может быть синергично увеличена другими агентами различными путями. При полной активации тромбоциты необратимо меняют дискоидную форму за счет образования большого количества псевдоподий в течение нескольких секунд и создают агрегаты друг с другом и с другими клеткам, адгерируют к различным поверхностям, особенно к коллагену субэндотелия, формируя белый тромб. Самыми известными инициаторами агрегации тромбоцитов и индукторами коагуляционного каскада являются тромбин, фибриноген, протеин С и система контактных белков (кинин-кининоген). Полная активация тромбоцита сопровождается высво-

бождением содержимого гранул и образованием липидных медиаторов. Компоненты, содержащиеся в гранулах, и образовавшиеся медиаторы действуют по механизмам позитивной обратной связи, потенцируя активацию тромбоцитов. При этом активация тромбоцитов приводит не только к инициации каскада коагуляции (доиммунный механизм защиты), но также способствует индукции воспаления.

При активации тромбоцитов такие события, как агрегации и экзоцитоз содержимого гранул, продукция иммуномодулирующих молекул, не всегда взаимосвязаны. Например, адреналин стимулирует связывание фибриногена и агрегацию, но ингибирует выпуск тромбоцитарных цитокинов [21]. Механизм этой ингибиции связан с активацией индуцибельной синтазы окиси азота (iNOS) после связывания β 2-адренорецепторов; ранее было показано, что при образовании окиси азота (NO) и цГМФ происходила ингибиция активации тромбоцитов.

Активация тромбоцитов связана с изменением экспрессии ряда поверхностных рецепторов. Для выявления активированных тромбоцитов при иммунофенотипировании чаще всего используют маркеры CD36 (рецептор тромбоспондина), CD61 (интегриновая цепь β 3) и CD41 (α -цепь интегрин в комплексе CD61/CD41, известен также как GPIIb/IIIa, CD42a [GPIX], CD42b [GPIb]) и CD62P (P-селектин). Эти гликопротеины экспрессируются тромбоцитами и мегакариоцитами, обеспечивая клеточную адгезию и связывание фибриногена, что требуется для агрегации тромбоцитов и их закрепления на эндотелии [24]. Так, P-селектин (CD62P) хранится в α -гранулах тромбоцитов и является кальций-зависимым белком, который во время активации тромбоцита перемещается к плазматической мембране, где он определяет взаимодействие тромбоцитов с эндотелиальными клетками и лейкоцитами.

Микрочастицы тромбоцитов

При неклассической форме активации тромбоциты могут выпускать микрочастицы (меньше 1 мкм в диаметре), которые определяют по наличию экспрессии CD41 или CD42b, CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1), CD61 и CD62P. В крови здоровых доноров около 75% микрочастиц в циркуляции — производные тромбоцитов. Микрочастицы неоднородны и могут быть разделены на классы по размеру, содержанию в них факторов роста, хемокинов, мембранных рецепторов и по функциональным характеристикам [15]. Протеомные исследования свидетельствуют, что микрочастицы, полученные из тромбоцитов человека, содержат около 600 различных белков [19].

Состав липидной оболочки микрочастиц отличается от компонентов мембраны тромбоцитов по более высокому содержанию фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (30 и 35% от общего содержания липидов соответственно) и отсутствию лизолипидов [59]. Микрочастицы переносят от клетки к клетке как рецепторы клеточной поверхности, так и внутриклеточные компоненты, среди которых цитокины и транскрипционные факторы [34]. Тромбоцитарные микрочастицы усиливают формирование межклеточных контактов и способствуют развитию воспалительных реакций [6]. Взаимодействуя с лейкоцитами, микрочастицы тромбоцитов повышают их адгезивность, активируют процесс взаимодействия нейтрофильных гранулоцитов как с эндотелиальными клетками, так и с тромбоцитами [18]. При воспалительных и тромбоцитарных состояниях количество образуемых микрочастиц существенно увеличивается [11]. Образование тромбоцитарных микрочастиц способствует иммунным реакциям из-за высокого содержания в них IL-1 β [27]. Например, при ревматоидном артрите контакт тромбоцитов с коллагеном вызывает образование микрочастиц, содержащих значительные количества IL-1 β , что усиливает суставное воспаление [9].

Взаимодействие тромбоцитов с эндотелием

Тромбоциты — критические регуляторы, контролируемые состояние эндотелия. Известно, что тромбоциты и эндотелий развиваются из общей клетки-предшественника костномозгового происхождения. В клетках обоих типов подобным образом используются как транскрипционные регуляторы (например, GATA-2), так и программы экспрессии многих генов (фактор Виллебранда, P-селектин, мультимерин). Среди многочисленных факторов роста, хранящихся в α -гранулах тромбоцитов, имеется набор медиаторов, предназначенных для позитивной и негативной регуляции выживания и роста эндотелиальных клеток — фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиопозитин-2 (ANG-2), тромбоспондин-1 (TSP-1) и тромбоцитарный фактор-4 (PF-4) [58].

При культивировании *in vitro* тромбоциты стимулируют рост эндотелиальных клеток и способствуют их самосборке в капилляроподобные структуры [56]. Связь между эндотелием и пластинками становится очевидной при тромбоцитопении и определенных формах тромбоцитопатий, когда дефицит функций тромбоцитов является причиной дисфункции эндотелия, приводя к повышенной проницаемости капилляров — основному клиническому симптому указанных состояний [57]. Другой стороной процесса, связанного с повышением проницаемости

сосудистой стенки, является активация воспалительных реакций, и прежде всего привлечение и активация нейтрофилов и моноцитов [55].

В месте повреждения сосуда активация коагуляционного каскада приводит к образованию тромбина (сериновой протеазы). Тромбоциты экспрессируют два рецептора для тромбина, протеазоактивируемые рецепторы PAR-1 и PAR-4 [29]. Активированные тромбином тромбоциты высвобождают содержимое гранул, включая АДФ, и метаболизируют арахидоновую кислоту, производя тромбоксан А₂. Аутокринное связывание АДФ и тромбоксана А₂ со своими рецепторами способствует процессам активации тромбоцита. Адгезия тромбоцитов к коллагену в месте повреждения эндотелия определяется его связыванием с интегрином $\alpha 2 \beta 1$ и гликопротеиновым рецептором VI (GPVI) суперсемейства иммуноглобулинов [53].

Стабильная адгезия тромбоцитов к компонентам внеклеточного матрикса и взаимодействие тромбоцит-тромбоцит связаны с гликопротеинами комплекса GPI-IX-V, который включает GPI α , GPI β , GPIX и GPV и обеспечивает связь тромбоцитов через фактор фон Виллебранда (фВ). [5]. Взаимодействие GPI $\beta \alpha$ с фВ создает сигналы, которые активируют интегриновую молекулу $\alpha \text{Ib} \beta 3$, самый многочисленный рецептор на поверхности тромбоцита (50 000-80 000 копий), имеющий дополнительный пул хранения в α -гранулах.

Другие рецепторы семейства интегринов, а именно $\alpha \text{v} \beta 3$, $\alpha 5 \beta 1$ и $\alpha 6 \beta 1$, находятся на поверхности тромбоцитов в неактивном состоянии, но при стимуляции агонистом претерпевают конформационные изменения. Активные формы интегринов связываются с растворимым в плазме фибриногеном и поддерживают агрегацию тромбоцит-тромбоцит и адгезию к витронектину, фибронектину и ламинину в месте повреждения [13, 42, 43, 52]. Интегрины располагаются на мембране тромбоцитов в комплексе с тетраспонами (CD9 и CD63), которые поддерживают трансдукцию сигнала и стабильную адгезию [23, 25].

Тромбоцитарный GPI $\beta \alpha$ может взаимодействовать с Р-селектином и фВ, присутствующим на эндотелиальных клетках [45]. Значительное внимание привлекает в настоящее время тромбоцитарный рецептор С-лектинового типа CLEC-2, который позволяет тромбоцитам участвовать в разделении лимфовенозных и кровеносных сосудов во время развития за счет взаимодействия с подоплатином, экспрессия которого характерна для эндотелиальных клеток лимфатических сосудов [7].

Пуринергическая регуляция тромбоцитов

Подобно клеткам иммунной системы, тромбоциты активируются многочисленными эн-

догенными лигандами, высвобождающимися стрессированными и поврежденными клетками (аларминами), в числе которых адениновые нуклеотиды аденозиндифосфат (АДФ), традиционный активатор тромбоцитов, и аденозинтрифосфат (АТФ). АТФ и АДФ высвобождаются из клеток при повреждении и секретируются из плотных гранул тромбоцитов. Используя механизмы позитивной обратной связи, нуклеотиды действуют через рецепторы на поверхности тромбоцита. Установлено, что АДФ активирует тромбоциты через 2 пуринергических рецептора P2Y₁ и P2Y₁₂, а АТФ действует через рецептор P2X₁ [24].

Рецептор P2Y₁ связан с G-белком (проводит сигнал через субъединицу G α q), связывание с его агонистом приводит к изменению формы тромбоцита, агрегации, образованию тромбоксана А₂, прокоагулянтной активности, адгезии к фибриногену и формированию тромба в условиях напряжения сдвига. Второй рецептор для АДФ — P2Y₁₂ — также связан с G-белком (проводит сигнал через субъединицу G α i) и функционально очень схож с P2Y₁. Рецептор P2Y₁₂ важен для потенцирования активации тромбоцита, опосредованной различными физиологическими агонистами, такими как фактор фон Виллебранда и тромбоксан А₂. Определение важности рецептора P2Y₁₂ и ограниченность его экспрессии в других тканях привели к появлению препаратов, блокирующих этот рецептор (клопидогрел и тиклопидин), которые успешно используются в клинической практике для лечения протромботических состояний. Третьим пуринергическим рецептором тромбоцитов является P2X₁, ионный канал, который вызывает приток кальция после активации. Хотя изолированная активация этого рецептора не приводит к агрегации, он вызывает изменение формы тромбоцита и способствует процессу активации при действии других агонистов.

Серотонин (5-НТ)

В плотных гранулах тромбоцитов сохраняется 99% серотонина, имеющегося в организме [49]. При этом серотонин в тромбоцитах не синтезируется. Источником серотонина за пределами ЦНС являются энтерохромафинные клетки ЖКТ, которые секретируют этот нейромедиатор при попадании пищи в просвет кишечника. Серотонин обеспечивает сокращение гладких мышц пищеварительного тракта, вызывая перистальтику. Транспортный белок SERT путем активного транспорта переносит избыточный серотонин, содержащийся в венах ЖКТ, в тромбоциты, и далее переносит его в плотные секреторные гранулы. Эти процессы во многом сходны с захватом и хранением норадреналина в симпатических

нервных окончаниях. Концентрация серотонина в гранулах достигает 0,6 моль/л, что в 1000 раз выше, чем в цитоплазме тромбоцитов.

На тромбоцитах экспрессируется серотониновый рецептор подтипа 2A (5-HT_{2A}), связанный с G-белком [40], который стимулирует связанную с мембраной фосфолипазу C, вызывая фосфорилирование фосфотидилинозитол 4,5-бисфосфата и образование диацилглицерола и инозитол 1,4,5-трифосфата. Выход серотонина из плотных гранул тромбоцита в местах повреждения эндотелия способствует активации тромбоцитов и поддерживает тромбообразование. Серотонин может действовать как прокоагулянт, способствуя удержанию прокоагулянтных белков (фибриногена и тромбоспондина) на поверхности тромбоцита [49].

При воспалительных состояниях серотонин усиливает хемотаксис и миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, увеличивает содержание эозинофилов в крови, усиливает дегрануляцию тучных клеток и высвобождение других медиаторов аллергии и воспаления. Серотонин высвобождается из тромбоцитов после стимуляции активирующими факторами, такими как липополисахарид (ЛПС) и IFN γ . Взаимодействуя с иммунными клетками, серотонин способствует продукции ими IFN γ . При устранении из среды эндогенного серотонина подавляется продукция таких цитокинов, как IL-6 и TNF α [32].

Липидные медиаторы тромбоцитов

В тромбоцитах содержится несколько различных семейств липидов, таких как фосфолипиды, сфинголипиды, стероиды и пренольные липиды, а также сложная смесь липидов, имеющих незначительные различия молекулярных структур (позиционная изомерия, длина цепи жирной кислоты и насыщенность водородом). Как и во всех клетках млекопитающих, главные липидные структуры в тромбоцитах — фосфолипиды, которые вместе с гидрофобными жирными кислотами образуют как плазматическую мембрану, так и многочисленные внутриклеточные мембраны органелл. Во время активации эти липиды являются субстратами, которые преобразуются ферментами в биологически активные молекулы, такие как 1,2-диацилглицерол, эйкозаноиды, фосфатидилинозитиды, лизофосфолипиды и лизофосфатидную кислоту. Основная метаболизация липидов происходит во время активации тромбоцита и связана со значительными структурными изменениями в мембранах тромбоцита, таких как изменение формы, распластывание, формирование микровезикул и дегрануляция, а также образование биологически активных протромбических молекул. Мембраны тромбоцита содержат сфингомиелин и свободный холестерин, кото-

рым обогащены специализированные сигнальные области, известные как липидные плоты. Тромбоциты также содержат заметные количества нейтральных липидов, таких как ди- и триглицериды, а также сложные эфиры холестерина. Некоторые липиды, такие как сфинголипиды и гликолипиды/церамиды, присутствуют в меньших количествах, но имеют важные сигнальные роли. Для регенерации тканей важными оказались такие липидные метаболиты тромбоцитов, как фосфолипиды, сфинголипиды, лизофосфатидная кислота и фактор активации тромбоцитов PAF [1].

Эйкозаноиды

Изучение роли биологически активных липидов в биологии тромбоцитов привело в 1976 г. к определению тромбоксана A₂ (TxA₂) как тромбоцитарного липида, который вызывает необратимую агрегацию тромбоцитов (Сэмюэлссон и Вейн, Нобелевская премия 1982 г.). Активация тромбоцитов стимулирует не только производство проагрегантного TxA₂, но и различных продуктов 12/15-липоксигеназы, которые обладают иммунорегулирующим действием. Например, активный метаболит арахидоновой кислоты 2S-гидроксиэйкозатетраеновая кислота 12(S)-HETE, способствует ретракции эндотелиальных клеток и экстравазации клеток крови. В настоящее время тромбоксаны, как и другие производные арахидоновой кислоты (простагландины, простациклины и лейкотриены), классифицируют как эйкозаноиды. Биосинтез эйкозаноидов начинается при гидролизе фосфолипидов плазматической мембраны под действием фермента фосфолипазы A₂, активность которого контролируется гормонами и другими биорегуляторами, сопряженными с G-белками. Если метаболизм арахидоновой кислоты идет с участием фермента простагландинсинтетазы (обладающей свойствами циклооксигеназы и пероксидазы), то образуются простагландины, простациклины и тромбоксаны, а если с участием другого фермента — липоксигеназы, то синтезируются лейкотриены [1]. Тромбоциты — основной источник этих агентов. В настоящее время степень активации тромбоцитов оценивают по уровню тромбоксана B₂ (TxB₂) в циркуляции, стабильному продукту распада тромбоксана A₂ [2, 3].

Эндоканнабиноиды

Являются производными арахидоновой кислоты, наиболее важные из которых анандамид (этаноламид арахидоновой кислоты) и 2-арахидоноилглицерин. Эндоканнабиноиды служат сигнальными молекулами, для них на нейронах и других клетках организма имеются специфические рецепторы и ферменты, катализирующие их синтез и деградацию. Тромбоциты могут синте-

зировать 2-арахидоноилглицерин, который вызывает их активацию [41]. При воспалительных состояниях эндоканнабиноиды обладают противовоспалительной активностью [37].

Фактор активации тромбоцитов (PAF)

Фосфолипидный медиатор воспаления синтезируется, наряду с тромбоцитами, многими типами клеток: нейтрофилами, базофилами и эндотелиальными клетками. PAF был обнаружен по его сильной анафилактической активности, отличной от анафилатоксинов комплемента C3a и C5a [54]. PAF — активатор тромбоцитов, который стимулирует их агрегацию даже в пикомолярных концентрациях [28]. При этом PAF — мощный хемоаттрактант для воспалительных клеток [39, 56]. Хотя PAF не эйкозаноид, большая часть PAF производится той же самой системой ферментов. Ингибиторы фосфолипазы A2 ограничивают уровень продукции PAF и исследуются как мишень для лекарственных препаратов противовоспалительного и антиагрегантного действия [17].

Лизофосфатидная кислота (ЛФК)

Это фосфатированный эфир глицерина, который образуется из молекулы лецитина при удалении из нее холина. ЛФК вовлечена в большое количество физиологических процессов, модулирует функцию многих органов и систем (ЖКТ, нервную, иммунную, мочеполовую системы и другие); этот липид принимает участие в эмбриональном развитии и также вовлечен в патогенез заболеваний (среди них фиброз, воспаление и опухоли). На клеточном уровне ЛФК модулирует миграцию, хемотаксис, пролиферацию, выживание и другие процессы. Активность ЛФК проявляется при связывании с шестью рецепторами семейства лизофосфолипидов (LPA1-6), которые, наряду с рецепторами S1P, принадлежат семейству рецепторов, связанных с G-белком (GPCR) [12, 65].

ЛФК, производимая тромбоцитами, является главным источником ЛФК в плазме крови. На тромбоцитах имеется селективный рецептор для ЛФК, который может быть вовлечен в активацию тромбоцитов. Сама по себе ЛФК — слабый агонист тромбоцитов, но ее активирующая способность синергетично увеличивается в присутствии адреналина или ЛПС. ЛФК стимулирует экспрессию IL-8 и хемоаттрактантного белка моноцитов 1 (MCP-1) в эндотелиальных клетках способом, зависимым от IL-1 [36]. Прием аспирина при заболеваниях сосудов уменьшает уровень ЛФК в крови, а после отмены аспирина уровень ее вновь повышается [51].

Сфинголипиды

Класс липидов, имеющих в основе сфингоидную цепь. Сфингозин-1-фосфат (S1P) представляет собой фосфорилированное производное

сфингозина, являющегося структурной основой всех сфинголипидов. S1P продуцируется в тромбоцитах, сохраняется и высвобождается при активации тромбином или АДФ [14]. S1P регулирует множество клеточных процессов посредством связывания с одним из пяти специфических рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR), обозначаемых как S1P1-5. Эти рецепторы по-разному экспрессированы в различных тканях, где каждый регулирует специфические виды клеточной активности, такие как пролиферация, адгезия, сокращение, подвижность, морфогенез, дифференцировка и выживание. S1P определен как регулятор различных клеточных процессов, включая передачу сигнала в нейронах, тонус сосудов, заживление ран, экстравазацию иммунных клеток, репродукцию и функцию сердечно-сосудистой системы [16]. Изменения эндогенных уровней S1P в этих системах может вызывать некоторые патофизиологические состояния, в том числе воспаление, ангиогенез, заболевание сердца, астму и аутоиммунные заболевания [64]. Современный подход к лечению различных заболеваний и нарушений, включая сердечно-сосудистые заболевания, цереброваскулярные заболевания и различные злокачественные опухоли, включает снижение уровня доступного S1P, отдельно или в сочетании с другими способами лечения. Невропатологам хорошо известен S1P, поскольку они используют блокатор рецепторов S1P, пропрепарат FTY720 (Финголимод), чтобы ограничить миграцию лейкоцитов в ЦНС при лечении рассеянного склероза [30].

Липоксины, резольвины, протектины

Разрешение острого воспаления — процесс, который протекает в воспаленных тканях, возвращая их к гомеостазу. Разрешение воспаления считалось пассивным процессом, однако появились доказательства, что разрешение активно организуется при участии различных клеток и эндогенных медиаторов. Среди них липидные медиаторы: липоксины, резольвины, протектины и недавно найденные марезины [4]. Эти медиаторы противостоят чрезмерно острому воспалению и стимулируют молекулярные и клеточные события, которые определяют разрешение воспаления.

Липоксины

Короткоживущие неклассические эйкозаноиды образуются при ферментативной обработке арахидоновой кислоты (ω -6 жирной кислоты). В настоящее время определены два липоксина: липоксин A4 (LXA4) и липоксин B4 (LXB4). Оба обладают иммуномодуляторными и противовоспалительными свойствами. В их производстве ключевую роль играют трансклеточные механизмы биосинтеза (эпителий/лейкоцит, лейкоцит/

лейкоцит). Липоксины также производятся в сосудистом русле во время взаимодействий тромбоцит/лейкоцит, в которых промежуточное звено биосинтеза лейкотриен А₄, производимый в лейкоцитах, преобразуется в липоксины ферментом тромбоцитов 12 LOX.

Резольвины

Члены семейства метаболитов полигидросилированных ω -3 жирных полиненасыщенных кислот, называемые «специализированными прорезольвиновыми медиаторами» (СПМ). Резольвины — дигидрокси- или тригидроксиметаболиты ω -3 жирных полиненасыщенных кислот: эйкозапентаеновой (ЭПК) и докозагексаеновой (ДГК). Резольвины подразделяются на резольвины Е-серии (РЕ1 и РЕ2 образуются из ЭПК) и Д-серии (образуются из ДГК). Резольвины этих классов образуются при ингибировании циклооксигеназы аспирином [4].

Кроме резольвинов, к СПМ относятся ма-резины и протектин. Все они формируются во время поздних стадий воспалительных ответов как ключевые медиаторы разрешения этих ответов. Возможно, что противовоспалительные эффекты диетических омега-3 жирных кислот, содержащихся в рыбьем жире, связаны с их трансформацией в резольвины [48, 60].

Липоксины и резольвины, взаимодействуя с рецепторами, сопряженными G-белками на различных типах клеток, стимулируют макрофаги к нефлогистическому фагоцитозу, увеличению продукции противовоспалительных цитокинов и уменьшению образования провоспалительных цитокинов в макрофагах, нейтрофилах, эндотелиальных и дендритных клетках. Липоксины и резольвины также стимулируют в эндотелии производство окиси азота (NO) и вазопротективного простагличина (PGI₂). Степень участия тромбоцитов в синтезе противовоспалительных медиаторов недостаточно изучена, но тот факт, что их продукция связана с приемом аспирина, предполагает, что тромбоциты — значимый источник этих медиаторов.

Заключение

Тромбоциты — мелкие безъядерные клетки крови, до недавнего времени расценивались в основном как регуляторы гемостаза, но должного внимания их участию в организации и регуляции процесса воспаления не уделялось. Подобно клеткам иммунной системы, тромбоциты активируются многими эндогенными лигандами, высвобождаемыми стрессированными и поврежденными клетками, компонентами бактерий. При этом активация тромбоцитов приводит не только к инициации каскада коагуляции, но и определяет их адгезию к эндотелию, компонентам внеклеточного матрикса и клеткам иммунной системы. Индукции воспаления тромбоциты способствуют путем высвобождения провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-1 β , TNF α), различных хемокинов и липидных медиаторов. Тесное взаимодействие тромбоцитов с клетками эндотелия способствует экстравазации клеток иммунной системы и их миграции к очагу воспаления. Кроме того, тромбоциты являются источником ферментов, дополняющих возможности нейтрофилов при производстве липидных противовоспалительных медиаторов, позволяющих перейти к процессам восстановления ткани после острой фазы воспаления. Блокирование хронической активации тромбоцитов при атеросклеротическом повреждении артерий антитромботическими препаратами (аспирин и клопидогрел) стало неотъемлемым компонентом патогенетически обоснованной терапии этого заболевания, а снижение смертности и увеличение продолжительности жизни при их использовании в значительной степени связывают с противовоспалительными эффектами, реализуемыми при взаимодействии этих препаратов с тромбоцитами. Возможность управления активностью воспаления путем модуляции активности тромбоцитов, вероятно, станет распространенным подходом при лечении широкого ряда заболеваний, связанных с хроническим воспалением, в частности нейровоспалением. Роли тромбоцитов в организации и модуляции иммунного ответа посвящена вторая часть данного обзора.

Список литературы / References

1. Алейникова Т.Л. Биохимия: Учебник для вузов. Под ред. Е.С. Северина. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2003. 779 с. [Aleynikova T.L. Biochemistry: Textbook for high schools. Ed. E.S. Severin]. Moscow: GEOTAR-Media, 2003. 779 p.
2. Воробьева И.И. Современные методы оценки функции тромбоцитов и их клиническое значение у больных с острым коронарным синдромом // Креативная кардиология, 2012. № 1. С. 50-63. [Vorobyova I.I. Modern methods of evaluation of platelet function and their clinical significance in patients with acute coronary syndrome. *Kreativnaya kardiologiya = Creative Cardiology*, 2012, Vol. 6, no. 1, pp. 50-63. (In Russ.)]
3. Гринштейн Ю.И., Косинова А.А., Гринштейн И.Ю. Контроль антитромбоцитарной терапии: кризис доверия или поиск новых решений // Рациональная фармакотерапия в кардиологии, 2013. Т. 9, № 6.

C. 682-689. [Grinshtein Yu.I., Kosinova A.A., Grinshtein I.Yu. Antiplatelet therapy control: credibility gap or search for new decisions? *Ratsionalnaya farmakoterapiya v kardiologii* = *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*, 2013, Vol. 9, no 6, pp. 682-689. (In Russ.)]

4. Куликов В.А., Гребенников И.Н. Резольвины, протектины и марезины – новые медиаторы воспаления // Вестник ВГМУ, 2012. Т. 11, № 1. С. 25-30. [Kulikov V.A., Grebennikov I.N. Resolvins, protectins and maresins as new mediators of an inflammation. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* = *Bulletin of Vitebsk State Medical University* 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 25-30. (In Russ.)]

5. Andrews R.K., Gardiner E.E., Shen Y., Whisstock J.C., Berndt M.C. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2003, Vol. 35, pp. 1170-1174.

6. Aupaix K., Hugel B., Martin T., Bischoff P., Lill H., Pasquali J.L., Freyssinet J.M. The significance of shed membrane particles during programmed cell death *in vitro*, and *in vivo*, in HIV 1 infection. *J. Clin. Invest.*, 1997, Vol. 99, pp. 1546-1554.

7. Bertozzi C.C., Schmaier A.A., Mericko P., Hess P.R., Zou Z., Chen M., Chen C-Y., Xu B., Lu M-M., Zhou D., Sebzdza E., Santore M.T., Merianos D.J., Stadtfeld M., Flake A.W., Graf T., Skoda R., Maltzman J.S., Koretzky G.A., Kahn M.L. Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood*, 2010, Vol. 116, pp. 661-670.

8. Bizzozero G. Sur un nouvel élément morphologique du sang chez les mammifères et sur son importance dans la thrombose et dans la coagulation. *Archives Italiennes de Biologie*, 1882, Vol. 1, pp. 1-4.

9. Boilard E., Nigrovic P.A., Larabee K., Watts G.F., Coblyn J.S., Weinblatt M.E., Massarotti E.M., Remold-O'Donnell E., Farndale R.W., Ware J., Lee D.M. Platelets amplify inflammation in arthritis *via* collagen-dependent microparticle production. *Science*, 2010, Vol. 327, pp. 580-583.

10. Bozza F.A., Shah A.M., Weyrich A.S., Zimmerman G.A. Amicus or adversary: Platelets in lung biology, acute injury, and inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2009, Vol. 40, no. 2, pp. 123-134.

11. Brown G.T., McIntyre T.M. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1 β -rich microparticles. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, pp. 5489-5496.

12. Choi J.W., Herr D.R., Noguchi K., Yung Y.C., Lee C.W., Mutoh T., Lin M.E., Teo S.T., Park K.E., Mosley A.N., Chun J. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2010, Vol. 50, pp. 157-186.

13. Collier B.S., Seligsohn U., West S.M., Scudder L.E., Norton K.J. Platelet fibrinogen and vitronectin in Glanzmann thrombasthenia: evidence consistent with specific roles for glycoprotein IIb/IIIa and α v β 3 integrins in platelet protein trafficking. *Blood*, 1991, Vol. 78, pp. 2603-2610.

14. Dahm F., Nocito A., Bielawska A., Lang K.S., Georgiev P., Asmis L.M., Bielawski J., Madon J., Hannun Y.A., Clavien P.A. Distribution and dynamic changes of sphingolipids in blood in response to platelet activation. *J. Thromb. Haemost.*, 2006, Vol. 4, pp. 2704-2709.

15. Dean W.L., Lee M.J., Cummins T.D., Schultz D.J., Powell D. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *J. Thromb. Haemost.*, 2009, Vol. 102, no. 4, pp. 711-718.

16. English D., Welch Z., Kovala A.T., Harvey K., Volpert O.V., Brindley D.N., Garcia J.G. Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J.*, 2000, Vol. 14, pp. 2255-2265.

17. Farooqui A.A., Ong W.Y., Horrocks L.A. Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharm. Rev.*, 2006, Vol. 58, pp. 591-620.

18. Forlow S.B., McEver R.P., Nollert M.U. Leukocyte leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*, 2000, Vol. 95, pp. 1317-1323.

19. Garcia B.A., Smalley D.M., Cho H., Shabanowitz J., Ley K., Hunt D.F. The platelet microparticle proteome. *J. Proteome Res.*, 2005, Vol. 4, no. 5, pp. 1516-1521.

20. Gyulkhandanyan A.V., Mutlu A., Freedman J., Leytin V. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J. Thromb. Thrombolysis*, 2012, Vol. 33, no. 4, pp. 397-411.

21. Haaland H.D., Holmsen H. Potentiation by adrenaline of agonist-induced responses in normal human platelets *in vitro*. *Platelets*, 2011, Vol. 22, no. 5, pp. 328-337.

22. Hartwig J., Italiano J. The birth of the platelet. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, no. 1, pp. 1580-1610.

23. Hastings J.W., Sailer M., Johnson K., Roy K.L., Vederas J.C., Stiles M.E. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.*, 1991, Vol. 173, pp. 7491-7500.

24. Hechler B., Gachet C. Purinergic receptors in thrombosis and inflammation. *arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2015, Vol. 35, no. 11, pp. 2307-2315.

25. Israels S.J., McMillan-Ward E.M. CD63 modulates spreading and tyrosine phosphorylation of platelets on immobilized fibrinogen. *J. Thromb. Haemost.*, 2005, no. 3, pp. 311-318.

26. Italiano J.E., Battinelli E.M. Selective sorting of α -granule proteins. *J. Thromb. Haemost.*, 2009, Vol. 7, no. 1, pp. 173-176.

27. Italiano J.E., Shivdasani R.A. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, no. 1, pp. 1174-1182.

28. James-Krack M.R., Sexe R.B., Shukla S.D. Picomolar platelet activating factor mobilizes Ca to change platelet shape without activating phospholipase C or protein kinase C: Simultaneous fluorometric measurements of intracellular free Ca concentration and aggregation. *J. Pharm. Exper. Ther.*, 1994, Vol. 271, pp. 824-831.

29. Kahn M.L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M.J., Ishihara H., Coughlin S.R. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest.*, 1999, Vol. 103, pp. 879-887.
30. Kappos L., Antel J., Comi G., Montalban X., O'Connor P., Polman C.H., Haas T., Korn A.A., Karlsson G., Radue E.W. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis [with editorial, p1088-91]. *New Engl. J. Med.*, 2006, Vol. 355, pp. 1124-1140.
31. Kenney D.M., Linck R.W. The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band. *J. Cell Sci.*, 1985, Vol. 78, pp. 1-22.
32. Kubera M., Maes M., Kenis G., Kim Y.K., Lason W. Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of tumor necrosis factor and interleukin-6. *Psychiatry Res.*, 2005, Vol. 134, pp. 251-258.
33. Lam F.W., Vijayan K.V., Rumbaut R.E. Platelets and their interactions with other immune cells. *Compr. Physiol.*, 2015, Vol. 15, no. 3, pp. 1265-1280.
34. Lannan K.L., Sahler J., Kim N., Spinelli S.L., Maggirwar S.B., Garraud O., Cognasse F., Blumberg N., Phipps R.P. Breaking the mold: transcription factors in the anucleate platelet and platelet-derived microparticles. *Front Immunol.*, 2015, no. 6, pp. 48-60.
35. Lefrançois E., Ortiz-Muñoz G., Caudrillier A., Mallavia B., Liu F., Sayah D.M., Thornton E.E., Headley M.B., David T., Coughlin S.R., Krummel M.F., Leavitt A.D., Passequé E., Looney M.R. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*, 2017, Vol. 544, no. 7648, pp. 105-109.
36. Lin C.I., Chen C.N., Lee H. Lysophospholipids increase IL-8 and MCP-1 expression in human umbilical cord vein endothelial cells through as IL-1-dependent mechanisms. *J. Cell Biochem.*, 2006, Vol. 99, pp. 1216-1232.
37. Loria F., Petrosino S., Mestre L., Spagnolo A., Correa F., Hernangomez M., Guaza C., DiMarzo V., Docagne F. Study of the regulation of the endocannabinoid system in a virus model of multiple sclerosis reveals a therapeutic effect of palmitoyl ethanolamine. *Eur. J. Neurosci.*, 2008, Vol. 28, pp. 633-642.
38. Maynard D.M., Heijnen H.F., Horne M.K., White J.G., Gahl W.A. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J. Thromb. Haemost.*, 2007, Vol. 5, no. 9, pp. 1945-1955.
39. O'Flaherty J.T., Wykle R.L., Miller C.H., Lewis J.C., Waite M., Bass D.A., McCall C.E., DeChatelet L.R. 1-O-alkyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholines. A novel class of neutrophil stimulants. *Am. J. Pathol.*, 1981, Vol. 103, pp. 70-79.
40. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein coupled receptors. *Circ. Res.*, 2006, Vol. 99, pp. 1293-1304.
41. Pacher P., Bátkai S., Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.*, 2006, Vol. 58, no. 3, pp. 389-462.
42. Piotrowicz R.S., Orzechowski R.P., Nugent D.J., Yamada K.Y., Kunicki T.J. Glycoprotein Ic-IIa functions as an activation-independent fibronectin receptor on human platelets. *J. Cell Biol.*, 1988, Vol. 106, pp. 1359-1364.
43. Pytela R., Pierschbacher M.D., Ruoslahti E. A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, Vol. 82, pp. 5766-5770.
44. Rendu F., Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 2001, Vol. 12, no. 5, pp. 261-273.
45. Romo G.M., Dong J.F., Schade A.J., Gardiner E.E., Kansas G.S., Li C.Q., McIntire L.V., Berndt M.C., López J.A. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J. Experim. Med.*, 1999, Vol. 190, pp. 803-814.
46. Rumbaut R.E., Thiagarajan P. Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010, pp. 1-75.
47. Sanson E., Trautwein C. Hepatocytes clear platelets and are key regulators of disseminated intravascular coagulation during sepsis. *J. Hepatology*, 2009, Vol. 50, pp. 1060-1064.
48. Shinohara M., Mirakaj V., Serhan C.N. Functional metabolomics reveals novel active products in the DHA metabolome. *Front. Immunol.*, 2012, no. 3, pp. 81-90.
49. Skop B.P., Brown T.M. Potential vascular and bleeding complications of treatment with selective serotonin reuptake inhibitors. *Psychosomatics*, 1996, Vol. 37, pp. 12-16.
50. Slichter S.J. Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients. *Transfus. Med. Rev.*, 2004, Vol. 18, no. 3, pp. 153-167.
51. Smyth S.S., Cheng H.Y., Miriyala S., Panchatcharam M., Morris A.J. Role of lysophosphatidic acid in cardiovascular physiology and disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2008, Vol. 1781, pp. 563-570.
52. Sonnenberg A., Modderman P.W., Hogervorst F. Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature*, 1988, Vol. 336, pp. 487-489.
53. Staatz W.D., Rajpara S.M., Wayner E.A., Carter W.G., Santoro S.A. The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen. *J. Cell Biol.*, 1989, Vol. 108, pp. 1917-1924.
54. Stimler N.P., Bloor C.M., Hugli T.E., Wykle R.L., McCall C.E., O'Flaherty J.T. Anaphylactic action of platelet activating factor. *Am. J. Pathol.*, 1981, Vol. 105, pp. 64-69.
55. von Hundelshausen Ph., Weber Ch. Platelets as immune cells. Bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circul. Res.*, 2007, Vol. 100, pp. 27-40.

56. Wardlaw A.J., Moqbel R., Cromwell O., Kay A.B. Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J. Clin. Invest.*, 1986, Vol. 78, pp. 1701-1706.
57. Warkentin T.E., Aird W.C., Rand J.H. Platelet-endothelial interactions: sepsis, HIT, and antiphospholipid syndrome. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, 2003, pp. 497-519.
58. Warshaw A.L., Laster L., Shulman N.R. Protein synthesis by human platelets. *J. Biol. Chem.*, 1967, Vol. 242, no. 9, pp. 2094-2097.
59. Weerheim A.M., Kolb A.M., Sturk A., Nieuwland R. Phospholipid composition of cell derived microparticles determined by one dimensional high performance thin layer chromatography. *Anal. Biochem.*, 2002, Vol. 302, pp. 191-198.
60. Weylandt K.H. Docosapentaenoic acid derived metabolites and mediators – the new world of lipid mediator medicine in a nutshell. *Eur. J. Pharmacol.*, 2016, Vol. 785, no. 15, pp. 108-115.
61. Weyrich A.S., Zimmerman G.A. Platelets in lung biology. *Annu. Rev. Physiol.*, 2013, Vol. 75, pp. 569-591.
62. Weyrich A.S., Schwertz H., Kraiss L.W., Zimmerman G.A. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J. Thromb. Haemost.*, 2009, Vol. 7, no. 2, pp. 241-246.
63. White J.G. Platelet structure. In: Michelson A.D., editor. *Platelets*. Academic Press, 2007, pp. 45-73.
64. Yatomi Y. Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, Vol. 1780, pp. 606-611.
65. Yung Y.C., Stoddard N.C., Chun J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J. Lipid Res.*, 2014, Vol. 55, no. 7, pp. 1192-2014.

Авторы:

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

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

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

Якутсені П.П. — д.б.н., главный научный сотрудник Центра перспективных исследований ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

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

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

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

Yakutseni P.P., PhD, MD (Biology), Chief Research Associate, Center for Advanced Studies, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 28.12.2017
Принята к печати 17.01.2018

Received 28.12.2017
Accepted 17.01.2018

РОЛЬ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ-АЛЬФА В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ И ЕГО ЗНАЧИМОСТЬ В РАЗВИТИИ АНТИЦИТОКИНОВОЙ ТЕРАПИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Воронина Е.В.¹, Лобанова Н.В.¹, Яхин И.Р.², Романова Н.А.²,
Серегин Ю.А.¹

¹ ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра „Курчатовский институт“», Москва, Россия

² ООО «ФАРМАПАРК», Москва, Россия

Резюме. Фактор некроза опухоли-α (ранее известный как кахектин) был отмечен как феномен в момент его открытия и до сих пор сохраняет свои позиции в качестве одной из наиболее интенсивно исследуемых молекул в области биомедицины. TNFα рассматривается как прототип семейства молекул, с одной стороны, играющих важную роль в регуляции нормальной дифференцировки, роста и метаболизма различных клеток, а с другой — выступающих в роли медиаторов воспалительных процессов при различных заболеваниях человека. Интенсивные междисциплинарные исследования биологической роли и терапевтического применения TNFα привели к пониманию его полифункциональности и установлению его ведущей роли в иммунопатогенезе целого ряда заболеваний, что явилось основанием для разработки «антицитокиновой» терапии моноклональными антителами с высокой специфичностью.

Цель — осуществить поиск литературы в области изучения структуры и свойств TNFα, а также его роли в норме, патологии и терапии

Материалы и методы: поиск литературы через научные поисковые системы и базы данных.

Рассмотрена роль фактора некроза опухоли-α (TNFα) в организме человека в норме и в условиях развития патологий. Описаны возможные TNF-индуцируемые сигнальные пути, а также существующие ингибиторы на основе моноклональных антител для лечения ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний.

Несмотря на колоссальные знания, накопленные в области изучения биологических функций TNFα в норме и патологии, интенсивные междисциплинарные исследования этого феномена в организме человека являются актуальными и до сих пор.

Несомненные успехи в понимании многозначности TNFα как участника в регуляции различных физиологических и патологических процессов в организме человека послужили причиной внедре-

Адрес для переписки:

Воронина Екатерина Владимировна
ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра „Курчатовский институт“»
117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1.
Тел.: 8 (495) 411-85-94 (доб. 2261).
Факс: 8 (495) 644-37-97.
E-mail: voronina-ek@bk.ru

Address for correspondence:

Voronina Ekaterina V.
State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, National Research Center "Kurchatov Institute"
117545, Russian Federation, Moscow, 1st Dorozhniy pr., 1.
Phone: 7 (495) 411-85-94 (add. 2261).
Fax: 7 (495) 644-37-97.
E-mail: voronina-ek@bk.ru

Образец цитирования:

Е.В. Воронина, Н.В. Лобанова, И.Р. Яхин, Н.А. Романова, Ю.А. Серегин «Роль фактора некроза опухолей-альфа в иммунопатогенезе заболеваний различной этиологии и его значимость в развитии антицитокиновой терапии моноклональными антителами» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 797-806.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-797-806
© Воронина Е.В. и соавт., 2018

For citation:

E.V. Voronina, N.V. Lobanova, I.R. Yakhin, N.A. Romanova, Yu.A. Seregin "Role of tumor necrosis factor alpha in immune pathogenesis of different diseases and its significance for evolving anticytokine therapy with monoclonal antibodies", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 797-806.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-797-806
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-797-806

ния биологических препаратов-антагонистов фактора некроза опухолей на основе моноклональных антител, которые оказались высокоэффективными при ревматоидном артрите и являются действенными безопасными лекарственными средствами.

Ключевые слова: фактор некроза опухоли- α , моноклональные антитела, инфликсимаб, этанерцепт, адалимумаб, голимумаб, цертолизумаб

ROLE OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA IN IMMUNE PATHOGENESIS OF DIFFERENT DISEASES AND ITS SIGNIFICANCE FOR EVOLVING ANTICYTOKINE THERAPY WITH MONOCLONAL ANTIBODIES

Voronina E.V.^a, Lobanova N.V.^a, Yakhin I.R.^b, Romanova N.A.^b, Seregin Yu.A.^a

^a State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russian Federation

^b PHARMAPARK LLC, Moscow, Russian Federation

Abstract. Tumor necrosis factor alpha (generally known as cachectin) was noted as a hallmark since the time of its discovery and still retains its position as one of the most intensely studied molecules in the field of biomedicine. TNF α is considered a prototype molecule of the family which, on the one hand, plays an important role in regulating normal differentiation, growth and metabolism of various cells, and on the other hand, acts as mediator of inflammatory processes in various human diseases. Intensive interdisciplinary studies of TNF α biological role and therapeutic use have led to understanding of its polyfunctional effects and establishment of its leading role in immune pathogenesis of diseases, which was the basis for the development of "anticytokine" therapy with highly specific monoclonal antibodies. We aimed for a search of literature in the field of studying TNF α structure and properties, its role under normal conditions, in different diseases and therapy. The literature studies were performed using scientific searching systems and databases. The results are as follows: the role of tumor necrosis factor- α (TNF α) in human body in normal and pathological state was considered. Possible TNF-inducible signaling pathways, as well as existing inhibitors based on monoclonal antibodies for the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases are described. In conclusion, intensive interdisciplinary studies of TNF α biological functions in normal state and diseases are still relevant today, despite huge knowledge gained on this subject.

Undisputable progress in understanding the functional multiplicity of TNF α as a participant in regulation of various physiological and pathological processes in the human body has promoted development of biological agents, i.e., the tumor necrosis factor inhibitors based on monoclonal antibodies, which proved to be highly effective drugs for treatment of rheumatoid arthritis and other diseases, thus being effective and safe biopharmaceuticals.

Keywords: tumor necrosis factor alpha, monoclonal antibodies, infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab, cerolizumab

Введение

В настоящем обзоре рассмотрена роль фактора некроза опухолей- α (TNF α) в организме человека в норме и в условиях развития патологий. Описаны возможные TNF-индуцируемые сигнальные пути, а также существующие ингибиторы на основе моноклональных антител для лечения ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний.

Фактор некроза опухоли- α (ранее известный как кахектин) был отмечен как феномен в мо-

мент его открытия и до сих пор сохраняет свои позиции в качестве одной из наиболее интенсивно исследуемых молекул в области биомедицины [25, 48, 52, 60].

Первоначально TNF α идентифицировали как фактор, способный вызывать *in vivo* геморрагический некроз некоторых опухолевых клеток в условиях введения токсина на основе бактерий *Streptococcus pyogenes* и *Serratia marcescens*. Данный токсин был разработан Уильямом Коли после установления взаимосвязи между перенесенными инфекциями, вызванными указанными

выше бактериями, и регрессией раковых опухолей у пациентов [34, 60].

Интенсивные междисциплинарные исследования биологической роли и терапевтического применения TNF α привели к пониманию его полифункциональности. Установление ведущей роли TNF α в иммунопатогенезе целого ряда заболеваний явилось основанием для разработки «антицитокиновой» терапии моноклональными антителами (мАТ) с высокой специфичностью. Это позволило существенно снизить риск генерализованной иммуносупрессии, которая характерна для многих лекарственных средств, в первую очередь глюкокортикоидов и цитотоксиков [13]. Наконец, изучение клинических и иммунологических эффектов «антицитокиновых» мАТ предоставило возможность получить принципиально новые факты о роли тех или иных воспалительных медиаторов в патогенезе заболеваний.

Структура и функции фактора некроза опухоли- α

TNF α рассматривается как прототип семейства молекул, с одной стороны, играющих важную роль в регуляции нормальной дифференцировки, роста и метаболизма различных клеток, а с другой — выступающих в роли медиаторов воспалительных процессов при различных заболеваниях человека [13, 14, 32, 48]. В естественных условиях TNF α вырабатывается многими типами клеток: активированными макрофагами, В-лимфоцитами, Т-лимфоцитами, NK-клетками, полиморфноядерными лейкоцитами, тучными клетками и базофилами, фибробластами, клетками эндотелия сосудов и др. [14, 48] и является важнейшим плейотропным цитокином, регулирующим множество аспектов развития, функционирования и поддержания иммунной системы.

TNF α экспрессируется в качестве трансмембранного белка с молекулярной массой 26 кДа (233 аминокислоты) [32, 44, 48, 52]. Под действием специфического TNF-конвертирующего фермента ADAM17 (известного также как TACE) мембраносвязанный фрагмент отщепляется, и образуется растворимый TNF α с молекулярной массой 17 кДа (157 аминокислот) [44].

В результате связывания TNF α со специфическими мембранными рецепторами массой 55 кДа (типа I, или CD120a, TNFRSF1A, TNFR1) и 75 кДа (типа II, или CD120b, TNFRSF1B, TNFR2) на молекулярном уровне запускаются сигнальные каскады с участием внутриклеточных комплексов I, IIa, IIb, IIc [2], что приводит к активации факторов транскрипции, которые, в свою очередь, регулируют активность нескольких генов, кодирующих синтез провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления,

а также вызывают программируемую гибель клеток [2, 48]. Рецептор TNFR1, который содержит DD (death domain), разнороден и экспрессируется на всех изученных типах клеток организма, что, в зависимости от этого, предполагает огромное разнообразие его функций в организме человека. В противоположность этому показано, что экспрессия TNFR2 ограничена клетками иммунной системы, эндотелиальными и нервными клетками [2].

Взаимодействие TNF α с рецепторами активирует универсальный фактор транскрипции NF- κ B, группу мультифункциональных внутриклеточных сигнальных путей с участием митоген-активируемых протеинкиназ MAPKs (complex I через TNFR1 и TNFR2) и семейство протеинкиназ В человека АКТ, контролирующих экспрессию генов иммунного ответа, апоптоз, пролиферацию, регуляцию клеточного цикла, ангиогенез и другие процессы [48]. Когда TNF α связывается непосредственно с TNFR1 на поверхности клетки-мишени, он мобилизует TNFR-ассоциированный белок домена смерти (TRADD) [26, 39, 48]. В дальнейшем сигнал передается на Fas-ассоциированный белок с доменом смерти (FADD), который последовательно активирует каспазу-8 и каспазу-3 и вызывает апоптоз (complex IIa и IIb) [2, 39, 48]. Кроме того, TNF α активирует псевдокиназу MLKL (complex IIc через TNFR1), играющую важную роль в развитии некроптоза [48].

Таким образом, установлено, что TNF α , являясь ключевым цитокином иммунной системы, в норме выполняет гомеостатическую функцию и регулирует множество биологических процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, апоптоз различных клеток, формирование структуры различных органов и тканей, включая вторичные лимфоидные органы, ремиелинизацию нейронов, ремоделирование сердца, регенерацию хрящевой ткани, а также толеризацию (десенсибилизацию) макрофагов и ингибирование онкогенеза [2, 14, 48]. Его провоспалительные эффекты обеспечиваются за счет NF- κ B регулируемых белков, таких как интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8), интерлейкин-18 (IL-18), хемокины, индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), циклооксигеназы-2 (COX-2) и 5-липоксигеназы (5-LOX) — всех основных медиаторов воспаления. Более того, TNF α может индуцировать экспрессию самого себя через активацию NF- κ B [2, 26].

Значительное повышение уровня экспрессии TNF α в очаге воспаления, а в ряде случаев и во всем организме, приводит к развитию аутоиммунных реакций [15, 39, 40, 48, 55, 69, 70]. Это происходит при таких заболеваниях, как ревма-

тоидный артрит (РА), анкилозирующий спондилит, псориаз, воспалительные заболевания кишечника, язвенный колит и болезнь Крона [15, 25, 69, 70]. Изучение этиологии данных состояний позволяет говорить об имеющихся сходствах в патогенетических механизмах их развития, главную роль в которых играет TNF α .

Кроме того, отмечают важную роль TNF α в современной нейроэндокринной теории развития сердечно-сосудистых заболеваний [16, 30, 43, 54, 59, 62, 73, 74]. Было отмечено, что повышение уровня этого цитокина зарегистрировано у всех больных с сердечной недостаточностью и коррелирует с тяжестью заболевания [16, 43, 48, 62]. Особенно большой интерес представляют данные о том, что патологическое действие TNF α может быть связано с его локальной экспрессией в миокарде. Однако механизмы, лежащие в основе TNF-индуцируемой патологии миокарда, весьма многообразны [16, 30]. Например, в исследованиях *in vivo* у крыс, которым в течение двух недель вводили низкие дозы TNF α (сопоставимые с уровнем TNF α в сыворотках больных с сердечной недостаточностью), развиваются прогрессирующее ослабление сократимости миокарда и ремоделирование сердечной мышцы, проявляющееся в дегенерации фибриллярного коллагена, гипертрофии кардиомиоцитов, дилатации и уменьшении толщины левого желудочка [30].

В исследованиях, опубликованных в 2013 году, была выявлена гиперэкспрессия TNF α в узлах контрактуры при развитии и прогрессировании болезни Дюпюитрена (ладонного фиброматоза), в результате которого происходит избыточное развитие соединительной ткани в области сухожилий сгибателей одного или нескольких пальцев, что приводит к рубцовому перерождению и стойкому нарушению функции кисти [48, 71]. Доказательство участия TNF в развитии болезни Дюпюитрена предполагает, что его нейтрализация при местном применении ингибиторов может стать надеждой на успешное устранение этого заболевания.

TNF также представляет интерес в качестве мишени для фармакологического воздействия в случае таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и рассеянный склероз [22, 48, 56, 63]. В последнее время все больший интерес вызывает роль TNF α в развитии и формировании центральной нервной системы, в синаптической передаче и нейрогенезе. Повышение уровня TNF α в плазме крови и ликворе у больных рассеянным склерозом считают важным патогенетическим феноменом процессов аутоиммунного воспаления и нейродегенерации в ЦНС [48].

Вместе с тем среди большого количества медиаторов воспаления отмечают особую роль TNF α в дисфункциях сосудистого эндотелия. Показано, что цитокин способствует повышению проницаемости эндотелия, накоплению нейтрофилов и макрофагов в тканях, усилению прокоагулянтных и ослаблению антикоагулянтных свойств эндотелия. TNF α может запускать сигнальные каскады, ведущие к апоптозу эндотелиальных клеток *in vitro*, что, предположительно, может усиливать прокоагулянтные свойства сосудов и усиление их проницаемости *in vivo* [12, 29].

В то же время TNF α в течение многих лет привлекает внимание исследователей, фармакологов, клиницистов в связи с его избирательной способностью тормозить рост и вызывать лизис злокачественных клеток, геморрагический некроз опухолей, активировать иммунный противоопухолевый ответ, оказывая повреждающее действие на сосуды [29, 34, 37, 45, 75].

Согласно последним данным, удалось установить немаловажную роль комплекса LUBAC (linear ubiquitin assembly complex) в формировании основных сигнальных путей, индуцируемых TNF α , оценить значение комплекса Икк, RIPK3 (рецептора протеинкиназы 3) и псевдокиназы MLKL в развитии некроптоза, индуцируемого TNF при ревматоидном артрите, выявить способность TNF вызывать эпигенетические изменения, открыть ранее неизвестные механизмы TNF-индуцируемых факторов транскрипции в рамках хронического воспаления и улучшить понимание гомеостатической функции TNF α [48].

Моноклональные антитела к TNF α в лечении аутоиммунных заболеваний

Установление роли TNF α в регуляции ряда физиологических процессов в организме человека и иммунопатогенезе заболеваний послужило основанием для разработки «антицитокиновой» терапии, а именно создания группы препаратов на основе моноклональных антител.

В настоящее время на основании множества данных подтверждено, что ингибиторы фактора некроза опухолей на основе моноклональных антител являются высокоэффективными и безопасными препаратами для терапии ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний. С внедрением в протоколы лечения биологических препаратов-антагонистов TNF появилась новая надежда для пациентов с РА, у которых ранее нельзя было контролировать воспаление, предотвратить разрушение сустава или прогрессирование инвалидности.

В настоящее время на мировом фармацевтическом рынке существует 5 основных блокаторов

TNF α на основе МАТ: инфликсимаб, этанерцепт, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб пэгол [31, 36].

Моноклональное антитело инфликсимаб является первым препаратом из группы ингибиторов TNF α . В связи с тем, что его коммерческое применение началось в 1998 г., на настоящий момент имеется огромный опыт использования этого МАТ в лечении ревматоидного артрита и других заболеваний [53]. Было показано, что инфликсимаб подавляет патологические эффекты TNF α посредством специфического связывания и нейтрализации как свободного, так и трансмембранного TNF, а также лизиса TNF-продуцирующих клеток. В России с 2001 г. инфликсимаб первоначально был зарегистрирован для лечения болезни Крона и ревматоидного артрита [9, 17]. В последующем спектр его показаний был расширен, и в настоящее время его эффективность показана в лечении серонегативных спондилоартропатий (болезни Бехтерева и псориатической артропатии) [28, 51], системных васкулитах [72], ювенильном артрите [49], системной красной волчанке [57] и дермато- и полимиозите [42, 68], в лечении вторичного амилоидоза [61].

Этанерцепт занимает особое место в истории применения рекомбинатных белков в клинической практике, поскольку он является первым генно-инженерным биологическим препаратом, полностью состоящим из человеческого белка [1, 6, 7, 18, 20, 21, 22, 23]. Этот факт служит его главным преимуществом перед применением инфликсимаба, который на 25% состоит из мышьяной аминокислотной последовательности. Кроме того, комбинированная конструкция из человеческого рецептора фактора некроза опухоли и Fc-фрагмента (CH2 и CH3 области) человеческого IgG1 в 5-8 раз увеличивает период полувыведения данного препарата [1]. Следует также заметить, что этанерцепт может применяться в качестве монотерапии, а инфликсимаб — исключительно в сочетании с метотрексатом [7, 18].

Сегодня этанерцепт эффективно применяется при лечении умеренного и тяжелого активного полиартикулярного ювенильного идиопатического артрита у пациентов в возрасте 2 лет и старше, для уменьшения симптомов и замедления прогрессирования структурных повреждений при активном артрите и улучшения функции у пациентов с псориатическим, активным анкилозирующим спондилитом, а также для лечения взрослых пациентов в возрасте 18 лет и старше с хроническим умеренным или тяжелым псориазом с наличием бляшек, которым показана системная терапия или фототерапия [69].

Другим представителем группы блокаторов TNF α служит МАТ адалимумаб как основной

биологический препарат для лечения РА и других наиболее распространенных воспалительных артропатий в настоящее время [11]. Адалимумаб разрешен для применения в США (2002 г.), странах Западной Европы (2003 г.) и в России (2006 г.) [8]. Основное показание для его применения, как и других ингибиторов TNF α — тяжелый или умеренно тяжелый РА, при котором недостаточно эффективны один или более базисные противовоспалительные препараты [8, 11, 18].

Адалимумаб характеризуется следующими чертами, отличающими его от предыдущих блокаторов TNF α [11]. Это полностью человеческое антитело к TNF α , что обуславливает его сниженную иммуногенность. Преимущество этого МАТ заключается в возможности его самостоятельного применения больными в амбулаторных условиях — метод введения и режим дозирования удобны для большинства пациентов, а также в его широком спектре применения против воспалительных заболеваний разной природы, таких как ревматоидный артрит [33], псориаз [35], болезнь Крона [67] и др. Важно отметить, что в 2016 г. адалимумаб получил свое десятое назначение для лечения неинфекционных увеитов [47]. Допустимо применение адалимумаба как в комбинации с метотрексатом и другими базисными противовоспалительными препаратами (БПВП), так и в монотерапии [11]. Для адалимумаба характерна стабильность эффекта при многолетнем применении. В мире имеется большой положительный опыт применения адалимумаба для лечения воспалительных ревматических заболеваний, включая результаты многочисленных рандомизированных клинических исследований, при этом эффективность и безопасность лечения этим препаратом как минимум не уступает таковой для других блокаторов TNF [11, 17, 53, 69]. При его раннем назначении в комбинации с метотрексатом больные РА в два раза чаще достигают ремиссии или низкой активности заболевания, чем при раннем назначении монотерапии. Своевременное применение такой комбинации способствует длительному — не менее 10 лет — контролю заболевания [69]. Важно отметить, что в 2007 г. компании Abbott была присуждена Премия Галена (Galen Prize) за препарат Хумира как за лучший биотехнологический продукт года [11].

В доказательство эффективности МАТ адалимумаб перед другими блокаторами TNF α в 2013 г. впервые были проведены исследования, посвященные структурному анализу взаимодействия МАТ с рецепторами TNF. Было показано, что адалимумаб демонстрирует относительно более высокую аффинность наряду с инфликсимабом и этанерцептом с K_D в пределах от $7,05 \times 10^{-11}$ М

до $1,0 \times 10^{-10}$ М [46, 50], что определяет его более выраженную конкурентную биологическую активность.

Несмотря на вышеуказанное, на настоящий момент нет строгих доказательств того, что какой-либо блокатор TNF α эффективнее других препаратов этой группы и должен использоваться первым. Анализ результатов многочисленных клинических исследований свидетельствует об одинаково высокой эффективности инфликсимаба, этанерцепта и адалимумаба при лечении взрослых больных с ревматоидным артритом и детей с ювенильным ревматоидным артритом [58, 65, 69]. Они включены в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) и рекомендуются в качестве вариантов лечения у пациентов в случае неэффективности или непереносимости других БПВП, в том числе хотя бы одного из ингибиторов TNF α , что позволяет за короткий период времени значительно уменьшить выраженность клинико-лабораторных проявлений заболевания и замедлить костную деструкцию и прогрессирование инвалидности.

Следует отметить, что, согласно Распоряжению Правительства РФ от 28.12.2016 № 2885-р, в перечень ЖНВЛП для медицинского применения на 2017 год были включены два новых МАТ для нейтрализации TNF α , один из которых — не цельная молекула гуманизированного антитела к этому цитокину, а ее Fab-фрагменты, соединенные с полиэтиленгликолем — цертолизумаб пэгол [10, 19, 38, 41, 66], другой — голиумаб — полностью человеческое МАТ класса IgG1 [4, 27, 64, 76]. Обе терапевтические молекулы в ходе клинических испытаний сумели доказать свою эффективность в лечении артритов различной этиологии, а также язвенного колита [3, 24], на-

ряду с другими ингибиторами, однако являются сравнительно новыми в сфере антицитокиновой терапии на основе моноклональных антител и достаточно дорогостоящими, что ограничивает их широкое применение для лечения аутоиммунных заболеваний.

Заключение

Несмотря на колоссальные знания, накопленные в области изучения биологических функций TNF α в норме и патологии, интенсивные междисциплинарные исследования этого феномена в организме человека являются актуальными до сих пор. Определены важные направления будущих фундаментальных исследований, которые включают более глубокое понимание молекулярных механизмов TNF-индуцируемых сигнальных путей в клетке. Интригующим направлением является изучение влияния TNF на экспрессию некодирующих РНК. Кроме того, стремительное развитие современных методов секвенирования позволит прогнозировать клинический ответ и механизмы, связанные с резистентностью к анти-TNF терапии с целью повышения эффективности лечения, а возможно, и разработки альтернативных подходов.

Несомненные успехи в понимании многозначности TNF α как участника в регуляции различных физиологических и патологических процессов в организме человека послужили причиной внедрения биологических препаратов-антагонистов фактора некроза опухолей на основе моноклональных антител, которые оказались высокоэффективными при ревматоидном артрите и являются действенными безопасными лекарственными средствами.

Список литературы / References

1. Алексеева Е.И., Валиева С.И., Денисова Р.В., Бзарова Т.М. Перспективы применения растворимых рецепторов к ФНО-альфа в терапии ювенильных артритов // Вопросы современной педиатрии, 2008. Т. 7, № 5. С. 51-56. [Alekseeva E.I., Valieva S.I., Denisova R.V., Bzarova T.M. Aspects of treatment of juvenile arthritis with soluble receptors to TNF α . *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2008, Vol. 7, no. 5, pp. 51-56. (In Russ.)]
2. Барановский А.Ю., Марченко Н.В., Мительглик У.А., Райхельсон К.Л. Роль фактора некроза опухоли альфа в развитии аутоиммунной патологии печени: нерешенная проблема // Гастроэнтерология. Практическая медицина, 2014. Т. 1, № 77. С. 15-19. [Baranovsky A.Yu., Marchenko N.V., Mitelglik U.A., Raykhelson K.L. The role of alpha tumor necrosis factor in the development of autoimmune liver disease: recurring problem. *Gastroenterologiya. Prakticheskaya meditsina = Gastroenterology. Practical Medicine*, 2014, Vol. 1, no. 77, pp. 15-19. (In Russ.)]
3. Бектур К.Р., Гуляев А.Е., Шулгау З.Т., Еремекбаева Б.А., Абуова Г.Т., Нургожин Т.С. Сравнение препаратов ингибиторов фактора некроза опухолей в лечении ревматоидного артрита по фармакоэкономическим параметрам в системе здравоохранения республики Казахстан // Medicine, 2014. № 7. С. 97-102. [Bektur K.R., Gulyaev A.E., Shulgau Z.T., Ermekbaeva B.A., Abuova G.T., Nurgozhin T.S. Comparison of inhibitors to tumor necrosis factor within the framework of rheumatoid arthritis treatment according to pharmacoeconomic parameters in the Kazakhstan health care system. *Medicine*, 2014, no. 7, pp. 97-102. (In Russ.)]

4. Денисова Р.В., Алексеева Е.И. Новый блокатор ФНО-альфа – голимумаб. Обзор результатов исследований по оценке эффективности и безопасности // Вопросы современной педиатрии, 2012. Т. 11, № 4. С. 14-20. [Denisova R.V., Alekseyeva E.I. Golimumab – a new TNF α -blocker. The review of the efficacy and safety evaluation results. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2012, Vol. 11, no. 4, pp. 14-20. (In Russ.)]
5. Каде А.Х., Занин С.А., Губарева Е.А., Туровая А.Ю., Богданова Ю.А., Апсальмова С.О., Мерзлякова С.Н. Физиологические функции сосудистого эндотелия // Фундаментальные исследования, 2011. № 11. С. 611-617. [Kade A.Kh., Zanin S.A., Gubareva E.A., Turova A.Yu., Bogdanova Yu.A., Apsalyamova S.O., Merzlyakova S.N. Physiological functions vascular endothelium. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2011, no. 11, pp. 611-617. (In Russ.)]
6. Каратеев Д.Е. Этанерцепт при ревматоидном артрите // Научно-практическая ревматология, 2009. № 5. С. 53-57. [Karateev D.E. Etanercept for rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2009, no. 5, pp. 53-57. (In Russ.)]
7. Каратеев Д.Е., Лучихина Е.Л. Современные принципы лечения ревматоидного артрита: акцент на раннюю агрессивную терапию // Эффективная фармакотерапия, ревматология, 2011. № 1. С. 12-17. [Karateev D.E., Luchikhina E.L. Modern principles of rheumatoid arthritis therapy: focus on early aggressive therapy. *Effektivnaya farmakoterapiya, revmatologiya = Effective Pharmacotherapy, Rheumatology*, 2011, no. 1, pp. 12-17. (In Russ.)]
8. Каратеев Д.Е., Насонов Е.Л., Лучихина Е.Л., Мазуров В.И., Салихов И.Г., Шмидт Е.И., Шостак Н.А. Эффективность и безопасность терапии адалимумабом у больных активным ревматоидным артритом с резистентностью к стандартной терапии: результаты Российского национального исследования // Научно-практическая ревматология, 2012. № 51 (приложение 2). С. 20-25. [Karateev D.E., Nasonov E.L., Luchikhina E.L., Mazurov V.I., Salikhov I.G., Shmidt E.I., Shostak N.A. Efficacy and safety of adalimumab therapy for patients with active rheumatoid arthritis who are resistant to standard therapy: the results of the Russian National Study. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2012, no. 51, Suppl. 2, pp. 20-25. (In Russ.)]
9. Князев О.В., Лазебник Л.Б., Ручкина И.Н., Царегородцева Т.М., Парфенов А.И. Инфликсимаб в терапии воспалительных заболеваний кишечника // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2009. № 5. С. 64-68. [Knyazev O.V., Lazebnik L.B., Ruchkina I.N., Tsaregorodtseva T.M., Parfenov A.I. Infliximab for treatment of inflammatory bowel diseases. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2009, no. 5, pp. 64-68. (In Russ.)]
10. Лукина Г.В., Сигидин Я.А. Цертолизумаб пегол в терапии ревматоидного артрита // Современная ревматология, 2012. № 2. С. 44-49. [Lukina G.V., Sigidin Ya.A. Certolizumab pegol in therapy for rheumatoid arthritis. *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology Journal*, 2012, no. 2, pp. 44-49. (In Russ.)]
11. Лучихина Е.Л., Каратеев Д.Е., Насонов Е.Л. Первый опыт применения адалимумаба в России: предварительные результаты 24-недельного открытого исследования // Научно-практическая ревматология, 2008. № 5. С. 59-60. [Luchikhina E.L., Karateev D.E., Nasonov E.L. First experience of adalimumab administration in Russia: preliminary results of an open 24 week study. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2008, no. 5, pp. 59-60. (In Russ.)]
12. Масычева В.И., Белкина А.О., Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М. Некоторые аспекты клинических испытаний препаратов фактора некроза опухоли // Российский биотерапевтический журнал, 2010. Т. 9, № 4. С. 39-44. [Masychева V.I., Belkina A.O., Danilenko E.D., Sysoeva G.M. Some aspects of clinical trials of the TNF- α based preparations. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2010, Vol. 9, no. 4, pp. 39-44. (In Russ.)]
13. Насонов Е.Л. Перспективы фармакотерапии воспалительных ревматических заболеваний: моноклональные антитела к фактору некроза опухоли- α // Ревматология (онлайн-издание), 2001. № 7. С. 280. [Nasonov E.L. Perspectives of inflammatory rheumatic diseases pharmacotherapy: monoclonal antibodies to the tumor necrosis factor- α . *Revmatologiya (online-izdanie) = Rheumatology (Online Edition)*, 2001, no. 7, p. 280. (In Russ.)]
14. Насонов Е.Л. Фактор некроза опухоли- α – новая мишень для противовоспалительной терапии ревматоидного артрита // Ревматология (онлайн-издание), 2000. № 17. С. 718. [Nasonov E.L. Tumor necrosis factor- α is a new target for rheumatoid arthritis anti-inflammatory therapy. *Revmatologiya (online-izdanie) = Rheumatology (Online Edition)*, 2000, no. 17, p. 718. (In Russ.)]
15. Насонов Е.Л. Фармакотерапия ревматоидного артрита – взгляд в 21 век // Клиническая медицина, 2005. № 6. С. 8-12. [Nasonov E.L. Pharmacotherapy of rheumatoid arthritis the 21st century. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*, 2005, no. 6, pp. 8-12. (In Russ.)]
16. Насонов Е.Л., Самсонов М.Ю. Новые аспекты патогенеза сердечной недостаточности: роль фактора некроза опухоли // Сердечная недостаточность, 2000. Т. 1, № 4. С. 139-143. [Nasonov E.L., Samsonov M.Yu. New aspects of the pathogenesis of cardiac distress: the role of tumor necrosis factor. *Serdechnaya nedostatochnost = Cardiac Insufficiency*, 2000, Vol. 1, no. 4, pp. 139-143. (In Russ.)]
17. Насонов Е.Л. Инновационные технологии в лечении аутоиммунных ревматических заболеваний человека // Ревматология. Нефрология. Травматология, 2008. Т. 1, № 25. С. 3-4. [Nasonov E.L. Innovative technologies for the treatment of autoimmune rheumatic diseases. *Revmatologiya. Nefrologiya. Travmatologiya = Rheumatology. Nephrology. Traumatology*, 2008, Vol. 1, no. 25, pp. 3-4. (In Russ.)]

18. Насонов Е.Л. Эффективность и безопасность ингибиторов фактора некроза опухоли- α при ревматоидном артрите // Русский медицинский журнал, 2008. № 25. С. 53-57. [Nasonov E.L. Efficacy and safety of inhibitors to tumor necrosis factor- α for rheumatoid arthritis treatment. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2008, no. 25, pp. 53-57. (In Russ.)]
19. Насонов Е.Л., Амирджанова В.Н. Новые аспекты фармакотерапии ревматоидного артрита: фокус на цертолизумаб пегол // Научно-практическая ревматология, 2011. № 1. С. 40-49. [Nasonov E.L., Amirdzhanova V.N. New aspects of rheumatoid arthritis pharmacotherapy: focus on cerolizumab pegol. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2011, no. 1, pp. 40-49. (In Russ.)]
20. Никишина И.П. Растворимые рецепторы к фактору некроза опухоли (этанерцепт) в терапии ювенильного артрита // Русский медицинский журнал, 2009. Т. 17, № 4. С. 177. [Nikishina I.P. Soluble receptors to the tumor necrosis factor (etanercept) for the juvenile arthritis therapy. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2009, Vol. 17, no. 4, p. 177. (In Russ.)]
21. Никишина И.П. Этанерцепт в лечении ювенильного артрита: от опыта клинических исследований к клинической практике // Русский медицинский журнал, 2010. Т. 18, № 27. С. 1686. [Nikishina I.P. Etanercept for juvenile arthritis treatment: from clinical investigations to clinical practice. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2010, Vol. 18, no. 27, p. 1686. (In Russ.)]
22. Фурсенко Д.В., Хоцкин Н.В., Куликов В.А., Куликов А.В. Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2015. Т. 19, № 4. С. 394-398. [Fursenko D.V., Khotskin N.V., Kulikov V.A., Kulikov A.V. Behavioral phenotyping of mice deficient for tumor necrosis factor. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2015, Vol. 19, no. 4, pp. 394-398. (In Russ.)]
23. Ягудина Р.И., Зинчук И.Ю., Куликов А.Ю. Фармакоэкономический анализ применения генно-инженерных биологических препаратов при ювенильном ревматоидном артрите // Фармакоэкономика, 2011. Т. 4, № 1. С. 18-23. [Yagudina R.I., Zinchuk I.Yu., Kulikov A.Yu. Pharmacoeconomic analysis use of genetic engineering biological agents in juvenile rheumatoid arthritis. *Farmakoeconomika = Pharmacoeconomics*, 2011, Vol. 4, no. 1, pp. 18-23. (In Russ.)]
24. Яременко О.Б. Ингибиторы фактора некроза опухоли- α в лечении ревматоидного артрита: результаты применения в широкой медицинской практике // Украинский ревматологический журнал, 2009. Т. 4, № 38. С. 21-27. [Yaremenko O.B. Tumor necrosis factor- α inhibitors for the rheumatoid arthritis treatment: results of general medical practice. *Ukrainskiy revmatologicheskii zhurnal = Ukrainian Journal of Rheumatology*, 2009, Vol. 4, no. 38, pp. 21-27. (In Russ.)]
25. Aggarwal B.B., Gupta S.C., Kim J.H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 3, pp. 651-665.
26. Aggarwal B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a doubleedged sword. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, no. 9, pp. 745-756.
27. Ash Z., Emery P. Golimumab – a new tool in the armoury against inflammatory arthritis. *Ann. Med.*, 2011, Vol. 43, no. 2, pp. 133-141.
28. Baraliakos X., Heldmann F., van den Bosch F., Burmester G., Gaston H., van der Horst-Bruinsma I.E., Krause A., Schmidt R., Schneider M., Sieper J., Andermann B., van Tubergen A., Witt M., Braun J. Long-term efficiency of infliximab in patients with ankylosing spondylitis: real life data confirm the potential for dose reduction. *RMD Open*, 2016, Vol. 2, no. 2, pp. 1-3.
29. Beutler B., Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*, 1986, Vol. 320, no. 6063, pp. 584-588.
30. Bozkurt B., Kribbs S.B., Clubb F.J. Jr., Michael L.H., Didenko V.V., Hornsby P.J., Seta Y., Oral H., Spinale F.G., Mann D.L. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation*, 1998, Vol. 97, no. 14, pp. 1382-1391.
31. Bouman C., van Herwaarden N., van den Hoogen F., van der Maas A., van den Bemt B., den Broeder A.A. Prediction of successful dose reduction or discontinuation of adalimumab, etanercept, or infliximab in rheumatoid arthritis patients using serum drug levels and antidrug antibody measurement. *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.*, 2017, Vol. 13, no. 6, pp. 597-604.
32. Bradley J.R. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.*, 2008, Vol. 214, no. 2, pp. 149-160.
33. Broeder A., Putte L., Rau R., Schattenkirchner M. A single dose, placebo controlled study of the fully human anti-tumor necrosis factor-alpha antibody adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2002, Vol. 29, no. 11, pp. 2288-2298.
34. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, Vol. 72, no. 9, pp. 3666-3670.
35. Chew A., Bennett A., Smith C., Barker J., Kirkham B. Successful treatment of severe psoriasis and psoriatic arthritis with adalimumab. *Dermatology*, 2004, Vol. 151, no. 2, pp. 492-496.
36. Choy E.H., Kavanaugh A.F., Jones S.A. The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA. *Nat. Rev. Rheumatology*, 2013, Vol. 9, no. 3, pp. 154-163.
37. Elinav E., Nowarski R., Thaïs C.A., Hu B., Jin C., Flavell R.A. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer*, 2013, Vol. 13, no. 11, pp. 759-771.

38. Fleischmann R., Vencovsky J., van Vollenhoven R.F., Borenstein D., Box J., Coteur G., Goel N., Brezinschek H.P., Innes A., Strand V. Efficacy and safety of certolizumab pegol monotherapy every 4 weeks in patients with rheumatoid arthritis failing previous disease-modifying antirheumatic therapy: the FAST4WARD study. *Ann. Rheum. Dis.*, 2009, Vol. 68, no. 6, pp. 805-811.
39. Feldman M., Maini S.R. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2008, no. 223, pp. 7-19.
40. Feldmann M. Translating molecular insights in autoimmunity into effective therapy. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, no. 27, pp. 1-27.
41. Fossati G., Nesbitt A. Certolizumab pegol has a different profile from the other anti-TNFs, including golimumab, in a variety of in vitro assays. *J. Transl. Med.*, 2010, Vol. 8, Suppl. 1, p. 37.
42. Gordon P.A., Winer J.B., Hoogendijk J.E., Choy E.H. Immunosuppressant and immunomodulatory treatment for dermatomyositis and polymyositis. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2012, Vol. 15, no. 8, CD003643. doi: 10.1002/14651858.CD003643.pub4.
43. Haudek S.B., Taffet G.E., Schneider M.D., Mann D.L. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *J. Clin. Invest.*, 2007, no. 117, pp. 2692-2701.
44. Horiuchi K., Kimura T., Miyamoto T., Takaishi H., Okada Y., Toyama Y., Blobel C.P. Cutting edge: TNF- α -converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 5, pp. 2686-2689.
45. Hu X., Li B., Li X., Zhao X., Wan L., Lin G., Yu M., Wang J., Jiang X., Feng W., Qin Z., Yin B., Li Z. Transmembrane TNF- α promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no.3, pp. 1320-1331.
46. Hu S., Liang S., Guo H., Zhang D., Li H., Wang X., Yang W., Qian W., Hou S., Wang H., Guo Y., Lou Z. Comparison of the inhibition mechanisms of adalimumab and infliximab in treating tumor necrosis factor α -associated diseases from a molecular view. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 38, pp. 27059-27067.
47. Jaffe G.J., Dick A.D., Brézin A.P., Nguyen Q.D., Thorne J.E., Kestelyn P., Barisani-Asenbauer T., Franco P., Heiligenhaus A., Scales D., Chu D.S., Camez A., Kwatra N.V., Song A.P., Kron M., Tari S., Suhler E.B. Adalimumab in patients with active noninfectious uveitis. *N. Engl. J. Med.*, 2016, Vol. 375, no. 10, pp. 932-943.
48. Kalliolias G.D., Ivashkiv L.B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2016, Vol. 12, no. 1, pp. 49-62.
49. Katsicas M.M., Russo R. Biologic agents in juvenile spondyloarthropathies. *Pediatr. Rheumatol. Online J.*, 2016, Vol. 14, no. 17, pp. 1-8.
50. Liang S., Dai J., Hou S., Su L., Zhang D., Guo H., Hu S., Wang H., Rao Z., Guo Y., Lou Z. Structural basis for treating tumor necrosis factor α -associated diseases with the therapeutic antibody infliximab. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 19, pp. 13799-13807.
51. Liu W., Wu Y.H., Zhang L., Liu X.Y., Xue Bin, Liu Bin, Wang Y. Efficacy and safety of TNF- α inhibitors for active ankylosing spondylitis patients: Multiple treatment comparisons in a network meta-analysis. *Sci. Rep.*, 2016, no. 6, pp. 1-8.
52. Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 2001, Vol. 104, no. 4, pp. 487-501.
53. Malottki K., Barton P., Tsourapas A., Uthman A.O., Liu Z., Routh K., Connock M., Jobanputra P., Moore D., Fry-Smith A., Chen Y.F. Adalimumab, etanercept, infliximab, rituximab and abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis after the failure of a tumour necrosis factor inhibitor: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.*, 2011, Vol. 15, no. 14, pp. 1-278.
54. Michie H.R., Manogue K.R., Spriggs D.R., Douglas W. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N. Engl. J. Med.*, 1988, no. 318, pp. 1481-1486.
55. Monaco C., Nanchahal J., Taylor P., Feldmann M. Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int. Immunol.*, 2015, no. 27, pp. 55-62.
56. Montgomery S.L., Bowers W.J. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 2012, Vol. 7, no. 1, pp. 42-59.
57. Mudduluru B.M., Shah S., Shamah S., Swaminath A. TNF-alpha antagonist induced lupus on three different agents. *Postgrad. Med.*, 2017, Vol. 129, no. 2, pp. 304-306.
58. Murdaca G., Spanò F., Contatore M., Guastalla A., Penza E., Magnani O., Puppo F. Immunogenicity of infliximab and adalimumab: what is its role in hypersensitivity and modulation of therapeutic efficacy and safety? *Expert Opin. Drug Saf.*, 2016, Vol. 15, no. 1, pp. 43-52.
59. Murray D.R., Freeman G.L. Tumor necrosis factor- α induces a biphasic effect on myocardial contractility in conscious dogs. *Circ. Res.*, 1996, no. 28, pp. 964-971.
60. Nedwin G.E., Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Smith D., Jarrett-Nedwin J., Pennica D., Goeddel D.V., Gray P.W. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.*, 1985, Vol. 13, no. 17, pp. 6361-6373.
61. Özer İ., Karaçin C., Adışen E., Güz G., Güner A.M. Two diseases one remedy? Systemic amyloidosis secondary to hidradenitis suppurativa: Treatment with infliximab. *Dermatol. Ther.*, 2017, Vol. 30, no. 2. doi: 10.1111/dth.12445.

62. Papathanasiou S., Rickelt S., Soriano M.E., Schips T.G., Maier H.J., Davos C.H., Varela A., Kaklamanis L., Mann D.L., Capetanaki Y. Tumor necrosis factor- α confers cardioprotection through ectopic expression of keratins K8 and K18. *Nat. Med.*, 2015, Vol. 21, no. 9, pp. 1076-1084.
63. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: the essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*, 2015, no. 302, pp. 2-22.
64. Punzi L., Lapadula G., Mathieu A. Efficacy and safety of certolizumab pegol in rheumatoid arthritis: meeting rheumatologists' requirements in routine clinical practice. *BioDrugs*, 2014, Vol. 28, Suppl. 1, pp. 25-37.
65. Reichert J.M. Antibodies to watch in 2015. *MAbs*, 2015, Vol. 7, no. 1, pp. 1-8.
66. Sandborn W.J., Lee S.D., Randall C., Gutierrez A., Schwartz D.A., Ambarkhane S., Kayhan C., Pierre-Louis B., Schreiber S., Lichtenstein G.R. Long-term safety and efficacy of certolizumab pegol in the treatment of Crohn's disease: 7-year results from the PRECiSE 3 study. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2014, Vol. 40, no. 8, pp. 903-916.
67. Shaye O., Vasilias E., Ippoliti A., Dubinsky M. Safety and efficacy of adalimumab in Crohn's disease patients with an attenuated response to infliximab. *Gastroenterology*, 2005, Vol. 100, no. 1, pp. 75-79.
68. Riolo G., Towheed T.E. Anti-tumor necrosis factor inhibitor therapy-induced dermatomyositis and fasciitis. *J. Rheumatol.*, 2012, Vol. 39, no. 1, pp. 192-194.
69. Royal college of physicians. Rheumatoid arthritis: National clinical guideline for management and treatment in adults. London: National Collaborating Centre for Chronic Conditions, 2009. 228 p.
70. Tracey D., Klareskog L., Sasso E.H., Salfeld J.G., Tak P.P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.*, 2007, no. 117, pp. 244-279.
71. Verjee L.S., Verhoeckx J.S., Chan J.K., Krausgruber T., Nicolaidou V., Izadi D., Davidson D., Feldmann M., Midwood K.S., Nanchahal J. Unraveling the signaling pathways promoting fibrosis in Dupuytren's disease reveals TNF as a therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, Vol. 110, no. 10, pp. E928-E937.
72. Vinicki J.P., García-Vicuña R., Arredondo M., López-Bote J.P., García-Vadillo J.A., Castañeda S., Álvaro-Gracia J.M. Sustained remission after long-term biological therapy in patients with large vessel vasculitis: an analysis of ten cases. *Reumatol. Clin.*, 2017, Vol. 13, no. 4, pp. 17-25.
73. Yokoyama T., Vaca L., Rossen R.D., Durante W., Hazarika P., Mann D.L. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian heart. *J. Clin. Invest.*, 1993, no. 92, pp. 2303-2313.
74. Yokoyama T., Nakano M., Bednarczyk J.L., McIntyre B.W., Entman M., Mann D.L. Tumor necrosis factor- α provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation*, 1997, Vol. 95, no. 5, pp. 1247-1252.
75. Zhao X., Rong L., Zhao X., Li X., Liu X., Deng J., Wu H., Xu X., Erben U., Wu P., Syrbe U., Sieper J., Qin Z. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 11, pp. 4094-4104.
76. Zhou H., Jang H., Fleischmann R.M., Bouman-Thio E., Xu Z., Marini J.C., Pendley C., Jiao Q., Shankar G., Marciniak S.J., Cohen S.B., Rahman M.U., Bake D., Mascelli M.A., Davis H.M., Everitt D.E. Pharmacokinetics and safety of golimumab, a fully human anti-TNF- α monoclonal antibody, in subjects with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Pharmacol.*, 2007, Vol. 47, no. 3, pp. 383-396.

Авторы:

Воронина Е.В. — научный сотрудник ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра „Курчатовский институт“, Москва, Россия

Лобанова Н.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра „Курчатовский институт“, Москва, Россия

Яхин И.Р. — инженер-технолог ООО «ФАРМАПАРК», Москва, Россия

Романова Н.А. — инженер-технолог ООО «ФАРМАПАРК», Москва, Россия

СерEGIN Ю.А. — к.б.н., заместитель директора ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра „Курчатовский институт“, Москва, Россия

Authors:

Voronina E.V., Research Associate, State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russian Federation

Lobanova N.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russian Federation

Yakhin I.R., Process Engineer, PHARMAPARK LLC, Moscow, Russian Federation

Romanova N.A., Process Engineer, PHARMAPARK LLC, Moscow, Russian Federation

Seregin Yu.A., PhD (Biology), Deputy Director, State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russian Federation

Поступила 29.01.2018

Отправлена на доработку 08.02.2018

Принята к печати 18.04.2018

Received 29.01.2018

Revision received 08.02.2018

Accepted 18.04.2018

РОЛЬ CD200/CD200R-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ФОРМИРОВАНИИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И БЕРЕМЕННОСТИ

Арефьева А.С., Бабаян А.А., Степанова Е.О., Донцова Т.В.,
Павлович С.В., Кречетова Л.В., Николаева М.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Трансмембранный иммунорегуляторный гликопротеин CD200 принадлежит к семейству иммуноглобулинов и широко представлен на множестве типов клеток, в то время как его сходный по структуре рецептор CD200R в основном экспрессируется на миелоидных и лимфоидных клетках. Иммуномодуляторная роль взаимодействия молекул CD200 и CD200R заключается в активации внутриклеточного ингибиторного каскада реакций, приводя к супрессии эффекторных иммунных клеток и подавляя воспалительный процесс. Так, активация CD200R стимулирует дифференцировку наивных Т-клеток в регуляторные, повышает активность фермента индоламин-2,3-диоксигеназы и усиливает синтез цитокинов IL-10 и TGF- β , способствуя формированию Th2-зависимого противовоспалительного окружения. Данные процессы являются ключевыми в обеспечении иммунологической толерантности и необходимы для контроля развития аутоиммунных процессов, гиперчувствительности, приживления трансплантированных органов и тканей, а также при беременности для защиты полуаллогенного плода, несущего чужеродные антигены отца, от отторжения. Толерогенный потенциал взаимодействия молекул CD200 и CD200R может быть эффективно использован при лечении множества заболеваний (например, болезни Альцгеймера, ревматоидного артрита, аллергии). В данном обзоре большое внимание уделено роли CD200/CD200R-взаимодействия в стимуляции приживления аллотрансплантата и предотвращения спонтанного выкидыша. На основании многочисленных исследований можно утверждать, что в основе обоих процессов лежат сходные иммунологические механизмы, одним из ключевых участников которых является молекула CD200.

Ключевые слова: CD200, аллотрансплантат, беременность, иммунологическая толерантность, ингибиторный рецептор, привычный выкидыш

Адрес для переписки:

Арефьева Алла Сергеевна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, 4.
Тел.: 8 (495) 438-11-83.
E-mail: a_arefeva@oparina4.ru

Address for correspondence:

Arefieva Alla S.
National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation
117997, Russian Federation, Moscow, Acad. Oparin str., 4.
Phone: 7 (495) 438-11-83.
E-mail: a_arefeva@oparina4.ru

Образец цитирования:

А.С. Арефьева, А.А. Бабаян, Е.О. Степанова, Т.В. Донцова, С.В. Павлович, Л.В. Кречетова, М.А. Николаева «Роль CD200/CD200R-взаимодействия в формировании иммунологической толерантности при трансплантации и беременности» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 807-814.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-807-814
© Арефьева А.С. и соавт., 2018

For citation:

A.S. Arefieva, A.A. Babayan, E.O. Stepanova, T.V. Dontsova, S.V. Pavlovich, L.V. Krechetova, M.A. Nikolaeva "The role of CD200/CD200R interactions in the formation of immunological tolerance in transplantation and pregnancy", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 807-814.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-807-814
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-807-814

THE ROLE OF CD200/CD200R INTERACTIONS IN THE FORMATION OF IMMUNOLOGICAL TOLERANCE IN TRANSPLANTATION AND PREGNANCY

Arefieva A.S., Babayan A.A., Stepanova E.O., Dontsova T.V., Pavlovich S.V., Krechetova L.V., Nikolaeva M.A.

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Abstract. The transmembrane CD200 glycoprotein belongs to the immunoglobulin family and it is widely represented on a variety of cell types, while its structurally similar CD200R receptor is expressed, mainly, on myeloid and lymphoid cells. An immunomodulatory role of CD200 and CD200R interaction is to activate the intracellular inhibitory cascade of reactions, leading to suppression of effector immune cells and attenuation of the inflammatory process. Thus, the CD200R activation stimulates the differentiation of naive T cells to regulatory T cells, increasing the indolamine 2,3-dioxygenase activity, and enhances the synthesis of IL-10 and TGF- β cytokines, contributing to development of a Th2-dependent anti-inflammatory environment. These immune regulatory events provide the development of immune tolerance and are required for controlling the development of autoimmune processes, hypersensitivity, engraftment of transplanted organs and tissues, as well as protecting the fetus from spontaneous abortion. Tolerogenic potential of interaction between CD200 and CD200R molecules can be effectively used for treatment of various diseases (e.g., Alzheimer's, rheumatoid arthritis, allergies). In this review, we will address the role of CD200/CD200R interactions in stimulating the post-transplant engraftment and protecting a fetus from spontaneous abortion. Many *in vivo* and *in vitro* studies have suggested a key role of CD200/CD200R interaction in immune maintenance of both processes.

Keywords: CD200, allograft, pregnancy, immune tolerance, inhibitory receptor, recurrent abortion

Введение

Молекулы CD200 и CD200R являются высококонсервативными трансмембранными гликопротеинами, относящимися к суперсемейству иммуноглобулинов и состоящими из двух специфических для этого класса молекул иммуноглобулиноподобных доменов — V и C. Доказано, что взаимодействие CD200 со своими рецепторами CD200R играет важную роль в формировании периферической иммунологической толерантности. Так, эти молекулы регулируют активность клеток миелоидного ряда и участвуют в супрессии воспалительного ответа как на внешние стимулы (патогены, аллергены), так и на внутренние (гипоксия, воздействие свободных радикалов, повреждение тканей и пр.) [25]. Нарушение такого взаимодействия приводит к развитию острого воспаления, аутоиммунных заболеваний, аллергии и прочих патологических процессов (табл. 1).

Молекула CD200 экспрессируется на множестве типов клеток миелоидного ряда (тучные клетки, нейтрофилы, макрофаги, дендритные клетки) и лимфоидного ряда (Т- и В-клетки), а также на клетках негематопоэтического происхождения (эндотелиальных клетках, клетках трофобласта, децидуальной ткани и др.) [3]. Экспрессия CD200 быстро увеличивается в ответ

на воспаление в присутствии фактора некроза опухоли-альфа (TNF α) и интерферона-гамма (IFN γ) [5]. Кроме того, экспрессия CD200 усилена на поверхности апоптотических клеток, способствуя снижению продукции провоспалительных цитокинов в ответ на высвобождающиеся в процессе клеточной гибели аутоантигены и ограничению развития аутоиммунных процессов [28].

Семейство рецепторов CD200R гетерогенно и в основном экспрессируется на клетках миелоидного ряда (дендритные клетки и клетки Лангерганса, тучные клетки, эозинофилы, базофилы, нейтрофилы и макрофаги). Среди клеток лимфоидного ряда (Т- и В-клетки, NK- и NKT-клетки) экспрессия молекул CD200R весьма значительна на поверхности CD4⁺Th-клеток (преимущественно Th1-типа), а также В-клеток памяти и плазмобластов [27]. Молекулы CD200R имеют более удлиненную по сравнению с молекулами CD200 цитоплазматическую часть, обеспечивающую проведение ингибиторного сигнала [35].

В отличие от большинства ингибиторных рецепторов, несущих особую цитоплазматическую последовательность — тирозинсодержащий ингибиторный мотив (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif — ITIM), обеспечивающий проведение ингибиторного сигнала, молекула

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОМОДУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ CD200/CD200R НА СИНТЕЗ ИММУНОМЕДИАТОРОВ, МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ, ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК И РАЗВИТИЕ ИММУННЫХ ПРОЦЕССОВ/ЗАБОЛЕВАНИЙ (МОДИФИЦИРОВАНО ИЗ [25])

TABLE 1. IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF THE EXPRESSION OF CD200/CD200R MOLECULES ON THE SYNTHESIS OF IMMUNOMODULATORS, ADHESION MOLECULES, CELL PROLIFERATION, AND THE DEVELOPMENT OF IMMUNE PROCESSES/DISEASES (MODIFIED FROM [25])

Цитокины/хемокины Cytokines/chemokines		Клетки и молекулы адгезии Cells and adhesion molecules		Процесс/заболевание Process/disease	
Усиленная экспрессия CD200/CD200R Increased expression of CD200/CD200R	Ослабленная экспрессия CD200/CD200R Decreased expression of CD200/CD200R	Усиленная экспрессия CD200/CD200R Increased expression of CD200/CD200R	Ослабленная экспрессия CD200/CD200R Decreased expression of CD200/CD200R	Усиленная экспрессия CD200/CD200R Increased expression of CD200/CD200R	Ослабленная экспрессия CD200/CD200R Decreased expression of CD200/CD200R
IL-10 TGF-β IL-4 IL-5	IL-1 IL-6 IL-2 IFN γ /IFN α IL-12 MIP-1 α MCP-1 IL-8	Treg Tr1 Tr3 Незрелые лейкоциты Immature state of leukocytes	CTL Активация лейкоцитов и микроглии Leukocyte and microglia activation Адгезия Adhesion Презентация антигенов Antigen presentation MHC-I/II ICAM-1/2 VCAM-1/2 VLA-4 LFA-1	Инвазивность и метастазирование злокачественных опухолей Cancer invasivity and metastasis Ауто толерантность Immune tolerance to self-antigens Приживление аллотрансплантата Allograft acceptance Остеобластогенез Osteoblastogenesis	Аутоиммунные заболевания Autoimmune diseases Болезнь Паркинсона Parkinson disease Болезнь Альцгеймера Alzheimer disease Алопеция Alopecia Вирусная инфекция Viral infection Спонтанный выкидыш Spontaneous fetal loss Аллергия Allergy

рецептора CD200R имеет в составе своей цитоплазматической части три остатка тирозина [38]. После связывания с лигандом молекула CD200R фосфорилируется по этим тирозиновым остаткам, что вызывает активацию адапторных белков Dok1 и Dok2, обеспечивающих фосфорилирование ГТФ-азы Ras и активацию фосфатазы SHIP. Это в свою очередь приводит к ингибированию действия митоген-активируемой протеинкиназы (mitogen-activated protein kinase, MAPK) и NF-κB. Результатом этих событий становится торможение дегрануляции тучных клеток, ослабление синтеза множества провоспалительных цитокинов (например, TNF α , IFN γ , IL-1, IL-17, IL-6, IL-8 и IL-10) и усиление синтеза противовоспалительных цитокинов (IL-10 и TGF-β) [27].

Особо стоит выделить стимулирующее влияние CD200/CD200R-взаимодействия на синтез TGF-β клеткой. Данный цитокин блокирует активацию лимфоцитов и макрофагов и способствует дифференцировке Т-клеток в регуляторные Т-клетки с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (regulatory T cells, Treg), тем самым предотвращая отторжение трансплантированных органов и минимизируя аутоиммунные воспалительные процессы [15].

Помимо вышеописанных событий, взаимодействие молекул CD200 и CD200R также обеспечивает развитие индоламин-2,3-диоксигеназы (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) – зависимого ингибиторного каскада внутриклеточных реакций. IDO является одним

из трех основных ферментов, обеспечивающих катаболизм аминокислоты триптофана, продукты превращения которого, выступая в качестве сильных проапоптотических сигналов, вызывают остановку клеточного цикла в середине G1-фазы [26]. IDO является IFN γ -индуцибельным ферментом и экспрессируется в различных типах клеток, в том числе в антигенпредставляющих клетках (АПК), эндотелиальных клетках и клетках трофобласта плода. Взаимодействие CD200 с CD200R усиливает экспрессию IDO в активированных дендритных клетках [14]. В результате такого взаимодействия происходит супрессия АПК, снижение пролиферации Т- и NK-клеток, усиление апоптоза Т-клеток, а также индукция Treg-клеток [31]. Таким образом обеспечивается иммунологическая толерантность, необходимая, в частности, для предотвращения развития аутореактивности, стимуляции приживления трансплантата и защиты плода от спонтанного выкидыша [13].

CD200 и защита аллотрансплантата от отторжения

Известно, что трансплантационный иммунитет реализуется с участием как CD8⁺, так и CD4⁺ лимфоцитов реципиента, активация которых обеспечивает развитие цитотоксической и воспалительной форм иммунного ответа на донорский трансплантат [2]. Активация CD8⁺ и CD4⁺ лимфоцитов происходит в региональном лимфатическом узле в результате прямого и непрямого распознавания донорских молекул главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС), презентруемых зрелыми дендритными клетками как донора, так и реципиента. Формирующиеся эффекторные Т-клетки обоих типов (CTL и Th1-клетки), а также NK-клетки и макрофаги мигрируют в очаги воспаления и инициируют реакцию отторжения тканей.

CTL и NK-клетки осуществляют цитолиз донорских клеток, а также продуцируют провоспалительный цитокин IFN γ , который способствует апоптозу клеток трансплантата и стимулирует реакции, осуществляемые CD4⁺Т-клетками. При взаимодействии с макрофагами Th1-лимфоциты повторно стимулируются презентруемыми фрагментами молекул МНС донора и, в свою очередь, активируют макрофаги через костимулирующую молекулу CD40. Помимо этого, Th1-лимфоциты продуцируют TNF α и IFN γ , которые также стимулируют макрофаги. Такие активированные макрофаги выделяют провоспалительные цитокины и другие факторы, опосредующие деструкцию и отторжение трансплантационных тканей. В частности, провоспалительные цитокины Th1-типа вызывают активацию фибрино-

геноподобного белка 2 (fibrinogen-like protein, fgl2) на эндотелиальных клетках трансплантата [16]. Этот белок обладает протромбиназной активностью и способствует накоплению тромбина с последующей активацией тромбоцитов, отложением компонентов системы комплемента, инфильтрацией полиморфноядерных лейкоцитов, генерацией фибрина из фибриногена и развитием тромбоза в месте трансплантации с последующим отторжением тканей.

Преодоление трансплантационного иммунитета в клинической практике, т.е. формирование искусственной иммунологической толерантности, реализуется за счет двух основных процедур – подбор донора трансплантата с максимальной генетической совместимостью (особенно по генам HLA [human leukocyte antigens]) и лекарственная иммуносупрессия. И хотя достижение полной трансплантационной толерантности в клинике без применения лекарственных агентов практически невозможно, существуют некоторые иммунологические механизмы, способные положительно влиять на реакцию приживления трансплантата. К тому же она может быть успешно реализована и исследована на грызунах во множестве лабораторных моделей [33].

Так, использование трансгенных животных со сверхэкспрессией CD200 в условиях аллотрансплантационной модели позволило получить результаты, свидетельствующие о позитивной корреляции CD200/CD200R-взаимодействия и формирования иммунологической толерантности к аллотрансплантату. В 1998 году впервые было показано, что присутствие молекулы CD200 на поверхности дендритных клеток необходимо для увеличения срока жизни пересаженной почки [20]. Многочисленные исследования, проведенные профессором Реджинальдом Горжински и его группой в последующие годы, подтвердили принципиальную роль экспрессии CD200- и CD200R-молекул в успешном приживлении аллотрансплантата. Взаимодействие данных молекул как на локальном (внутри самого трансплантата), так и на системном уровне (в организме реципиента) вызывает сверхэкспрессию mPNC, кодирующих интерлейкины, хемокины и их рецепторы, ответственные за супрессию дегрануляции тучных клеток и привлечение регуляторных FoxP3⁺Т-клеток [36].

Таким образом, было доказано, что взаимодействие CD200 со своими рецепторами на поверхности тучных клеток ингибирует дегрануляцию последних, а CD200/CD200R-взаимодействие на поверхности IDO⁺ антигенпредставляющих клеток (макрофагов и дендритных клеток) приводит к активации супрессорных $\gamma\delta$ T-клеток и супрессорных CD8⁺Т-клеток, усилению синте-

за цитокинов Th2-типа (IL-4, IL-10 и TGF- β), которые способствуют дифференцировке наивных Т-клеток в регуляторные CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg клетки, и ослаблению CTL- и NK-активности, что обеспечивает поддержание оптимальной среды для выживания трансплантата [23, 34].

В настоящий момент предпринимаются активные попытки использовать различные синтетические CD200-подобные пептиды в качестве иммуносупрессорных препаратов для применения в клинике [18]. Так, агонист CD200 — растворимый иммуноадгезин CD200Fc — состоит из внеклеточного домена молекулы CD200 и Fc-части IgG2a мыши и может оказывать длительное иммунорегуляторное действие, приводя к успешному приживлению трансплантата как при аллогенной, так и при ксеногенной трансплантации [19, 24]. А гибридная молекула CD200Fc(Gly)6TGF β оказалась способна оказывать супрессирующее действие на лейкоциты в концентрации в 20-100 раз меньшей, чем CD200Fc и TGF- β по отдельности [22]. Однако, в случае отсутствия молекул CD200R, даже сверхэкспрессия CD200 и/или введение экзогенного CD200Fc не оказывает позитивного влияния на приживление трансплантата [4].

CD200 и защита плода от спонтанного выкидыша

Спонтанная постимплантационная потеря плода в первом триместре беременности в основном обусловлена иммуногенетическими факторами в сочетании с воздействием бактериальных эндотоксинов (в частности, липополисахарида) и/или стресса и связана с развитием иммунных реакций, сопровождающихся увеличением количества Th1 и активированных NK-клеток, а также чрезмерной продукцией провоспалительных цитокинов Th1-типа (IFN γ и TNF α) в децидуальной ткани и трофобласте плода [9]. На фоне воздействия данных цитокинов, как и в случае отторжения аллогенного трансплантата, происходит усиление экспрессии fgl2, отложение фибрина и продукция IL-8 эндотелиальными клетками, что вызывает инвазию полиморфноядерных лейкоцитов (нейтрофилов) в область трансплacentарного барьера и разрушение клеток эндотелия. Тем самым обеспечивается развитие протромбогенных и провоспалительных условий, в которых происходит разрушение новообразованных сосудов формирующейся плаценты и отторжение плода [6].

Стоит помнить, что плод фактически представляет собой аллотрансплантат, который генетически и иммунологически чужероден организму матери из-за наличия в его геноме отцовских генов, а одним из механизмов, приводящих к родам, является снятие запретов на иммунную

реакцию отторжения несовместимых тканей. Несмотря на наличие плацентарного гистогематического барьера между плодом и матерью, полного изолирования генетически несовместимого плода от контакта с материнской иммунной системой не происходит [1]. Поэтому для успешного протекания беременности необходимо формирование естественной иммунологической толерантности матери по отношению к плоду. Так, для реализации данной функции необходимы: экспрессия трофобластом плода неклассических молекул MHC-I и молекул семейства TNF, подавляющих активность естественных киллеров и вызывающих апоптоз CTL-клеток соответственно; ограниченная продукция провоспалительных цитокинов макрофагами; присутствие в децидуальной ткани IDO⁺ дендритных клеток, ответственных за индукцию анергии Т-лимфоцитов; ограниченная цитолитическая активность маточных NK-клеток; повышенное содержание в трофобласте регуляторных $\gamma\delta$ T- и NKT-клеток; практически полное отсутствие активности Th1-клеток (за счет блокады их дифференцировки в региональных лимфатических узлах и подавления активности под действием IL-10 и TGF- β , синтезируемых регуляторными клетками) и повышенное содержание регуляторных CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg, Tr1- и Th3-клеток в децидуальной ткани.

Недавно была доказана крайне важная роль CD200/CD200R-взаимодействия в формировании иммунологической толерантности к плоду. Так, было показано, что у женщин с успешно протекающей беременностью децидуальные клетки и клетки трофобласта плода активно экспрессируют молекулы CD200 и CD200R, способные ингибировать развивающийся воспалительный процесс, что позволяет успешно выносить плод [12]. Такое защитное действие CD200, как и в случае с приживлением трансплантата, заключается в стимуляции супрессорных $\gamma\delta$ T-клеток, узнающих неклассические молекулы MHC-I на клетках трофобласта плода и продуцирующих противовоспалительные цитокины Th2-типа (IL-10 и TGF- β), которые, в свою очередь, индуцируют дифференцировку наивных Т-клеток в регуляторные Tr1- и Th3-клетки и подавляют активность NK-клеток и макрофагов. Кроме того, взаимодействие CD200 со своими рецепторами на поверхности децидуальных АПК, несущих аллогенные молекулы плода, вызывает их IDO-зависимое ингибирование, что приводит к супрессии аллореактивных Т-клеток, а также к созреванию регуляторных Treg-клеток [10]. Так, у мышей с нормально протекающей беременностью количество Treg-клеток, способных подавлять пролиферацию эффекторных клеток и се-

крецию ими IFN γ , было повышено по сравнению с мышами, предрасположенными к спонтанному выкидышу [37]. Также известно, что у беременных женщин децидуальные дендритные клетки особенно активно экспрессируют IDO [30], а количество Treg-клеток сильно повышено, особенно в начале беременности и в течение второго триместра, постепенно снижаясь до нормы после родоразрешения [29]. При этом у пациенток со спонтанным выкидышем содержание Treg-клеток сравнимо с небеременными женщинами.

Исследования, проведенные на мышах с повышенной предрасположенностью к такой патологии, показали, что введение CD200Fc способно предотвращать неудачное завершение беременности, а инъекции антител, направленных против CD200, наоборот, увеличивают риск потери плода [24].

Особо стоит отметить роль молекул CD200, экспрессированных на мононуклеарных лейкоцитах, используемых для иммуноцитотерапии (ИЦТ) женщин, проходящих лечение от привычного идиопатического выкидыша. Помимо стимуляции выработки «блокирующих» антител, защищающих HLA-антигены плода от атаки Т-клетками матери, введение таким пациенткам аллогенных лейкоцитов полового партнера приостанавливает развитие воспалительного процесса и вызывает CD200-опосредованную активацию супрессорных $\gamma\delta$ T-клеток и синтез противовоспалительного цитокина TGF- β , что вызывает снижение уровня цитокинов Th1-типа, подавление активности NK-клеток и позволяет успешно вы-

носить беременность [11]. Было показано, что исход терапии напрямую связан с количеством вводимых CD200⁺ клеток. Так, пациентки с успешно наступившей беременностью получали в ходе ИЦТ большее количество CD200⁺ клеток, чем женщины, у которых беременность не наступила [7]. Кроме того, потеря поверхностного CD200 при хранении клеток крови в течение ночи при +4 °C коррелировала с утратой способности вводимых лейкоцитов предохранять от потери плода у пациенток [8], в то время как хранение клеток при +37 °C, наоборот, вызывало усиление экспрессии поверхностного CD200. Введение таких клеток пациенткам обладало более выраженным терапевтическим эффектом [6].

Таким образом, проведенный нами анализ литературных данных показал, что CD200/CD200R-взаимодействие инициирует супрессию провоспалительной активности миелоидных клеток в различных тканях. А тот факт, что молекула CD200 экспрессируется в иммунологически привилегированных органах, а также в тканях, постоянно подвергающихся антигенному воздействию, свидетельствует о ключевой роли CD200/CD200R-взаимодействия в усилении противовоспалительного ответа. Важным физиологическим последствием такого взаимодействия является индукция иммунологической толерантности, которая достигается путем регуляции дифференцировки, адгезии, хемотаксиса, а также высвобождения цитокинов множеством типов клеток иммунной системы.

Список литературы / References

1. Сидельникова В.М., Сухих Г.Т. Невынашивание беременности. М.: Медицинское информационное агентство, 2011. 536 с. [Sidelnikova V.M., Sukhikh G.T. Recurrent pregnancy loss]. Moscow: Medical News Agency, 2011. 536 p.
2. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
3. Barclay N., Gavin J. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.*, 2002, Vol. 23, no. 6, pp. 285-290.
4. Boudakov I., Liu J., Fan N., Gulay P., Wong K., Gorczynski R.M. Mice lacking CD200R1 show absence of suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and mixed leukocyte culture responses by CD200. *Transplantation*, 2007, Vol. 84, no. 2, pp. 251-257.
5. Chen Z., Marsden P.A., Gorczynski R.M. Role of a distal enhancer in the transcriptional responsiveness of the human CD200 gene to interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *Mol. Immunol.*, 2009, Vol. 46, no. 10, pp. 1951-1963.
6. Clark D.A. Immunological factors in pregnancy wastage: fact or fiction. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2008, Vol. 59, no. 4, pp. 277-300.
7. Clark D.A. Cell-surface CD200 may predict efficacy of paternal mononuclear leukocyte immunotherapy in treatment of human recurrent pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2009, Vol. 61, no. 1, pp. 75-84.
8. Clark D.A., Chaouat G. Loss of surface CD200 on stored allogeneic leukocytes may impair anti-abortive effect *in vivo*. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2005, Vol. 53, no. 1, pp. 13-20.
9. Clark D.A., Dmetrichuk J.M., McCreedy E., Dhesy-Thind S., Arredondo J.L. Changes in expression of the CD200 tolerance-signaling molecule and its receptor (CD200R) by villus trophoblasts during first trimester missed abortion and in chronic histiocytic intervillitis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 78, no. 1. doi: 10.1111/aji.12665.

10. Clark D.A., Gorczynski R.M. Immunological tolerance/acceptance of the semiallogeneic embryo: decidual transforming growth factors and tolerance signaling molecules. Ed. Chaouat G.G., Olivier S., Ledee N.N. Bentham eBooks, 2013, pp. 540-558.
11. Clark D.A., Gorczynski R.M., Blajchman M.A. Transfusion-related immunomodulation due to peripheral blood dendritic cells expressing the CD200 tolerance signaling molecule and alloantigen. *Transfusion*, 2008, Vol. 48, no. 5, pp. 814-821.
12. Clark D.A., Keil A., Chen Z., Markert U., Manuel J., Gorczynski R.M. Placental trophoblast from successful human pregnancies expresses the tolerance signaling molecule, CD200 (OX-2). *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2003, Vol. 50, no. 3, pp. 187-195.
13. Clark D.A., Wong K., Banwatt D. CD200-dependent and nonCD200-dependant pathways of NK cell suppression by human IVIG. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2008, Vol. 25, no. 2-3, pp. 67-72.
14. Fallarino F., Asselin-Paturel C., Vacca C., Bianchi R., Gizzi S., Fioretti M.C., Trinchieri G., Grohmann U., Puccetti P. Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 6, pp. 3748-3754.
15. Fan H., Wang J., Zhou X., Liu Z., Zheng S.G. Induction of antigenspecific immune tolerance by TGF-beta-induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2009, Vol. 2, no. 3, pp. 212-220.
16. Ghanekar A., Mendicino M., Liu H., He W., Liu M., Zhong R., Phillips M.J., Levy G.A., Grant D.R. Endothelial induction of fgl2 contributes to thrombosis during acute vascular xenograft rejection. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 9, pp. 5693-5701.
17. Gorczynski R.M. CD200 and its receptors as targets for immunoregulation. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2005, Vol. 6, no. 5, pp. 483-488.
18. Gorczynski R., Boudakov I., Khatri I. Peptides of CD200 modulate LPS-Induced TNF-alpha induction and mortality *in vivo*. *J. Surg. Res.*, 2008, Vol. 145, no. 1, pp. 87-96.
19. Gorczynski R.M., Cattral M.S., Chen Z. G., Hu J., Lei J., Min W.P., Yu G., Ni J. An immunoadhesin incorporating the molecule OX-2 is a potent immunosuppressant that prolongs allo- and xenograft survival. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 163, no. 3, pp. 1654-1660.
20. Gorczynski R.M., Chen Z., Fu X.M., Zeng H. Increased expression of the novel molecule OX-2 is involved in prolongation of murine renal allograft survival. *Transplantation*, 1998, Vol. 65, no. 8, pp. 1106-1114.
21. Gorczynski R.M., Chen Z., Kai Y., Lei J. Evidence for persistent expression of OX2 as a necessary component of prolonged renal allograft survival following portal vein immunization. *Clin. Immunol.*, 2000, Vol. 97, no. 1, pp. 69-78.
22. Gorczynski R., Chen Z., Shivagnahnam S., Taseva A., Wong K., Yu K., Khatri I. CD200Fc(Gly)6TGFβ suppresses transplant rejection and MLCs *in vitro*. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, Suppl. 1, 49.15.
23. Gorczynski R.M., Hadidi S., Yu G., Clark D.A. The same immunoregulatory molecules contribute to successful pregnancy and transplantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2002, Vol. 48, no. 1, pp. 18-26.
24. Gorczynski R.M., Hu J., Chen Z., Kai Y., Lei J. A CD200Fc immunoadhesin prolongs rat islet xenograft survival in mice. *Transplantation*, 2002, Vol. 73, no. 12, pp. 1948-1953.
25. Holmannová D., Kolácková M., Kondélková K., Kunes P., Krejsek J., Andrýs C. CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part I: CD200/CD200R structure, activation, and function. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2012, Vol. 55, no. 1, pp. 12-17.
26. Mellor A.L., Munn D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, no. 10, pp. 762-774.
27. Rijkers E.S., de Ruiter T., Baridi A., Veninga H., Hoek R.M., Meyaard L. The inhibitory CD200R is differentially expressed on human and mouse T and B lymphocytes. *Mol. Immunol.*, 2008, Vol. 45, no. 4, pp. 1126-1135.
28. Rosenblum M.D., Olsz E., Woodliff J.E., Johnson B.D., Konkol M.C., Gerber K.A., Orentas R.J., Sandford G., Truitt R.L. CD200 is a novel p53target gene involved in apoptosisassociated immune tolerance. *Blood*, 2004, Vol. 103, no. 7, pp. 2691-2698.
29. Saito S., Sasaki Y., Sakai M. CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2005, Vol. 65, no. 2, pp. 111-120.
30. Steckel N.K., Kuhn U., Beelen D.W., Elmaagacli A.H. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance? *Scand. J. Immunol.*, 2003, Vol. 57, no. 2, pp. 185-191.
31. Trabanelli S., Ocadlikova D., Evangelisti C., Parisi S., Curti A. Induction of regulatory T cells by dendritic cells through indoleamine 2,3 dioxygenase: A potent mechanism of acquired peripheral tolerance. *Curr. Med. Chem.*, 2011, Vol. 18, no. 15, pp. 2234-2239.
32. Voehringer D., Rosen D.B., Lanier L.L., Locksley R.M. CD200 receptor family members represent novel DAP12-associated activating receptors on basophils and mast cells. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 52, pp. 54117-54123.
33. Walsh P.T., Strom T.B., Turka L.A. Routes to transplant tolerance versus rejection; the role of cytokines. *Immunity*, 2004, Vol. 20, no. 2, pp. 121-131.
34. Wilczyński J.R. Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia – the same basic mechanism? *Hum. Immunol.*, 2006, Vol. 67, no. 7, pp. 492-511.

35. Wright G., Cherwinski H., Foster-Cuevas M., Brooke G., Puklavec M.J., Bigler M., Song Y., Jenmalm M., Gorman D., McClanahan T., Liu M.R., Brown M.H., Sedgwick J.D., Phillips J.H., Barclay A.N. Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 6, pp. 3034-3046.
36. Yu K., Chen Z., Gorczynski R. Effect of CD200 and CD200R1 expression within tissue grafts on increased graft survival in allogeneic recipients. *Immunol. Lett.*, 2013, Vol. 149, no. 1-2, pp. 1-8.
37. Zenclussen A.C., Gerlof K., Zenclussen M.L., Sollwedel A., Bertoja A.Z., Ritter T., Kotsch K., Leber J., Volk H.D. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am. J. Pathol.*, 2005, Vol. 166, no. 3, pp. 811-822.
38. Zhang S., Phillips H. Identification of tyrosine residues crucial for CD200 mediated inhibition of mast cell activation. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 79, no. 2, pp. 363-368.

Авторы:

Арефьева А.С. — научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Бабаян А.А. — к.м.н., врач акушер-гинеколог, отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Степанова Е.О. — младший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Донцова Т.В. — аспирант, отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Павлович С.В. — к.м.н., доцент, врач акушер-гинеколог, I-е акушерское отделение патологии беременности ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кречетова Л.В. — к.м.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Николаева М.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Arefieva A.S., Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Babayany A.A., PhD (Medicine), Obstetrician-Gynecologist, Department of Assisted Technologies in Treatment of Infertility, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Stepanova E.O., Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Dontsova T.V., Postgraduate Student, Department of Assisted Technologies in Treatment of Infertility, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Pavlovich S.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Obstetrician-Gynecologist, Department of Maternal-Fetal Medicine, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Krechetova L.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Immunology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Nikolaeva M.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

СУБПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И У ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ

**Калашникова А.А., Ворошилова Т.М., Чиненова Л.В.,
Давыдова Н.И., Калинина Н.М.**

*ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства
РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных
бедствий, Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Моноцитам принадлежит ключевая роль в развитии адекватного иммунного ответа при бактериальной инфекции благодаря выполнению ими фагоцитарной, антигенпрезентирующей и секреторной функции. Выделяют три субпопуляции моноцитов: классические $CD14^+CD16^-$, переходные $CD14^+CD16^+$ и неклассические $CD14^{dim}CD16^+$, различающиеся фенотипически и функционально. Соотношение субпопуляций изменяется по мере развития противобактериального ответа. Цель исследования: изучить особенности фенотипа субпопуляций моноцитов у пациентов с сепсисом и изменение их соотношения в зависимости от наличия в крови бактерий; оценить вклад субпопуляций моноцитов в продукцию цитокинов.

В динамике обследовано 16 пациентов с сепсисом (10 мужчин и 6 женщин, возраст 58 ± 14 лет, SOFA $9,4 \pm 2,1$ баллов, проанализировано 44 образца крови). Контрольная группа включала условно здоровых лиц ($n = 23$, 12 мужчин и 11 женщин, возраст 51 ± 13 лет). Выполняли: бактериологический посев, определение абсолютного и относительного количества субпопуляций классических, переходных и неклассических моноцитов и экспрессию ими HLA-DR и CD64, определение концентрации IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-10 в сыворотке.

При сепсисе увеличивается абсолютное количество моноцитов, снижается доля классических и увеличивается относительное и абсолютное количество переходных клеток, субпопуляция неклассических моноцитов меняется незначительно. Соотношение субпопуляций зависит от наличия бактерий в крови: увеличение доли переходных клеток наблюдается при положительных результатах бактериологических посевов. При элиминации бактерий соотношение субпопуляций восстанавливается. При сепсисе увеличивается плотность экспрессии LPS-рецептора CD14, IgG-рецепторов CD16 и CD64, особенно выражено — в субпопуляциях переходных и неклассических моноцитов. Во всех субпопуляциях моноцитов снижается экспрессия HLA-DR, наиболее заметно среди классических моноцитов, наименее — на переходных клетках. Отмечается значительное повышение содержания в сыворотке цитокинов IL-6, IL-1 β , TNF α и IL-10. Определена прямая взаимосвязь между абсолютным количеством классических моноцитов и концентрацией IL-6, а также выраженностью полиорганной дисфункции. По-видимому, повышение абсолютного количества классических моноцитов и IL-6 может быть косвенным критерием оценки степени активации эндотелия — активного продуцента ростовых факторов миелоидного ростка и IL-6. Прямая взаимосвязь между долей $CD14^+CD16^+$ клеток и концентрацией IL-10 в сыворотке свидетельствует о роли переходных моноцитов в его про-

Адрес для переписки:

Калашникова Анастасия Андреевна
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной
и радиационной медицины имени А.М. Никифорова»
Министерства РФ по делам гражданской обороны,
чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий
стихийных бедствий
194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Лебедева, 4/2.
Тел.: 8 (921) 864-23-86.
E-mail: petkova_nas@mail.ru

Address for correspondence:

Kalashnikova Anastasia A.
A. Nikiforov Russian Centre of Emergency
and Radiation Medicine
194044, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Lebedev str., 4/2.
Phone: 7 (921) 864-23-86.
E-mail: petkova_nas@mail.ru

Образец цитирования:

А.А. Калашникова, Т.М. Ворошилова, Л.В. Чиненова,
Н.И. Давыдова, Н.М. Калинина «Субпопуляции
моноцитов у здоровых лиц и у пациентов с сепсисом»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6.
С. 815-824. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-815-824
© Калашникова А.А. и соавт., 2018

For citation:

A.A. Kalashnikova, T.M. Voroshilova, L.V. Chinenova,
N.I. Davydova, N.M. Kalinina "Monocyte subsets in healthy
adults and sepsis patients", *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 6,
pp. 815-824. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-815-824
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-815-824

дукции. IL-10 подавляет антигенпрезентирующую функцию переходных клеток — экспрессию молекул HLA-DR. О последнем свидетельствует обратная зависимость между концентрацией IL-10 и плотностью экспрессии HLA-DR на CD14⁺CD16⁺ клетках. Определена обратная корреляция между степенью полиорганной дисфункции и относительным количеством HLA-DR⁺ моноцитов. Чем выраженнее преобладание среди моноцитов субпопуляции классических, тем заметнее снижение этого показателя. Изучение соотношения субпопуляций моноцитов, особенностей их фенотипа при сепсисе помогает понять механизмы противобактериальной защиты. Мониторинг количества классических моноцитов и концентрации в сыворотке IL-6 необходим для комплексной оценки воспалительного ответа при сепсисе. Определение экспрессии HLA-DR на моноцитах позволяет оценить выраженность иммуносупрессии у тяжелобольных пациентов.

Ключевые слова: субпопуляции моноцитов, сепсис, цитокины, классические моноциты, переходные моноциты, воспаление

MONOCYTE SUBSETS IN HEALTHY ADULTS AND SEPSIS PATIENTS

Kalashnikova A.A., Voroshilova T.M., Chinenova L.V., Davydova N.I., Kalinina N.M.

A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Monocytes play a key role in the development of immune response in bacterial infection, because of their phagocytic, antigen-presenting and secretory functions. There are three subpopulations of monocytes: “classical” CD14⁺CD16⁻, “intermediate” CD14⁺CD16⁺, and “nonclassical” CD14^{dim}CD16⁺. These monocyte subtypes have different phenotypes and functions. The ratio of appropriate subpopulations varies with development of the antibacterial response. The aim of the present research was to study phenotypes of the monocyte subpopulations in the patients with sepsis, and changes in the monocyte subpopulation ratio, depending on the presence of bacteria in circulating blood of the patients, as well as to estimate contribution of the monocyte subpopulations to the cytokine production.

We observed 16 patients with sepsis (10 men and 6 women; mean age, 58±14 years, SOFA 9.4±2.1; a total of 44 blood samples) examined in dynamics. The control group included healthy adults (n = 23, 12 men and 11 women; mean age, 51±13 years). Laboratory studies included bacteriological cultures, determination of absolute and relative numbers of subpopulations of classical, intermediate and non-classical monocytes and their expression of HLA-DR and CD64, determination of IL-6, TNFα, IL-1β, IL-10 concentration in blood serum.

Absolute number of monocytes was increased in the sepsis patients, the ratio of classical monocytes was also increased, like as relative and absolute numbers of intermediate cells. Meanwhile, the subpopulation of non-classical monocytes did not change significantly. The monocyte subpopulation ratio depended on the presence of bacteria in blood, i.e., a higher proportion of intermediate cells was observed in the samples positive for bacteria in blood cultures. The ratio of subpopulations was restored after elimination of bacteria from the circulation. The expression density of LPS receptor (CD14), IgG receptors (CD16 and CD64) was found to be increased, especially in the subpopulations of intermediate and nonclassical monocytes. In all subpopulations of monocytes, expression of HLA-DR is reduced, most notably in classical monocytes, least in intermediate cells. There was a significant increase in serum levels of IL-6, IL-1β, TNFα and IL-10 cytokines. Direct correlation between the absolute number of classical monocytes and IL-6 concentration was revealed, as well as intensity of multiple organ dysfunction. Increase in absolute amount of classical monocytes and IL-6 concentration might serve as an indirect criterion for evaluation of endothelial activation, an active producer of IL-6 and myeloid cell growth factors. A direct correlation between the percentage of CD14⁺CD16⁺ cells and IL-10 concentration in blood serum indicates to an important role of intermediate monocytes in IL-10 production. IL-10 suppresses the antigen-presenting function of intermediate cells, namely, expression of HLA-DR molecules, as suggested by inverse correlation between the IL-10 concentration and HLA-DR expression density on CD14⁺CD16⁺ cells. We have also determined an inverse correlation between the degree of multi-organ dysfunction and relative amount of HLA-DR⁺ monocytes. The larger was a classical monocyte subpopulation, the more noticeable was a decrease of this index. The studies in ratios of monocyte subpopulations help to understand the mechanisms of antibacterial protection in sepsis. Monitoring of classical monocyte numbers and serum concentrations of IL-6 is necessary for a comprehensive assessment of inflammatory response in sepsis. Determination of HLA-DR expression on monocytes allows us to evaluate the intensity of immune suppression in critically ill patients.

Keywords: monocyte subsets, sepsis, cytokines, classical monocytes, intermediate monocytes, inflammation

Введение

Моноциты — клетки врожденного иммунитета, входящие в состав мононуклеарно-фагоцитарной системы, включающей также макрофаги, дендритные клетки и их костномозговые клетки-предшественники. Популяция циркулирующих в периферической крови моноцитов составляет 5–10% от лейкоцитов. Дальнейшая дифференцировка моноцитов в макрофаги или дендритные клетки осуществляется после миграции во внутренние органы [19]. Основными функциями моноцитов являются фагоцитоз апоптотических телец, распознавание молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением тканей (DAMP) или с патогенами (PAMP), синтез цитокинов и презентация антигенов клеткам адаптивного иммунитета.

В зависимости от экспрессии высокоаффинного рецептора к LPS (CD14) и низкоаффинного рецептора к IgG (CD16) принято выделять три субпопуляции моноцитов: классические CD14⁺CD16⁻, переходные CD14⁺CD16⁺ и неклассические CD14^{dim}CD16⁺ [20]. Субпопуляции моноцитов различаются по экспрессии молекул, опосредующих распознавание, фагоцитоз и представление антигенов, что обуславливает их функциональные особенности.

В норме классические моноциты CD14⁺CD16⁻ составляют около 80–85% всей популяции моноцитов. Выраженная экспрессия этими клетками скавенджер-рецепторов [12] свидетельствует о том, что их основная функция — фагоцитоз апоптотических телец. Высокая экспрессия классическими моноцитами рецептора CD11b/CD18 (CR3) позволяет им участвовать в фагоцитозе возбудителей, опсонизированных компонентами комплемента [16]. Классические моноциты экспрессируют CD64 — высокоаффинный рецептор IgG. У неактивированных клеток этот рецептор связан с иммуноглобулином. CD64 располагается в липидных рафтах клеточной мембраны [4] и ассоциирован с рецептором к IFN γ . Связь CD64-IgG позволяет поддерживать сигнальные пути в преактивированном состоянии и способствует быстрому проведению сигнала при связывании IFN γ с рецептором [5, 17, 18]. Участие CD64 в фагоцитозе IgG-опсонизированных антигенов без предварительной активации моноцитов является сомнительным [12, 17]. Среди популяций моноцитов классические моноциты характеризуются наименее выраженной экспрессией HLA-DR и костимуляторных молекул CD80 и CD86 [12], что, возможно, отражает их более скромную роль в антигенпрезентации по сравнению с остальными субпопуляциями моноцитов. Низкая экспрессия этими клетками TLR4 ограничивает их участие в распознавании DAMP и PAMP. В ответ на стимуляцию LPS или *S. aureus* классические моноциты продуцируют цитокины TNF α , IL-1 β , IL-10 и др. [16].

Переходные моноциты CD14⁺CD16⁺ составляют одну из минорных субпопуляций. Принято считать, что эти клетки образуются в результате активации и дифференцировки классических моноцитов [12]. Их основные функции: IgG-опосредованный фагоцитоз, распознавание PAMP и синтез цитокинов, антигенпрезентация. Реализация этих функций возможна благодаря высокой экспрессии CD64 и CD16, CD14 и TLR, HLA-DR и костимуляторных молекул [10, 12, 16]. Переходные моноциты CD14⁺CD16⁺ продуцируют как провоспалительные цитокины (TNF α , IL-1 β и др.), так и противовоспалительный IL-10. В этой популяции клеток отмечается максимальная экспрессия TNF α и IL-10 после стимуляции LPS или *S. aureus*. Переходные моноциты уступают классическим в плотности экспрессии скавенджер-рецепторов и CR3.

Неклассические моноциты CD14^{dim}CD16⁺ с минимальной плотностью экспрессируют CD14 и скавенджер-рецепторы, что ограничивает их участие в распознавании комплекса липополисахарида + ЛПС-связывающий белок и элиминации апоптотических клеток. Неклассические моноциты с максимальной плотностью экспрессируют HLA-DR и костимуляторные молекулы. Антигенпрезентация — одна из основных их функций. Выраженная экспрессия TLR4 приводит к активации этих клеток при взаимодействии с DAMP и PAMP и синтезу цитокинов. В зарубежных исследованиях отмечается высокий уровень продукции TNF α и IL-1 β неклассическими моноцитами в ответ на стимуляцию LPS и *S. aureus*, а также низкий уровень продукции IL-10 [12, 16].

Фагоцитарная, антигенпрезентирующая и секреторная функции моноцитов обуславливают их ключевую роль в иммунном ответе при бактериальной инфекции. Благодаря секреции цитокинов и других продуктов моноциты осуществляют иммунорегуляцию, участвуют в кроветворении, гемостазе и фибринолизе.

В нашем исследовании были сопоставлены особенности фенотипа и продукции цитокинов субпопуляциями моноцитов у пациентов с сепсисом и здоровых лиц. Проведены динамические исследования, в результате которых определена взаимосвязь между увеличением содержания переходных моноцитов в периферической крови септических больных и бактериемией.

Материалы и методы

Исследовали периферическую кровь пациентов с сепсисом отделений реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России (ВЦЭРМ МЧС России). Диагноз «сепсис» устанавливался в соответствии с клиническими критериями (ACCP/SCCM Consensus Conference committee, 1992). Оценку органной дисфункции проводили в бал-

лах по шкале SOFA. Обследовано 16 пациентов с сепсисом, 10 мужчин и 6 женщин, средний возраст 58 ± 14 лет, SOFA $9,4 \pm 2,1$ баллов. У 14 пациентов кровь брали 1-4 раза в зависимости от длительности пребывания в отделении (в среднем 1-2 раза в неделю). Проанализировано 23 образца крови, каждый раз выполняли исследования субпопуляций моноцитов и однократно каждому пациенту — бактериологический посев крови и определение содержания цитокинов. У двух человек взятие крови осуществлялось каждые 2-3 дня, проанализирован 21 образец, каждый раз выполняли иммунологические исследования и бактериологические посевы крови.

Контрольная группа включала условно здоровых лиц ($n = 23$) без острой соматической патологии на момент обследования, проходивших плановое диспансерное обследование во ВЦЭРМ МЧС России. Контрольная группа была сопоставима по полу и возрасту (12 мужчин и 11 женщин, средний возраст 51 ± 13 лет).

Обследования включали: бактериологический посев, определение абсолютного и относительного количества субпопуляций классических, переходных и неклассических моноцитов и экспрессию ими HLA-DR и CD64, определение концентрации цитокинов в сыворотке.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Statistica 10.0. Для расчета взаимосвязей использовали непараметрический корреляционный анализ по Спирмену. Для сравнения групп использовали критерий Манна—Уитни. Результаты представлены в таблицах в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение.

Клинический анализ крови

Кровь брали из локтевой вены, в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА. Пробы анализировали на гемализаторе LH750 (Beckman Coulter, США).

Бактериологический посев

Сбор материала проводили стандартными методами: кровь засеивали в две пары флаконов Bact/Alert 3D (БиоМерье, Франция), инкубировали. Выделенные микроорганизмы идентифицировали с использованием бактериологического анализатора VITEK2 (БиоМерье, Франция), определение чувствительности к антибактериальным препаратам проводили автоматическим методом, применяя соответствующие карты.

Определение относительного и абсолютного количества субпопуляций моноцитов

Кровь брали из локтевой вены, в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА. Применяли антитела: IgG1FITC, CD64FITC, CD14PE, CD16PC5, HLA-DRPC7, CD45APC-AF750 (Beckman Coulter, США). Инкубировали 15 мин в темноте. Для лизиса эритроцитов использовали VersaLyse. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Популяцию моноцитов определяли как CD45⁺SSC^{mod}CD14⁺ клетки. Накапливали

до 5000 событий в моноцитарном регионе. В зависимости от плотности экспрессии CD16 среди CD14⁺ моноцитов выделяли три субпопуляции: CD14⁺CD16⁻ (классические), CD14⁺CD16⁺ (переходные), CD14^{dim}CD16⁺ (неклассические) (рис. 1Г). Для каждой из субпопуляций определяли относительное количество клеток, экспрессирующих CD64 или HLA-DR и плотность экспрессии этих молекул (рис. 2А, Б, В).

Абсолютное количество субпопуляций моноцитов рассчитывали с использованием данных клинического анализа крови.

Определение содержания цитокинов

Методом твердофазного ИФА оценивали содержание в сыворотке крови IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-10 (АО «Вектор-Бест», Россия).

Результаты

При сепсисе по сравнению с нормой отмечается увеличение абсолютного количества моноцитов, снижение доли субпопуляции классических моноцитов и увеличение относительного и абсолютного количества переходных клеток, субпопуляция неклассических моноцитов меняется незначительно (табл. 1).

Фенотип субпопуляций моноцитов у пациентов с сепсисом имеет ряд особенностей (табл. 2).

Экспрессия поверхностных антигенов моноцитами условно здоровых лиц

У здоровых лиц преобладают классические моноциты, на которые приходится более 80%. Переходные и неклассические моноциты составляют минорные субпопуляции (табл. 1).

Плотность экспрессии CD14 классическими и переходными моноцитами сопоставима, тогда как неклассические моноциты экспрессируют CD14 значительно слабее (табл. 2).

CD64 экспрессируют с высокой плотностью практически все клетки субпопуляций классических и переходных моноцитов. Среди неклассических моноцитов только 40% клеток экспрессируют этот рецептор, причем плотность экспрессии ими CD64 более чем в три раза уступает плотности экспрессии CD14⁺CD16⁻ и CD14⁺CD16⁺ клетками.

Экспрессия низкоаффинного IgG рецептора CD16 неклассическими моноцитами почти в 2 раза превышает этот показатель у переходных моноцитов.

Молекулы HLA-DR экспрессируют моноциты всех популяций, однако плотность экспрессии различна. Плотность экспрессии HLA-DR популяциями CD16⁺ моноцитов в два раза и более превышает этот показатель у классических моноцитов. В норме субпопуляции переходных и неклассических моноцитов имеют сходную плотность экспрессии HLA-DR.

Экспрессия поверхностных антигенов моноцитами пациентов с сепсисом

Выявлена тенденция к увеличению плотности экспрессии CD14-моноцитами пациентов с сеп-

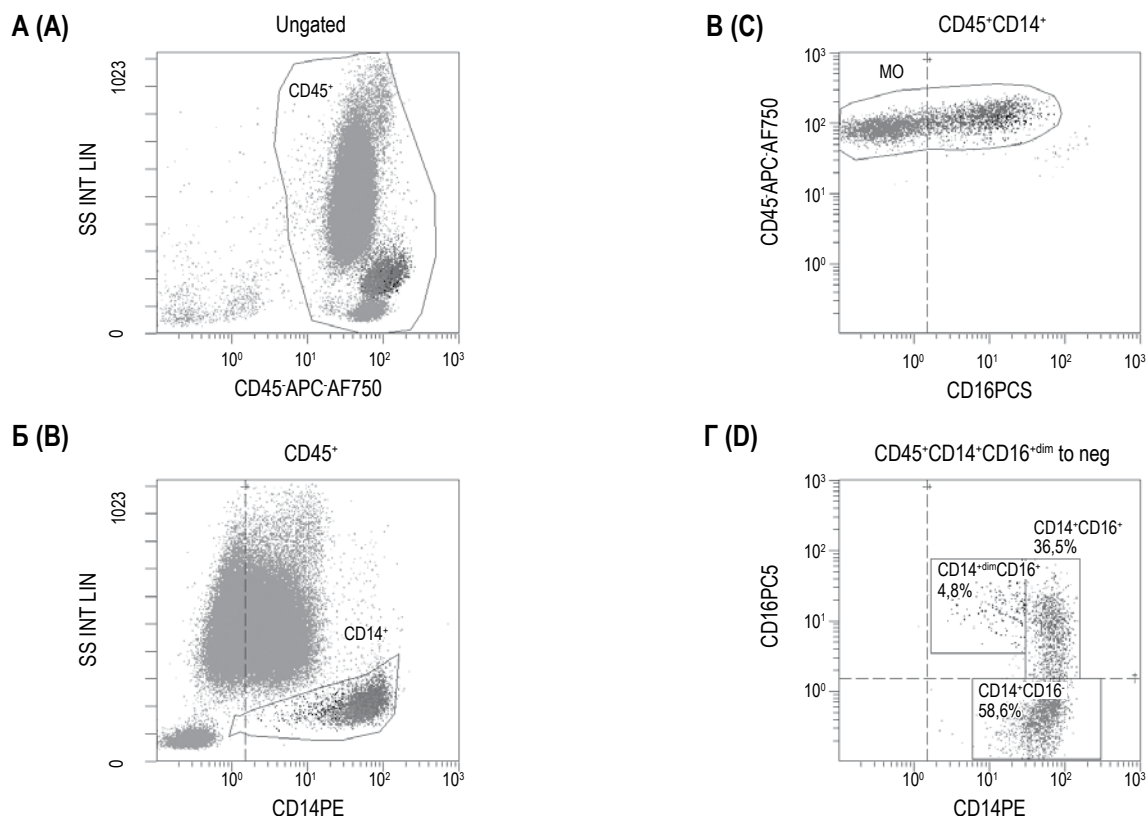


Рисунок 1. Стратегия гейтирования субпопуляций моноцитов

Примечание. А – выделение лейкоцитов по панлейкоцитарному антигену CD45 (CD45 против бокового светорассеяния); Б – гейтирование CD14-позитивных клеток, включая слабопозитивные (CD14 против бокового светорассеяния); В – исключение из зоны анализа примеси гранулоцитов CD45^{dim}CD16^{bright} (CD16 vs CD45); Г – определение субпопуляций моноцитов по распределению маркеров CD14 и CD16: CD14⁺CD16⁻ классические, CD14⁺CD16⁺ переходные, CD14^{dim}CD16⁺ неклассические.

Figure 1. Gating strategy fore identification of monocyte subsets

Note. A, identification of leucocyts by leucocyte common antigen CD45 (CD45 vs side scatter); B, gating CD14⁺ cells with CD14^{dim} (CD14 vs side scatter); C, exclusion of neutrophils CD45^{dim}CD16^{bright} (CD16 vs CD45); D, identification of monocyte subsets on CD14 and CD16 surface expression: CD14⁺CD16⁻ classical, CD14⁺CD16⁺ intermediate, CD14^{dim}CD16⁺ nonclassical.

сисом, наиболее выраженная в субпопуляциях переходных и неклассических моноцитов.

У пациентов с сепсисом отмечается двукратное увеличение плотности экспрессии CD64 всеми субпопуляциями моноцитов, доля CD64⁺ неклассических моноцитов возрастает практически до 100%. В отличие от аналогичных показателей моноцитов контрольной группы, плотность экспрессии CD64 переходными моноцитами сопоставима, а в ряде случаев и превышает плотность экспрессии этого рецептора классическими моноцитами. Плотность экспрессии CD16 переходными и неклассическими моноцитами также заметно превышает показатель здоровых лиц.

Относительное количество HLA-DR⁺ моноцитов и плотность экспрессии HLA-DR у пациентов с сепсисом ниже нормальных значений, особенно выражены эти изменения в субпопуляции классических моноцитов, в минимальной степени – на переходных моноцитах.

Содержание цитокинов в сыворотке здоровых лиц и пациентов с сепсисом

В сыворотке пациентов с сепсисом по сравнению с нормой отмечалось выраженное повышение содержания цитокинов IL-6, IL-1 β , TNF α и IL-10 (табл. 3).

Для того чтобы сопоставить изменения концентрации цитокинов в сыворотке в зависимости от соотношения субпопуляций моноцитов, все образцы крови пациентов с сепсисом были разделены на две группы. В первую вошли пробы с относительным количеством классических моноцитов, близким к норме – более 85%, во вторую – со снижением относительного количества классических моноцитов менее 85% за счет увеличения доли переходных клеток (табл. 4). Результаты трех образцов были исключены из анализа, поскольку в этих образцах снижение субпопуляции классических моноцитов сопровождалось увеличением доли как переходных, так и неклассических клеток.

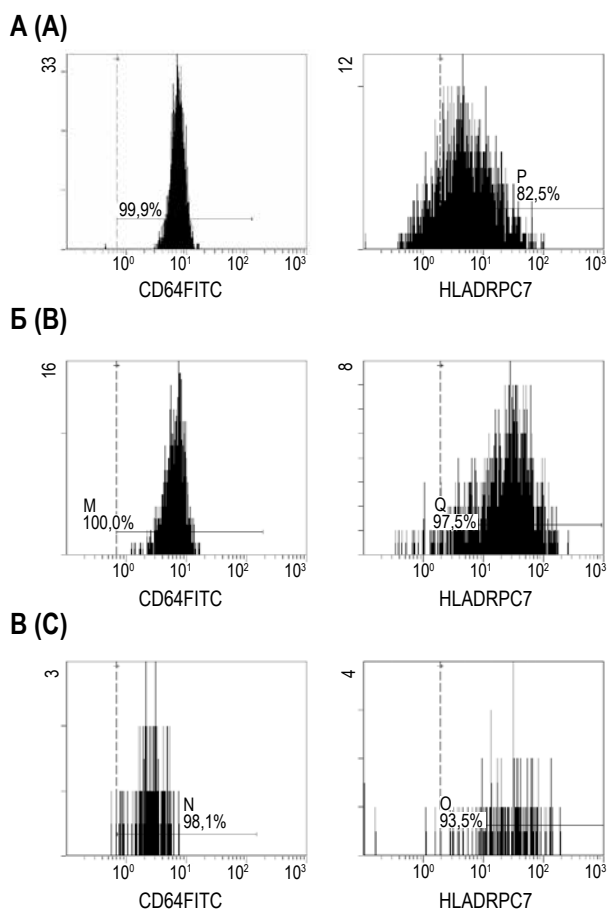


Рисунок 2. Различная экспрессия CD64 и HLA-DR субпопуляциями моноцитов

Примечание. А – классические моноциты CD14⁺CD16⁻; Б – переходные моноциты CD14⁺CD16⁺; В – неклассические моноциты CD14⁺dimCD16⁺.

Figure 2. Differential expression of CD64, and HLA-DR of monocyte subsets

Note. A, classical monocytes CD14⁺CD16⁻; B, intermediate monocytes CD14⁺CD16⁺; C, nonclassical monocytes CD14⁺dimCD16⁺.

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

TABLE 1. SUBPOPULATION PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES IN THE GROUP OF PATIENTS WITH SEPSIS, AND HEALTHY CONTROL GROUP (DONORS)

	Общее количество моноцитов Monocytes, total		CD14 ⁺ CD16 ⁻ Классические Classical		CD14 ⁺ CD16 ⁺ Переходные Intermediate		CD14 ⁺ dimCD16 ⁺ Неклассические Nonclassical	
	%	× 10/л × 10/l	%	× 10/л × 10/l	%	× 10/л × 10/l	%	× 10/л × 10/l
Доноры Donors (n = 23)	8,5 ±1,3	0,5 ±0,1*	84,4 ±4,8	0,4 ±0,1	9,4 ±4,1*	0,04 ±0,02*	5,6 ±1,9	0,03 ±0,01
Сепсис Sepsis (n = 44)	6,6 ±2,9	0,9 ±0,4*	72,5 ±10,8	0,6 ±0,3	21,3 ±11,9*	0,2 ±0,1*	5,7 ±3,4	0,05 ±0,04

Примечание. * – $p < 0,05$ – статистически достоверные различия показателей между группами пациентов с сепсисом и здоровых лиц.

Note. *, $p < 0.05$, statistical significance of the differences between group of patients with sepsis, and healthy control group (donors).

Корреляционный анализ выявил прямую взаимосвязь между содержанием в сыворотке IL-10 и относительным количеством переходных моноцитов, а также между концентрацией IL-10 и TNF α . Выявлена прямая связь между абсолютным количеством субпопуляций классических моноцитов и концентрацией IL-6.

Сопоставление динамики изменения содержания субпопуляций моноцитов у пациентов с сепсисом и результатов бактериологического исследования крови

У двух пациентов с сепсисом были проведены динамические наблюдения изменений количества субпопуляций моноцитов в периферической крови. Результаты сопоставлялись с результатами бактериологических посевов крови. Выявлено, что появление микроорганизмов в крови сопровождалось увеличением относительного количества переходных моноцитов. При отрицательных результатах бактериологического исследования крови популяция переходных моноцитов снижалась до значений, близких к норме. Отмечена прямая сильная взаимосвязь между увеличением доли переходных моноцитов и наличием бактерий в крови ($p < 0,05$). Динамика изменений показателей для одного из пациентов представлена на рисунке 3.

Обсуждение

Определение субпопуляций моноцитов в периферической крови с использованием проточной цитометрии вызывает некоторые затруднения, связанные с вариабельностью плотности экспрессии моноцитарных маркеров CD14, HLA-DR различными субпопуляциями моноцитов. Применяются разнообразные стратегии гейтирования, направленные на выделение моноцитов без примеси NK-клеток (SS^{dim}CD14⁺CD16⁺HLA-DR^{dim} to neg) или нейтрофилов (SS^{bright}CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁻) [8].

ТАБЛИЦА 2. СРАВНЕНИЕ ФЕНОТИПА СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ
TABLE 2. COMPARISON OF MONOCYTE SUBPOPULATIONS PHENOTYPES IN THE GROUP OF PATIENTS WITH SEPSIS, AND HEALTHY CONTROL GROUP (DONORS)

Маркер Parameter	Ед. Unit	Группа Group	CD14 ⁺ CD16 ⁻	CD14 ⁺ CD16 ⁺	CD14 ⁺ dimCD16 ⁺
CD14	mean	Норма Donors	30,0±6,2*	29,8±8,6**	4,1±0,9* **
		Сепсис Sepsis	30,6±13,1*	36,4±13,3**	6,6±2,8* **
CD64	%	Норма Donors	98,8±0,8*	99,3±0,7**	41,6±11,3# * **
		Сепсис Sepsis	100±0,0	99,9±0,2	94,8±5,4
	mean	Норма Donors	2,9±0,5# *	2,4±0,4# **	0,8±0,1# * **
		Сепсис Sepsis	5,5±1,8# *	5,5±1,8***	2,1±0,7# * **
CD16	mean	Норма Donors	0,5±0,1	5,2±1,2# **	8,7±3,4**
		Сепсис Sepsis	0,5±0,1	9,0±4,4# **	19,5±9,1# **
HLA-DR	%	Норма Donors	99,8±0,1#	99,2±0,5	99,8±0,2#
		Сепсис Sepsis	78,5±14,5#	89,4±8,5#	91,8±6,7#
	mean	Норма Donors	21,3±2,9# * **	53,2±11,1*	54,5±10,9# **
		Сепсис Sepsis	7,8±4,2# * **	41,6±18,1* ***	31,0±14,0# * ** ***

Примечание. # – $p < 0,05$ – статистически достоверные различия показателей между группами пациентов с сепсисом и здоровых лиц; * – статистически достоверные отличия значения показателя в субпопуляции классических моноцитов (CD14⁺CD16⁻) по сравнению с другими субпопуляциями; ** – статистически достоверные отличия значения показателя в субпопуляции неклассических моноцитов (CD14⁺dimCD16⁺) по сравнению с другими субпопуляциями; *** – статистически достоверные отличия значения показателя в субпопуляции переходных моноцитов (CD14⁺CD16⁺) по сравнению с другими субпопуляциями.

Note. #, $p < 0.05$, statistical significance of the differences between groups of patients with sepsis, and donors; *, statistical significance of the differences between classical monocytes (CD14⁺CD16⁻), and other monocyte subpopulations; **, statistical significance of the differences between nonclassical monocytes (CD14⁺dimCD16⁺), and other monocyte subpopulations; ***, statistical significance of the differences between intermediate monocytes (CD14⁺CD16⁺), and other monocyte subpopulations.

ТАБЛИЦА 3. СРАВНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ
TABLE 3. COMPARISON OF SERUM LEVEL OF CYTOKINES IN THE GROUP OF PATIENTS WITH SEPSIS, AND HEALTHY CONTROL GROUP (DONORS)

	IL-6, пг/мл pg/ml	IL-1β, пг/мл pg/ml	TNFα, пг/мл pg/ml	IL-10, пг/мл pg/ml
Здоровые лица Donors (n = 23)	3,0±3,2*	2,8±2,6*	2,3±2,6*	8,8±8,1*
Сепсис Sepsis (n = 35)	91,3±81,3*	41,7±12,3*	22,0±27,2*	34,0±37,2*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 4. СРАВНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКАХ ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ В ГРУППАХ С РАЗЛИЧНЫМ СООТНОШЕНИЕМ КЛАССИЧЕСКИХ И ПЕРЕХОДНЫХ МОНОЦИТОВ

TABLE 4. COMPARISON OF SERUM LEVEL OF CYTOKINES IN GROUPS OF PATIENTS WITH SEPSIS WITH DIFFERENCE RATIO OF CLASSICAL AND INTERMEDIATE MONOCYTES

	IL-6, пг/мл pg/ml	IL-1 β , пг/мл pg/ml	TNF α , пг/мл pg/ml	IL-10, пг/мл pg/ml
Группа 1 Group 1 (n = 17)	106,6 $\pm$ 111,1	15,0 $\pm$ 14,6	15,5 $\pm$ 11,6	17,8 $\pm$ 18,5*
Группа 2 Group 2 (n = 15)	77,0 $\pm$ 42,2	14,4 $\pm$ 10,3	30,4 $\pm$ 36,2	52,1 $\pm$ 45,0*

Примечание. * – $p < 0,01$ статистически достоверные различия показателей между группами.

Note. *, $p < 0.01$, statistical significance of the differences between groups.

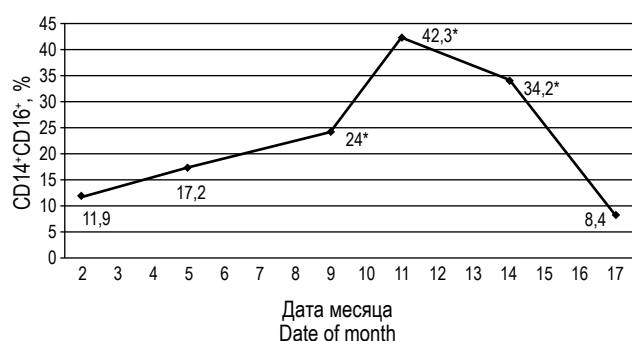


Рисунок 3. Изменения относительного количества переходных моноцитов в зависимости от наличия бактерий в крови у пациентки с сепсисом

Примечание. Пациентка Г., 79 лет. Диагноз: сепсис.

* – значения относительного количества CD14⁺CD16⁺ моноцитов при положительных результатах бактериологических исследований.

Figure 3. Change in the intermediate monocyte rate, depending on the presence of bacteria in the blood of the patient with sepsis

Note. Patient G., 79 years old. Ds: sepsis. *, CD14⁺CD16⁺ monocyte rate (%) in case of positive results of blood culture.

Используемая в нашем исследовании стратегия гейтирования субпопуляций моноцитов как CD14⁺SSC^{mod}CD45^{mod} клеток позволила получить значения относительного количества субпопуляций классических, переходных и неклассических моноцитов у здоровых лиц, сопоставимые с данными литературы.

Моноцитам принадлежит ключевая роль в развитии адекватного иммунного ответа при бактериальной инфекции. Эти клетки выполняют множество функций для инициации, поддержания и негативной регуляции воспаления. Абсолютная лимфопения у септических больных с выраженным снижением абсолютного и относительного количества регуляторных популяций лимфоцитов приводит к возрастанию роли моноцитов как регуляторных клеток. У пациентов с бактериальным сепсисом наблюдается абсолютный моноцитоз, при котором увеличи-

вается количество классических и, более выражено, количество переходных моноцитов. Эти субпопуляции различаются фенотипически и функционально, их соотношение изменяется по мере развития противобактериального ответа. В норме классические моноциты составляют более 85%, их основная функция – поддержание гомеостаза путем элиминации апоптотических телец. Классические моноциты выполняют также надзорную функцию – распознавание бактерий и их продуктов. Связывание TLR4 на поверхности классических моноцитов приводит к активации MyD88-зависимого пути проведения сигнала и синтезу провоспалительных цитокинов IL-6, TNF α , IL-1 β [15]. Продукция IL-6 регулирует дифференцировку плазматических клеток и синтез антител, тогда как провоспалительные цитокины, в том числе TNF α , стимулируют экспрессию CD64- и CD16-рецепторов к иммуноглобулинам. После встречи с бактериями классические моноциты дифференцируются в CD14⁺CD16⁺ клетки. В нашем исследовании отмечена корреляция между концентрацией TNF α в сыворотке и плотностью экспрессии высокоаффинного рецептора к IgG CD64 на всех популяциях моноцитов. Образующиеся *de novo* CD64 и CD16 способствуют усилению фагоцитоза IgG-опсонизированных бактерий. Переходные моноциты оптимально приспособлены для выполнения функций распознавания бактериальных фрагментов, фагоцитоза и презентации антигенов клеткам приобретенного иммунитета. При бактериальной инфекции повышение этой популяции необходимо для эффективной элиминации возбудителя. CD14⁺CD16⁺ клетки, с одной стороны, активно продуцируют провоспалительные цитокины, с другой – стремятся ограничить иммунный ответ, синтезируя IL-10 на стадии поздней активации [12, 14]. Изменение пула цитокинов связано с активацией TRIF-зависимого сигнального пути, который задействуется при одновременном связывании CD16 и TLR4 [15]. Выявленная нами прямая корреляционная зависимость между концентрацией в сыворотке IL-10 и относительным количеством

переходных моноцитов CD14⁺CD16⁺ подтверждает данные литературы о том, что среди субпопуляций моноцитов эти клетки являются основными продуцентами IL-10 при сепсисе [16]. IL-10 подавляет LPS-индуцированную активацию моноцитов, снижает продукцию провоспалительных цитокинов и подавляет антигенпрезентирующую функцию переходных клеток. В нашем исследовании выявлена обратная корреляционная зависимость между концентрацией в сыворотке IL-10 и плотностью экспрессии HLA-DR на CD14⁺CD16⁺ клетках. Существуют сообщения о том, что IL-10 снижает экспрессию HLA-DR на всех субпопуляциях моноцитов [10] вследствие подавления активности регулятора транскрипции гена HLA-DR – СИТА (MHC class II transactivator) [11]. Под воздействием IL-10 изменяется фенотип антигенпрезентирующих клеток – уменьшается относительное количество воспалительных CD14⁺CD16⁺ и увеличивается доля CD14⁺CD16⁻ моноцитов, выполняющих сканденджер-функцию – восстанавливается нормальное соотношение классических и переходных моноцитов. Некоторое время классические моноциты имеют фенотип, отличный от нормы, а именно сниженную экспрессию HLA-DR и ко-стимуляторных молекул, тем более выраженную, чем выше была продукция IL-10. Как правило, такой цикл является оптимальным для элиминации возбудителя из крови и предотвращения повреждения макроорганизма продуктами воспаления.

Длительная персистенция в крови бактерий или эндотоксина, а также продуктов разрушения тканей приводит к гиперпродукции IL-6 классическими моноцитами и эндотелиоцитами сосудов. Активированному васкулярному эндотелию принадлежит центральная роль в инициации и регуляции системного воспалительного ответа при эндотоксемии и бактериальном сепсисе [3,

21]. Активированные эндотелиоциты продуцируют IL-6 и ростовые факторы миелоидного роста, стимулирующие выход из костного мозга моноцитов с «наивным» классическим фенотипом. Повышение абсолютного количества классических моноцитов и содержания в сыворотке IL-6, ассоциированного с плохим прогнозом у септических больных [7], может быть косвенным критерием оценки степени активации эндотелия, что объясняет выявленную нами взаимосвязь между абсолютным количеством классических моноцитов и выраженностью полиорганной дисфункции по шкале SOFA.

IL-6, наряду с IL-10, способен оказывать иммуносупрессорное действие, снижая экспрессию молекул HLA-DR на поверхности антигенпрезентирующих клеток [6, 9]. Возможно, снижение экспрессии HLA-DR при сепсисе, особенно выраженное в субпопуляции классических моноцитов, связано в том числе с продолжительной гиперпродукцией IL-6. В многочисленных исследованиях снижение экспрессии HLA-DR моноцитами крови тяжелобольных пациентов рассматривается как предиктор развития нозокомиальных инфекций и фактор неблагоприятного прогноза [1, 2, 11]. В настоящей работе определена обратная зависимость между степенью полиорганной дисфункции и относительным количеством HLA-DR⁺ моноцитов. Следует заметить, что чем большую долю от общего количества моноцитов составляют классические CD14⁺CD16⁻, тем более снижено относительное количество клеток, экспрессирующих HLA-DR. Мониторинг изменений абсолютного и относительного количества классических моноцитов и концентрации в сыворотке IL-6 необходим для комплексной оценки воспалительного ответа при сепсисе. Определение экспрессии HLA-DR на моноцитах позволяет оценить выраженность иммуносупрессии у тяжелобольных пациентов.

Список литературы / References

1. Лазанович В.А., Маркелова Е.В., Смирнов Г.А., Смолина Т.П. Клиническая значимость экспрессии Toll2, Toll4, CD14, HLA-DR на моноцитах у пациентов с сепсисом // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 3. С. 221-228. [Lazanovich V.A., Markelova E.V., Smirnov G.A., Smolina T.P. Clinical significance of Toll2, Toll4, CD14, and HLA-DR expression on the monocytes in patients with sepsis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 221-228. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2015-3-221-228.
2. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Цитометрический анализ в клинической иммунологии. Екатеринбург: УрО РАН, 2011. 220 с. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Chereshevnev V.A. Cytometric analysis in clinical immunology]. Ekaterinburg: UB RAS, 2011. 220 p.
3. Andonegui G., Zhou H., Bullard D., Kelly M.M., Mullaly S.C., McDonald B., Long E.M., Robbins S.M., Kubes P. Mice that exclusively express TLR4 on endothelial cells can efficiently clear a lethal systemic Gram-negative bacterial infection. *J. Clin. Invest.*, 2009 Vol. 119, no. 7, pp. 1921-1930.
4. Beekman J.M., van der Linden J.A., van der Winkel J.G., Leusen J.H. FcγRI (CD64) resides constitutively in lipid rafts. *Immunol. Lett.*, 2008, Vol. 116, no. 2, pp. 149-155.
5. Bezbradica J.S., Rosenstein R.K., DeMarco R.A., Brodsky I., Medzhitov R. A role for the ITAM signaling module in specifying cytokine-receptor function. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 4, pp. 333-342.
6. Braun D.A., Fribourg M., Sealfon S.C. Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 5, pp. 2986-2993.
7. Chaudhry H., Zhou J., Zhong Y., Ali M.M., McGuire F., Nagarkatti P.S., Nagarkatti M. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo*, 2013, Vol. 27, no. 6, pp. 669-684.
8. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.*, 2014, no. 5, p. 514.

9. Kitamura H., Ohno Y., Toyoshima Y., Ohtake J., Homma S., Kawamura H., Takahashi N., Taketomi A. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci.*, 2017, Vol. 108, no. 10, pp. 1947-1952.
10. Lee J., Tam H., Adler L., Iltstad-Minnihan A., Macaubas C., Mellins E.D. The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 8, e0183594. doi: 10.1371/journal.pone.0183594.
11. Lucaszewicz A.-C., Faivre V., Payen D. Is monocyte HLA-DR expression monitoring a useful tool to predict the risk of secondary infection? *France Minerva Anesthesiol.*, 2010, Vol. 76, no. 9, pp. 737-743.
12. Mukherjee R., Kanti Barman P., Kumar Thatoi P., Tripathy R., Kumar Das B., Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in sepsis and System Lupus Erythematosus. *Sci. Rep.*, 2015, no. 5, 13886. doi: 10.1038/srep13886.
13. Rosales C. Molecular mechanisms of phagocytosis. Medical intelligence unit. New York: Springer science + Business media, 2005. 165 p.
14. Samarasinghe R., Taylor P., Tamura T., Kaisho T., Akira S., Ozato K. Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2006, Vol. 26, no. 12, pp. 893-900.
15. Shalova I.N., Kajiji T., Lim J.Y., Gomes-Pina V., Fernandez-Ruiz I., Arnalich F., Iau P.T., Lopez-Collazo E., Wong S.C., Biswas S.K. CD16 regulates TRIF-dependent TLR4 response in human monocytes and their subsets. *J. Immunol.*, 2012, no. 188, pp. 3584-3593.
16. Skrzeczynska-Moncznik J., Brownska M., Loseke S., Grage-Griebenow E., Zembala M., Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high}CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.*, 2008, Vol. 67, no. 2, pp. 152-159.
17. Swisher J.F., Feldman G.M. The many faces of FcγRI: implication for therapeutic antibody function. *Immunol. Rev.*, 2015, Vol. 268, no. 1, pp. 160-174.
18. van der Poel C.E., Spaapen R.M., van der Winkel J.G., Leusen J.H.W. Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, FcγRI. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 5, pp. 2699-2704.
19. Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X.-F., Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research.*, 2014, Vol. 2, no. 1, p. 1.
20. Ziegler-Heitbrock L., Hofer T.P. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol.*, 2013, no. 4, p. 23.
21. Ye X., Ding J., Zhou X., Chen G., Liu S.F. Divergent roles of endothelial NF-κappaB in multiple organ injury and bacterial clearance in mouse models of sepsis. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 6, pp. 1303-1315.

Авторы:

Калашникова А.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий, Санкт-Петербург, Россия

Ворошилова Т.М. — к.м.н., заведующая лабораторией бактериологических исследований ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий, Санкт-Петербург, Россия

Чиненова Л.В. — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий, Санкт-Петербург, Россия

Давыдова Н.И. — к.м.н., старший научный сотрудник, заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий, Санкт-Петербург, Россия

Калинина Н.М. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kalashnikova A.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Voroshilova T.M., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Bacteriological Studies, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Chinenova L.V., PhD (Medicine), Physician, Laboratory of Clinical Immunology, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Davydova N.I., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Head, Laboratory of Clinical Immunology, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kalinina N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 27.12.2017
Принята к печати 08.02.2018

Received 27.12.2017
Accepted 08.02.2018

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ЦИТОКИНОВОГО БАЛАНСА И ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ОБТУРАЦИИ ЖЕЛЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Карпунина Т.И., Годовалов А.П., Бусырев Ю.Б.

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера»
Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Резюме. Исследование выполнено с целью оценки перспективности сочетанного использования лейкоцитарных и цитокиновых индексов при обтурации желчевыводящих путей различного генеза.

Проведено обследование больных с механической желтухой опухолевого (14 человек) и неопухолевого (16 человек) генеза, у которых перед операцией в сыворотке крови определяли концентрацию цитокинов (IL-1, IL-4, IL-8, TNF α). О суммарной активности эндогенных медиаторов воспаления судили по величине индекса воспалительной активности (ИВА), который рассчитывали по формуле ИВА = (IL-1 + TNF α)/IL-4. Дополнительно вычисляли ряд лейкоцитарных индексов. Клеточный компонент в индексной оценке дает возможность уточнить степень выраженности воспалительной реакции, предположить направленность функциональной активности иммунокомпетентных клеток.

Показано, что ИВА при наличии злокачественных процессов существенно выше, чем при доброкачественных. Гиперактивация иммунного ответа при опухолях может быть обусловлена значительным преобладанием провоспалительных цитокинов. Более того, в случаях с опухолевым перерождением, как с холангитом, так и без него, индексная оценка гуморальной и клеточной составляющей позволяет предположить возникновение проблем с регенерацией вследствие провоспалительной направленности иммунного ответа, что не обеспечивает активации соответствующих реакций. Установлено, что у пациентов с комбинацией злокачественного процесса и холангита лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) увеличен, а индекс иммунореактивности (ИИР) снижен, а при отсутствии холангита наблюдается противоположная картина, когда ЛИИ несколько снижен, а ИИР повышен. При проведении корреляционного анализа для пациентов с холангитом показана высокая степень ассоциированности цитокинового дисбаланса и эндогенной интоксикации.

Таким образом, очевидна привлекательность использования комплекса цитокинового и лейкоцитарных индексов, когда каждый из них отражает определенную часть процесса, а их совокупность дает целостную картину патологии и позволяет прогнозировать развитие заболевания. Такой подход, по мнению авторов, повышает диагностическую значимость определения иммунологических показателей, в первую очередь продукции цитокинов, и может быть использован в прогнозировании возникновения осложнений при хирургическом лечении заболевания.

Ключевые слова: индексная оценка, лейкоцитарный индекс интоксикации, цитокиновый баланс, индекс воспалительной активности, комплекс интегральных показателей, индекс иммунореактивности

Адрес для переписки:

Годовалов Анатолий Петрович
ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера»
Министерства здравоохранения РФ
614000, Россия, г. Пермь, ул. Екатерининская, 85.
Тел.: 8 (912) 981-51-00.
E-mail: AGodovalov@gmail.com

Address for correspondence:

Godovalov Anatoliy P.
E. Wagner Perm State Medical University
614000, Russian Federation, Perm, Ekaterininskaya str., 85.
Phone: 7 (912) 981-51-00.
E-mail: AGodovalov@gmail.com

Образец цитирования:

Т.И. Карпунина, А.П. Годовалов, Ю.Б. Бусырев
«Методические подходы к оценке цитокинового баланса и лейкоцитарной реакции при обтурации желчевыводящих путей различного генеза»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 825–832.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-825-832
© Карпунина Т.И. и соавт., 2018

For citation:

T.I. Karpunina, A.P. Godovalov, Yu.B. Busyrev
“Methodological aspects of evaluating cytokine profile and leukocyte reaction in bile duct obturation of different origin”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2018, Vol. 20, no. 6, pp. 825–832.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-825-832
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-825-832

TECHNICAL ASPECTS OF EVALUATING CYTOKINE PROFILE AND LEUKOCYTE REACTION IN BILE DUCT OBSTRUCTION OF DIFFERENT ORIGIN

Karpunina T.I., Godovalov A.P., Busyrev Yu.B.

E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Abstract. The study was carried out to assess the prospects for the combined use of leukocyte and cytokine indices in the bile duct obstruction of different genesis.

We have performed a study of the patients with mechanical jaundice, either due to tumor (14 persons), or non-tumor genesis (16 persons). Concentrations of cytokines (IL-1, IL-4, IL-8, TNF α) were determined in blood serum before surgical intervention. The total activity of endogenous inflammatory mediators in the serum of patients was estimated as an index of inflammatory activity (IVA), which was calculated using the following formula: $IVA = (IL-1 + TNF\alpha)/IL-4$. In addition, a number of leukocyte indices were calculated. The cellular component in the index estimation makes it possible to clarify the intensity of the inflammatory reaction, and to suggest the direction of the functional changes among the immunocompetent cells.

It was shown that IVA in presence of malignancy is significantly higher than in benign conditions. Overactivation of immune response in tumors may be caused by a significant predominance of pro-inflammatory cytokines. Moreover, in cases of malignant tumor growth, both with or without cholangitis, the index scores of humoral and cellular components let us suggest the some problems with regeneration, due to pro-inflammatory domination of immune response, which does not ensure activation of the corresponding reactions. It has been established that the leukocyte intoxication index (LII) is increased, in patients with a combination of malignant disorder and cholangitis, and the immunoreactivity index (MDI) is lowered. In absence of cholangitis, the opposite pattern is observed, when LII is slightly lowered and MDI is elevated. Correlation analysis for the patients with cholangitis revealed a high association of cytokine imbalance and endogenous intoxication.

A complex of cytokine and leukocyte indices is promising, when each of them reflects a certain part of the process, and their combination gives an integral picture of the pathology and allows to predict development of the disease. Such an approach, seems to increase the diagnostic significance of these immunological indices, primarily, the cytokine production, and may be used when predicting occurrence of complications in the surgical treatment of the disease.

Keywords: index scoring, leukocyte intoxication index, cytokine balance, index of inflammatory activity, complex of integral indexes, immunoreactivity index

Введение

Обтурация желчевыводящих путей (ОЖП) и в наши дни остается одной из актуальных проблем билиарной хирургии, а ее успешное решение представляет собой чрезвычайно сложную научно-практическую задачу. По современным представлениям, при ОЖП, в том числе в развитии осложнений при хирургическом лечении, существенна роль нарушений в иммунной системе [14]. Известно, что секретируемые иммуннокомпетентными клетками многочисленные растворимые медиаторы, прежде всего цитокины, как индукторы и регуляторы иммунного ответа, обладают многообразными биологическими эффектами. Они определяют характер иммунных реакций, активируют все типы лейкоцитов, клетки эндотелия, формируют сети коммуникационных сигналов между компонентами иммунной системы и другими органами и тканями, запускают иммунный ответ, а также стимулируют об-

разование и высвобождение вторичных медиаторов, в том числе молекул свободных радикалов [1, 16]. Поскольку ОЖП приводит к холестазу с прогрессирующей гипертензией, возникают глубокие нарушения гомеостаза, отмечается иммуносупрессия и накопление в крови токсических продуктов, зачастую развивается острый холангит, втрое увеличивая летальность [17]. При этом на фоне угнетения клеточного и активации гуморального звена иммунного ответа (ИО) наблюдается дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов. Исследования последних лет со всей очевидностью показали, что иммуннокомпетентные клетки и продуцируемые ими цитокины играют исключительно важную роль в патогенезе многих длительно протекающих заболеваний [6, 18, 24], в том числе в прогрессирующем повреждении печени и развитии печеночной недостаточности на фоне холестаза, доброкачественной механической желтухи, либо канцерогенеза [2,

19, 20, 22]. Вместе с тем многие вопросы остаются неизученными. В частности, отсутствуют данные о соотношении уровня цитокинов и маркеров холестатического и цитолитического синдромов при печеночной недостаточности. Остается открытым вопрос о прогностическом значении интерлейкинов при заболеваниях желчевыводящих путей, осложненных ОЖП различной этиологии [21, 23].

Определение цитокинов в клинике преследует различные цели: оценку тяжести течения процесса, эффективности терапии, прогнозирование и др. [10]. Предпринимаются и попытки использования определения цитокинов для диагностики, что, по вполне понятным причинам, до настоящего времени пока не обосновано. Нередкая однозначность, а иногда и категоричность трактовок определения цитокинов при различной патологии вызывает определенную настороженность, которая обусловлена следующими объективными фактами: 1) продолжается идентификация все новых цитокинов и генов, которые их кодируют; 2) биологические эффекты многих цитокинов, в частности интерлейкинов, имеют высокую степень идентичности; 3) многие цитокины способны взаимодействовать со структурами одних и тех же рецепторных комплексов [1].

Еще в первой половине прошлого столетия Я.Я. Кальф-Калифом [4] было предложено использовать показатели лейкоцитарной формулы в индексном выражении для характеристики степени эндогенной интоксикации (ЭИ) в организме человека и животных. К настоящему времени, благодаря исследователям, использующим такой подход, удалось дополнить новыми и модифицировать предложенные ранее индексы [3, 5, 12]. Авторами установлено, что они имеют диагностическое и прогностическое значение, так как позволяют оценить работу эффекторных механизмов иммунной системы, а также уровень иммунологической реактивности, определяя процесс формирования неспецифических адаптационных реакций [11, 15]. Однако в доступной литературе мы не встретили описаний опыта исследователей по комплексной оценке состояния хирургических больных с учетом лейкоцитарных индексов и баланса основных про- и противовоспалительных цитокинов. Проведение исследований в этом аспекте сохраняет свою актуальность.

Цель исследования — оценить перспективность сочетанного использования лейкоцитарных и цитокиновых индексов при обтурации желчевыводящих путей различного генеза.

Материалы и методы

В исследование были включены 30 пациентов с механической желтухой опухолевого (14 че-

ловек) и неопухолевого (16 человек) генеза, у которых в 2 и 6 случаях, соответственно, был зарегистрирован холангит. При обследовании применяли стандартные клинические и лабораторные методы, а также ультразвуковое исследование гепатопанкреатобилиарной зоны, компьютерную томографию, дуоденоскопию и по показаниям эндоскопическую ретроградную холангиопанкреатографию. Все больные прооперированы под общей анестезией в течение 1-3 суток после госпитализации и адекватной предоперационной подготовки. Дополнительно перед операцией определяли концентрацию цитокинов (IL-1, IL-4, IL-8, TNF α) в сыворотке крови с помощью иммуноферментных тест-систем (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. О суммарной активности эндогенных медиаторов воспаления судили по величине индекса воспалительной активности (ИВА), который рассчитывали по формуле $\text{ИВА} = (\text{IL-1} + \text{TNF}\alpha) / \text{IL-4}$. Лейкоцитарный индекс интоксикации вычисляли по формуле Я.Я. Кальф-Калифа: $\text{ЛИИ} = (4 \text{ мц.} + 3 \text{ ю.} + 2 \text{ п.} + \text{с.}) (\text{пл. кл.} + 1) / (\text{лимф.} + \text{мон.}) \times (\text{э.} + 1)$, где мц. — миелоциты, ю. — юные нейтрофилы, п. — палочкоядерные нейтрофилы, с. — сегментоядерные нейтрофилы, пл. кл. — плазматические клетки, лимф. — лимфоциты, мон. — моноциты, э. — эозинофилы. Кроме того, определяли индекс иммунореактивности (ИИР) по формуле $\text{ИИР} = (\% \text{Лимф} + \% \text{Эоз}) / \% \text{Мон}$, поскольку дефицит одного из видов этих клеток может отражать сдвиги в спектре цитокинов и факторах детоксикации: гипоэргический ответ отражает дефицит цитокинов лимфоцитарного происхождения и ограниченность резервов адаптации, а гиперэргический ответ свидетельствует о гиперпродукции цитокинов и подчеркивает дисбаланс медиаторов. Наконец, определяли индекс резистентности организма (ИРО), включающий лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) по Я.Я. Кальф-Калифу: $\text{ИРО} = \text{лейкоциты в тыс./л.} / (\text{возраст ЛИИ})$. В норме этот показатель колеблется от 50 до 100. При его уровне ниже 50 необходимо проводить длительную детоксикационную терапию, поскольку у каждого второго больного при такой величине ИРО развиваются различные осложнения, синдром полиорганной недостаточности и может наблюдаться высокая летальность [8].

Математическую обработку полученных результатов проводили методами описательной и непараметрической статистики с использованием программы Statistica 6.0. При проведении корреляционного анализа рассчитывали коэффициент Спирмена. Достоверность коэффици-

ента корреляции оценивали по таблице «Стандартные коэффициенты корреляции» [9].

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного клинико-лабораторного обследования авторами установлен ряд особенностей, характеризующих нарушения со стороны как клеточных, так и гуморальных регуляторных компонентов иммунной системы у больных с ОЖП различного генеза. При оценке абсолютных параметров цитокинов можно отметить более высокое содержание IL-1 и TNF α , а также снижение концентрации IL-4 при злокачественных процессах, как с холангитом, так и без него (табл. 1), что указывает на сдвиг цитокинового баланса в сторону воспалительного ответа. Однако только изменения концентрации недостаточно для оценки его характера и степени выраженности.

В то же время показано, что индекс воспалительной активности (ИВА) в случае злокачественных процессов существенно выше, чем при доброкачественных (табл. 2). За нормативный

показатель ИВА принято считать 0,9-1,1 усл. ед. Интересно отметить, что при неопухолевой этиологии ОЖП без холангита показатель ИВА ниже нормативного. Это может указывать на гипореактивность иммунитета, обусловленную в том числе относительным дефицитом провоспалительных цитокинов. Напротив, при злокачественных процессах иммунный ответ гиперреактивный. Подобная ситуация может быть обусловлена избытком провоспалительных цитокинов. Так, соотношение цитокинов IL-1/IL-4 у пациентов со злокачественными процессами указывает на преобладание общей воспалительной реакции над процессами дифференцировки и пролиферации лимфоцитов (табл. 3). Известно, что ИВА является объективным ранним критерием, позволяющим прогнозировать клинический тип регенерации: его значения в пределах физиологических колебаний (0,9-1,1 усл. ед.) указывают на адекватный адаптивный характер, а повышение более 1,1 усл. ед. либо снижение менее 0,9 усл. ед. свидетельствуют о высоком риске регенераторных нарушений. В связи с этим у па-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ОЖП, iu/мл

TABLE 1. CONCENTRATION OF SOME CYTOKINES IN PERIPHERAL BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH BDO, iu/ml

	Злокачественные процессы и холангит Malignant processes and cholangitis	Злокачественные процессы без холангита Malignant processes without cholangitis	Доброкачественные процессы и холангит Innocent processes and cholangitis	Доброкачественные процессы без холангита Innocent processes without cholangitis
IL-4	0,05 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,01*
IL-1	0,24 $\pm$ 0,08	0,29 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,01*
IL-8	0,41 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,11	0,18 $\pm$ 0,16
TNF α	0,05 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0	0

Примечание. * – $p < 0,05$ к группе без холангита при злокачественном процессе.

Note. *, significant differences with group without cholangitis under malignant process, $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. ИНДЕКС ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЯХ

TABLE 2. INDEX OF INFLAMMATORY ACTIVITY IN DIFFERENT CONDITIONS

	Злокачественные процессы и холангит Malignant processes and cholangitis	Злокачественные процессы без холангита Malignant processes without cholangitis	Доброкачественные процессы и холангит Innocent processes and cholangitis	Доброкачественные процессы без холангита Innocent processes without cholangitis
ИВА IIA	6,23 $\pm$ 0,98	5,19 $\pm$ 0,44	0,90 $\pm$ 0,64*	0,10 $\pm$ 0,03*

Примечание. * – $p < 0,05$ при сравнении с группой злокачественных процессов.

Note. *, significant differences with group of malignant process, $p < 0.05$.

циентов с опухолевым перерождением, как с холангитом, так и без него, можно ожидать проблем с регенерацией вследствие преобладания провоспалительной направленности иммунного ответа, что не предполагает активации соответствующих процессов. Более того, показано, что высокие значения соотношения IL-1 и IL-4 ассоциированы с прогрессированием заболевания ($r = -0,9$; $p < 0,05$).

Можно предположить, что активация синтеза провоспалительных цитокинов обусловлена тканевым распадом (аутолизом), который имеет место при злокачественных процессах. Так, например, индекс эндогенной интоксикации у пациентов с опухолями не превышает 5 (табл. 4), что не противоречит обусловленности этих показателей эндогенной интоксикацией продуктами аутолиза. К тому же у пациентов с холангитом в сочетании с онкопатологией наименее выражена резистентность (табл. 4), что является неблагоприятным признаком, указывающим на высокую вероятность присоединения инфекционных осложнений.

С другой стороны, при использовании индекса иммунореактивности показано наличие гиперпродукции цитокинов, а также дисбаланса медиаторов во всех группах. Показано [13], что

снижение ИИР может быть обусловлено уменьшением числа лимфоцитов, которое сочетается с дефицитом эозинофилов. Это свидетельствует о недостатке блокаторов воспаления, следовательно, дезинтоксикационного компонента в спектре медиаторов, и означает неблагоприятную динамику иммунных реакций. В настоящем исследовании выявлено, что у пациентов с комбинацией злокачественного процесса и холангита ЛИИ увеличен, а ИИР снижен. При отсутствии холангита у пациентов с опухолевым ростом наблюдается противоположная картина, когда ЛИИ несколько снижен, а ИИР повышен.

При проведении корреляционного анализа для пациентов с холангитом показана высокая степень ассоциированности цитокинового дисбаланса по провоспалительному типу и эндогенной интоксикации. Выявлена значимая положительная связь ЛИИ и ИВА ($r = 0,9$; $p < 0,05$ — при злокачественных и $r = 0,6$; $p > 0,05$ — при доброкачественных процессах). Кроме этого, увеличение степени цитокинового дисбаланса сопряжено со снижением ИРО ($r = -0,9$; $p < 0,05$ — при злокачественных и $r = -0,5$; $p > 0,05$ — при доброкачественных процессах), отражающего ослабление защитных сил организма.

ТАБЛИЦА 3. ОЦЕНКА БАЛАНСА В СИСТЕМЕ ЦИТОКИНОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЯХ

TABLE 3. ESTIMATION OF BALANCE IN CYTOKINES SYSTEM UNDER DIFFERENT CONDITIONS

	Злокачественные процессы и холангит Malignant processes and cholangitis	Злокачественные процессы без холангита Malignant processes without cholangitis	Доброкачественные процессы и холангит Innocent processes and cholangitis	Доброкачественные процессы без холангита Innocent processes without cholangitis
IL-1/IL-4	5,20±1,20	4,62±0,38	0,90±0,64*	0,09±0,03*

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 4. ВЫРАЖЕННОСТЬ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЯХ

TABLE 4. EXPRESSION OF ENDOGENOUS INTOXICATION UNDER DIFFERENT CONDITIONS

	Злокачественные процессы и холангит Malignant processes and cholangitis	Злокачественные процессы без холангита Malignant processes without cholangitis	Доброкачественные процессы и холангит Innocent processes and cholangitis	Доброкачественные процессы без холангита Innocent processes without cholangitis
ЛИИ LII	3,70±0,16	2,06±0,44	2,02±0,28*	2,19±0,35
ИРО IRO	2,66±0,55	10,53±2,26	14,78±4,36*	9,42±2,10

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

Полученные результаты подтверждают мнение исследователей о том, что состояние больных механической желтухой различного генеза характеризуется вторичным иммунодефицитом, который проявляется уменьшением численности и функциональным дисбалансом клеточного звена иммунитета при незначительном, как правило, снижении функции его гуморального звена. Глубина этих расстройств зависит от степени тяжести механической желтухи. Безусловно, идентичность биологических эффектов многих цитокинов создает достаточно широкие возможности для компенсации недостаточности или дефицита одних медиаторов другими. Именно это обстоятельство объясняет нередкое отсутствие корреляции между содержанием тех или иных цитокинов и клиническими особенностями течения патологического процесса. В равной степени это относится и к возможному отсутствию корреляции между уровнями этих соединений и эффективностью терапии. К тому же практически всем цитокинам свойственна быстрая биологическая активность и деградация, когда период полураспада составляет всего от нескольких до десятков минут. С другой стороны, для них характерна очень низкая концентрация в сыворотке крови, а постоянные изменения в иммунной системе под влиянием возрастающей антигенной нагрузки значительно затрудняют верификацию динамично меняющихся показателей и клиническую интерпретацию результатов. Учитывая множественность, а также синергизм и плеiotропность цитокинов, участвующих в этих реакциях, определение концентрации в крови какого-то одного из них не адекватно отражает состояние цитокинового баланса. Более корректна одномоментная оценка широкого спектра медиаторов, обязательно включающего цитокины из оппозиционных подгрупп (про- и противовоспалительные). Тем не менее, учитывая современные возможности отечественной медицины и обследуемых контингентов, становится особенно привлекательным находить связь между характером течения той или иной патологии и уровнем продукции цитокинов на основании определения лишь нескольких из них. Решению этой задачи может способствовать дополнительное использование показателей рутинного общего анализа крови с расчетом лейкоцитарных индексов. Клеточный компонент в индексной оценке дает возможность уточнить степень выраженности воспалительной реакции, предположить направленность функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Например, уровень ЛИИ отражает степень эндогенной интоксикации, причем позволяя делить ее причины на обусловленные либо микробным фактором, либо аутолизом

собственных тканей. При различных вариантах патологии ЛИИ, по-видимому, отражает и различный по качественной характеристике спектр медиаторов воспаления. ИИР — индикатор степени напряженности клеточного звена иммунитета, дисбаланс в котором проявляется прежде всего измененной цитокинсинтезирующей функцией клеток. В свою очередь, ИВА позволяет сделать предположение о преобладающем типе Т-хелперов, а также прогнозировать эффективность репаративного процесса. Лечебную тактику можно скорректировать по уровню ИРО, который отражает степень нуждаемости пациентов в детоксикационной терапии. В случае комбинации злокачественного заболевания и холангита, как показали наши исследования, выраженная эндогенная интоксикация продуктами аутолиза протекает на фоне дефицита клеток и факторов, участвующих в процессах детоксикации. Эти эффекты раскрывают причину выраженного цитокинового дисбаланса с преобладанием провоспалительных факторов, которые не способны обеспечить адекватную регенерацию.

Заключение

Таким образом, предлагаемый интегральный подход позволяет объективно оценивать изменения в системе иммунитета у пациентов, в частности с ОЖП. Если причиной обтурации послужило злокачественное новообразование, ИВА существенно выше, чем при механической желтухе доброкачественного генеза. Гиперактивация иммунного ответа при опухолях может быть обусловлена значительным преобладанием провоспалительных цитокинов. Более того, в случаях с опухолевым перерождением, как с холангитом, так и без него, индексная оценка гуморальной и клеточной составляющей позволяет предположить возникновение проблем с регенерацией вследствие провоспалительной направленности иммунного ответа, что не обеспечивает активации соответствующих реакций. У пациентов с комбинацией злокачественного процесса и холангита лейкоцитарный индекс интоксикации увеличен, а индекс иммунореактивности снижен, а при отсутствии холангита наблюдается противоположная картина, когда ЛИИ несколько снижен, а ИИР повышен. При проведении корреляционного анализа для пациентов с присоединившимся воспалением в желчевыводящей системе показана высокая степень ассоциированности цитокинового дисбаланса и эндогенной интоксикации. Очевидной становится привлекательность использования комплекса цитокинового и лейкоцитарных индексов, когда каждый из них отражает определенную часть процесса, а их совокупность дает целостную картину патологии

и позволяет прогнозировать развитие заболевания. Такой подход повышает диагностическую значимость определения иммунологических показателей, в первую очередь продукции цитоки-

нов, что можно считать перспективным направлением в диагностике и оптимизации терапии при хирургическом лечении заболеваний гепатобилиарной системы.

Список литературы / References

1. Бережная Н.М. Цитокиновая регуляция при патологии: стремительное развитие и неизбежные вопросы // Цитокины и воспаление, 2007. Т. 6, № 2. С. 26-34. [Berezhnaya N.M. Cytokine network regulation in pathology: rapid progress in knowledge and inevitable questions. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokine and Inflammation*, 2007, Vol. 6, no. 2, pp. 26-34. (In Russ.)]
2. Гаджиев Дж.Н., Тагиев Э.Г., Гаджиев Н.Дж. Состояние цитокинового статуса у больных с механической желтухой доброкачественного генеза // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова, 2015. № 5. С.56-58. [Gadzhiev Dzh.N., Tagiev E.G., Gadzhiev N.Dzh. The state of cytokine status in patients with mechanical jaundice of benign origin. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova. = N. Pirogov Surgery Journal*, 2015, Vol. 5, pp. 56-58. (In Russ.)]
3. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов-на-Дону, 1990. 224 с. [Garkavi L.H., Kvakina E.B., Ukolova M.A. Adaptive response and resistance of organism]. Rostov-on-Don, 1990. 224 p.
4. Кальф-Калиф Я.Я. О лейкоцитарном индексе и его практическом значении // Врачебное дело, 1941. № 1. С. 31-35. [Kalf-Kalif Ya.Ya. About the leukocyte index and its practical value. *Vrachebnoye delo = Medical Practice*, 1941, Vol. 1, pp. 31-35. (In Russ.)]
5. Карабанов Г.Н. Использование лейкоцитарной формулы крови для оценки тяжести интоксикации // Вестник хирургии им. И.И. Грекова, 1989. № 4. С. 146-149. [Karabanov G.N. The using of blood leukocyte to assess the severity of intoxication. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = I. Grekov Surgery Bulletin*, 1989, Vol. 4, pp. 146-149. (In Russ.)]
6. Карпунина Н.С., Бахметьев Б.А., Заикина М.В. Признаки микробной сенсibilизации у больных с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2015. № 1. С. 75-81. [Karpunina N.S., Bakhmetiev B.A., Zaikina M.V. Signs of microbial sensibilization in patients with various cardiovascular diseases. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, Vol. 1, pp. 75-81. (In Russ.)]
7. Касимов Э.М., Заргарли И.А., Намазова И.К., Меджидова С.Р. Сравнительная оценка иммунологической реактивности при сочетанной травме глаза // Офтальмология, 2011. Т. 3, № 7. С. 50-55. [Kasimov E.M., Zargali I.A., Namazova I.K., Medzhidova S.R. Comparison of immunological reactivity in associated eye trauma. *Oftalmologiya = Ophthalmology*, 2011, Vol. 3, no. 7, pp. 50-55. (In Russ.)]
8. Кобец Т.В., Кобец Ю.В., Гавриков И.В. Применение современных информационных технологий для оценки эффективности лечения на курорте // Молодой ученый, 2016. № 5. С. 219-221. [Kobets T.V., Kobets Yu.V., Gavrikov I.V. Applying modern information technologies for the assessment of resort treatment efficiency. *Molodoy uchenyy = Young Scientist*, 2016, Vol. 5, pp. 219-221. (In Russ.)]
9. Кучеренко В.З. Применение методов статистического анализа для изучения общественного здоровья и здравоохранения. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 299 с. [Kucherenko V.Z. The applying of methods of statistical analysis for studying public health and healthcare]. Moscow: GEOTAR-Media, 2007. 299 p.
10. Останин А.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Шевела Е.Я., Курганова Е.В., Стрельцова Е.И., Черных Е.Р. Цитокиноопосредованные механизмы развития системной иммуносупрессии у больных с гнойно-хирургической патологией // Цитокины и воспаление, 2002. Т. 1, № 1. С. 38-45. [Ostanin A.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Shevela E.Ya., Kurganova E.V., Streltsova E.I., Chernykh E.R. Cytokine-mediated mechanisms of systemic immune suppression in patients with surgical infections. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokine and Inflammation*, 2002, Vol. 1, no. 1, pp. 38-45. (In Russ.)]
11. Островский В. К., Мащенко А. В., Янголенко Д. В., Макаров С. В. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях // Клиническая лабораторная диагностика, 2006. № 6. С. 50-53. [Ostrovsky V.K., Mashchenko A.V., Yangolenko D.V., Makarov S.V. The parameters of blood and leukocytic intoxication index in the evaluation of the severity of inflammatory, purulent, and pyodestructive diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2006, Vol. 6, pp. 50-53. (In Russ.)]
12. Островский В.К., Мащенко А.В., Макаров С.В. Оценка тяжести и прогноз гнойно-деструктивных заболеваний органов брюшной полости // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова, 2007. № 1. С. 33-37. [Ostrovsky V.K., Mashchenko A.V., Makarov S.V. Assessment of severity assessment and prognosis of pyodestructive abdominal diseases. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova. = N. Pirogov Surgery Journal*, 2007, Vol. 1, pp. 33-37. (In Russ.)]
13. Пахрова О.А., Криштоп В.В., Курчанинова М.Г., Румянцева Т.А. Лейкоцитарные показатели крови при адаптации к острой экспериментальной гипоксии головного мозга в зависимости от уровня стрессоустойчивости // Современные проблемы науки и образования, 2016. № 6. С. 231. [Pakhrova O.A., Krishtop V.V., Kurchaniyeva M.G., Rumyantseva T.A. Leukocyte indicators of blood during adaptation to acute experimental hypoxia of the brain depending on the level of stress resistance // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, 2016, No. 6, p. 231. (In Russ.)]

Kurchaninova M.G., Rumyantseva T.A. Changes of blood leukocyte indices under acute experimental cerebral hypoxia in rats with different levels of stress resistance. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2016, Vol. 6, p. 231. (In Russ.)]

14. Плеханов А.Н., Чикотеев С.П., Товаршинов А.И. Изменение уровней цитокинов в крови при развитии печеночной недостаточности после операций на печени // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 1. С. 61-66. [Plekhanov A.N., Chikoteev S.P., Tovarshinov A.I., Soboleva N.I. Changes of blood cytokine levels in the course of developing liver insufficiency after hepatic surgery. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 1, pp. 61-66. [In Russ.]] doi: 10.15789/1563-0625-2006-1-61-66.

15. Сарап П.В., Тутынин К.В., Булыгин Г.В., Камзалакова Н.И., Швецкий А.Г., Степаненко А.В. Метод прогнозирования и выявления осложнений в раннем послеоперационном периоде. Патент на изобретение № 2190216, 2001. [Sarap P.V., Tutynin K.V., Bulygin G.V., Kamzalakova N.I., Shvetsky A.G., Stepanenko A.V. Method of prediction and rejection of complications in the early postoperative period]. Patent No. 2190216, 2001.

16. Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление, 2002. Т. 1, № 1. С. 9-16. [Simbirtsev A.S. Cytokines as a new system, regulating body defense reactions. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokine and Inflammation*, 2002, Vol. 1, no. 1, pp. 9-16. (In Russ.)]

17. Тагиев Э.Г. Динамика интерлейкина 4 при хирургическом лечении механической желтухи доброкачественного генеза // Здоровоохранение (Минск), 2016. № 5. С. 4-8. [Tagiev E.G. Interleukin-4 dynamics in patients with benign obstructive jaundice surgical management. *Zdravookhranenie (Minsk) = Public Health (Minsk)*, 2016, Vol. 5, pp. 4-8. (In Russ.)]

18. Cortvrindt C., Speeckaert R., Moerman A., Delanghe J.R., Speeckaert M.M. The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases. *Pathology*, 2017, Vol. 49, no. 3, pp. 247-258.

19. Kudo M. Immuno-oncology in hepatocellular carcinoma: 2017 update. *Oncology*, 2017, Vol. 93, Suppl. 1, pp. 147-159.

20. Marra F., Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*, 2014, Vol. 147, pp. 577-594.

21. Shao Y.Y., Lin H., Li Y.S., Lee Y.H., Chen H.M., Cheng A.L., Hsu C.H. High plasma interleukin-6 levels associated with poor prognosis of patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 2017, Vol. 47, no. 10, pp. 949-953.

22. Wasmuth H.E., Tacke F., Trautwein C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Semin. Liver. Dis.*, 2010, Vol. 30, pp. 215-225.

23. Xu C., Qiao Y., Zhang D. Expression of Toll-like receptors in human hepatocellular carcinoma and its correlation with inflammasome-associated cytokines. *Chinese journal of cellular and molecular immunology. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2017, Vol. 33, no. 9, pp. 1182-1186.

24. Yao Y., Xie S., Yang C., Zhang J., Wu X., Sun H. Biomarkers in the evaluation and management of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2017, Vol. 274, no. 10, pp. 3559-3566.

Авторы:

Карпунина Т.И. — д.б.н., профессор, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Годовалов А.П. — к.м.н., доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Бусырев Ю.Б. — к.м.н., доцент кафедры факультетской хирургии № 1 ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Authors:

Karpunina T.I., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Microbiology and Virology, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Godovalov A.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology and Virology, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Busyrev Yu.B., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Faculty Surgery No. 1, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Поступила 13.01.2018
Принята к печати 06.03.2018

Received 13.01.2018
Accepted 06.03.2018

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ДИСБАЛАНС И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕРДЦА У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Кологривова И.В.^{1,2}, Суслова Т.Е.¹, Винницкая И.В.¹,
Кошельская О.А.¹, Бощенко А.А.¹, Трубачева О.А.¹

¹ ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»,
г. Томск, Россия

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Томск, Россия

Резюме. Сахарный диабет 2-го типа относится к наиболее социально значимым неинфекционным заболеваниям современности и является важным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Изменения в диастолической функции миокарда левого желудочка отмечаются у пациентов с диабетом независимо от наличия других осложнений. Этиология сердечной недостаточности при сахарном диабете 2-го типа носит многофакторный характер и связана с клеточными, молекулярными и метаболическими причинами, однако патофизиологический механизм ее развития до конца не изучен. Целью настоящей работы стала оценка содержания провоспалительных субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-хелперов 1-го типа [Th1] и Т-хелперов 17-го типа [Th17]) и FoxP3⁺Т-регуляторных лимфоцитов в зависимости от структурно-функционального состояния сердца по данным двухмерного эхокардиографического исследования у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа. В ходе одномоментного сравнительного исследования было обследовано 25 пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа и 14 пациентов с артериальной гипертензией без нарушений обмена веществ. Всем пациентам проводили эхокардиографию из трансторакального доступа в М-режиме, В-режиме и доплеровских режимах сканирования. Методом проточной цитометрии в периферической крови оценивали содержание Th1- и Th17-лимфоцитов по внутриклеточной продукции CD4⁺ лимфоцитами IL-17 и IFN γ , соответственно, и FoxP3⁺Т-регуляторных лимфоцитов по экспрессии CD25 и фактора транскрипции FoxP3. В сыворотке крови методом проточной цитометрии оценивали содержание IL-17, IL-10, IFN γ и TNF α . Установлено наличие корреляционных взаимосвязей между содержанием Th17-лимфоцитов, FoxP3⁺Т-регуляторных лимфоцитов и структурно-функциональными параметрами миокарда у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа, в то время как у пациентов без нарушений углеводного обмена взаимосвязи между иммунологическими и эхокардиографическими параметрами отсутствовали. У пациентов с сахарным диабетом и диастолической дисфункцией содержание FoxP3⁺Т-регуляторных лимфоцитов, соотношение между Т-регуляторными и Th17-лимфоцитами и средняя интенсивность флуоресценции IL-17 в Th17 были ниже, чем у пациентов с диабетом, но без диастолической дис-

Адрес для переписки:

Кологривова Ирина Вячеславовна
ФГБНУ «Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»
634012, Россия, г. Томск, ул. Киевская, 111а.
Тел.: 8 (913) 105-38-69.
E-mail: ikologrivova@gmail.com

Address for correspondence:

Kologrivova Irina V.
Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy
of Sciences
634012, Russian Federation, Tomsk, Kievskaya str., 111a.
Phone: 7 (913) 105-38-69.
E-mail: ikologrivova@gmail.com

Образец цитирования:

И.В. Кологривова, Т.Е. Суслова, И.В. Винницкая,
О.А. Кошельская, А.А. Бощенко, О.А. Трубачева
«Иммунорегуляторный дисбаланс и структурно-
функциональное состояние сердца у пациентов
с сахарным диабетом 2 типа» // Медицинская
иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 833–846.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-833-846

© Кологривова И.В. и соавт., 2018

For citation:

I.V. Kologrivova, T.E. Suslova, I.V. Vinnitskaya,
O.A. Koshelskaya, A.A. Boshchenko, O.A. Trubacheva
“Immunoregulatory imbalance and functional state of the
heart in the patients with diabetes mellitus type 2”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,
Vol. 20, no. 6, pp. 833–846.

doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-833-846

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-833-846

функции. Ассоциация диастолической дисфункции с сахарным диабетом 2-го типа сопровождалась повышением содержания $\text{IFN}\gamma^+\text{Th1}$ -лимфоцитов и концентрации IL-10, $\text{IFN}\gamma$ и $\text{TNF}\alpha$ в сыворотке по сравнению с теми пациентами, у которых диастолическая дисфункция наблюдалась в отсутствие нарушений углеводного обмена. Для диабетических пациентов с диастолической дисфункцией было характерно наличие гиперинсулинемии, гипергликемии, более высокого индекса инсулинорезистентности, увеличение окружности талии и индекса висцерального ожирения по сравнению с пациентами с диастолической дисфункцией без диабета. Висцеральное ожирение и снижение чувствительности тканей к инсулину можно рассматривать в качестве патогенетически значимых факторов развития иммунорегуляторного дисбаланса и диастолической дисфункции у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, диастолическая дисфункция, T-лимфоциты-хелперы 1-го типа, T-лимфоциты-хелперы 17-го типа, FoxP3^+ T-регуляторные лимфоциты, висцеральное ожирение, инсулинорезистентность

IMMUNOREGULATORY IMBALANCE AND FUNCTIONAL STATE OF THE HEART IN THE PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2

Kologrivova I.V.^{a,b}, Suslova T.E.^a, Vinnitskaya I.V.^a, Koshelskaya O.A.^a, Boshchenko A.A.^a, Trubacheva O.A.^a

^a Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

^b Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Diabetes mellitus type 2 is one of the most important non-infectious diseases in the modern world, being an important risk factor of cardiovascular disorders. Changes in left ventricular myocardial diastolic function are observed in diabetic patients independently from other comorbidities. Etiology of the heart failure during diabetes mellitus type 2 is multifactorial, exhibiting cellular, molecular and metabolic aspects. However, its pathophysiological mechanisms are not completely understood. The aim of this study was to evaluate numbers of inflammatory T lymphocytes, i.e., T helper type 1 (Th1) and T helper type 17 (Th17) cells, and FoxP3^+ T regulatory lymphocytes, depending on the functional state of the heart assessed by two-dimensional echocardiography in patients with arterial hypertension and diabetes mellitus type 2. A total of twenty-five patients with a combination of arterial hypertension and diabetes mellitus type 2, and 14 patients with arterial hypertension without carbohydrate disturbances were recruited to a cross-sectional case-control study. All the patients underwent echocardiography with transthoracic access at the M-mode, B-mode and Doppler mode of imaging. We evaluated numbers of Th1 and Th17 lymphocytes by intracellular production of IL-17 and $\text{IFN}\gamma$ by CD4^+ lymphocytes, respectively. The numbers of FoxP3^+ T regulatory lymphocytes were estimated by expression of CD25 and FoxP3 transcription factor. A flow cytometry approach was used in both cases. We revealed some correlations between the numbers of Th17 lymphocytes, FoxP3^+ T regulatory lymphocytes and functional parameters of myocardium in patients with diabetes mellitus type 2, which were absent in patients without carbohydrate impairments. The numbers of FoxP3^+ T regulatory lymphocytes, Treg/Th17 lymphocyte ratio, and mean fluorescence intensity of IL-17 for Th17 cells was lower in patients with diabetes mellitus and diastolic dysfunction compared to the patients with diabetes free of diastolic dysfunction. Association of diastolic dysfunction with diabetes mellitus type 2 was accompanied by increase of $\text{IFN}\gamma^+\text{Th1}$ lymphocyte numbers and concentrations of IL-10, $\text{IFN}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$ in serum as compared to the patients with diastolic dysfunction in the absence of carbohydrate metabolism disturbances. The diabetic patients with diastolic dysfunction were characterized by hyperinsulinemia, hyperglycemia, higher index of insulin resistance, increase of waist circumference and visceral adiposity index when compared to the patients with diastolic dysfunction without diabetes. Visceral obesity and decrease of insulin sensitivity may be regarded as pathogenetically significant factors for the development of immune regulatory imbalance and diastolic dysfunction in the patients with diabetes mellitus type 2.

Keywords: diabetes mellitus type 2, diastolic dysfunction, Th1 lymphocytes, Th17 lymphocytes, FoxP3^+ T regulatory lymphocytes, visceral obesity, insulin resistance

Введение

Сахарный диабет (СД) 2-го типа по праву считается «неинфекционной эпидемией современности» [1]. Его распространенность неуклонно растет и прогнозы для развитых стран являются крайне пессимистическими: ожидается, что к 2035 г. число больных СД 2-го типа во всем мире может достигнуть 592 млн человек [2]. Сердечно-сосудистые заболевания являются главной причиной смертности пациентов с СД [31]. Помимо многократно повышенных рисков развития атеросклероза, для пациентов СД 2-го типа характерно развитие хронической сердечной недостаточности (ХСН) [8]. Клинические исследования показывают, что частота ХСН у лиц, страдающих СД, в 2-5 раз выше по сравнению с пациентами без диабета [19, 26]. Основными факторами развития ХСН при СД 2-го типа являются диабетическая кардиомиопатия, ишемия миокарда и артериальная гипертензия, составляющие так называемую «кардиотоксическую триаду» [29].

Этиология сердечной недостаточности у больных сахарным диабетом носит многофакторный характер и связана с клеточными, молекулярными и метаболическими нарушениями, однако патофизиологические механизмы ее развития окончательно не изучены [27]. Помимо прямого повреждающего воздействия на миокард гипергликемии, в патогенез кардиомиопатии при диабете вовлечены нарушения ремоделирования внеклеточного матрикса, развитие миокардиального фиброза и локального воспаления ткани сердца [20].

Наличие хронического субклинического воспаления при СД 2-го типа доказано многочисленными исследованиями [23, 41], однако механизмы развития воспаления и роль воспаления в патогенезе СД и коморбидных состояний изучены недостаточно. Изначально главными клетками, модулирующими воспаление при СД 2-го типа, считались макрофаги. Они обнаруживались в большом количестве в жировой ткани у пациентов с ожирением и инсулинорезистентностью. Было показано, что развитие устойчивости к инсулину сопровождается переключением фенотипа макрофагов с противовоспалительного M2 на провоспалительный M1 [35]. В дальнейшем была установлена важная роль Т-лимфоцитов в патогенезе хронического воспаления при СД 2-го типа: как оказалось, нарушение иммунорегуляции тесно вовлечено в патогенез инсулинорезистентности [15]. Кроме того, сообщается, что снижение содержания FoxP3⁺Т-регуляторных лимфоцитов, сопровождающееся увеличением количества и функциональной активности провоспалительных субпопуляций Т-лимфоцитов,

связано с более неблагоприятным прогнозом для диабетических пациентов [25, 44].

Более чем в 50% случаев у пациентов с СД 2-го типа формируется ХСН с сохранной фракцией выброса, или диастолическая сердечная недостаточность [11, 16]. Для нормальной работы левого желудочка (ЛЖ) необходимо сохранение его податливости в диастолу и способности быстро увеличивать внутрикамерное давление в систолу для изгнания ударного объема крови. Основными механизмами формирования диастолической дисфункции у пациентов с сахарным диабетом служат нарушение расслабления ЛЖ и увеличение его жесткости [33, 34], которые регистрируются вне зависимости от наличия ишемической болезни сердца и артериальной гипертензии [12, 40]. Так, в недавнем исследовании, проведенном Agaz M. и соавт., установлено, что распространенность диастолической дисфункции существенно выше у пациентов с гипертонической болезнью в сочетании с СД, чем у пациентов без СД [7].

Риск неблагоприятных сердечно-сосудистых событий для пациентов с диастолической сердечной недостаточностью так же высок, как и для пациентов с систолической ХСН [9], что определяет важность ранней диагностики диастолической сердечной недостаточности и необходимость поиска ее информативных биомаркеров. Следует отметить, однако, что исследования, посвященные роли иммунной системы в развитии диастолической дисфункции при СД 2-го типа, крайне немногочисленны и не затрагивают изучение механизмов иммунорегуляции.

Целью настоящего исследования стала оценка содержания провоспалительных субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-хелперов 1-го типа [Th1 и Т-хелперов 17-го типа [Th17]) и FoxP3⁺Т-регуляторных лимфоцитов в зависимости от структурно-функционального состояния сердца по данным двухмерного эхокардиографического исследования у пациентов с сочетанием артериальной гипертензии и сахарного диабета 2-го типа.

Материалы и методы

Сравнительное одномоментное исследование выполнено у 39 пациентов (мужчин и женщин), разделенных на 2 группы. В основную группу (группа 1) было включено 25 пациентов с сочетанием артериальной гипертонии (АГ) и сахарного диабета (СД) 2-го типа. Контрольную группу (группа 2) составили 14 пациентов с АГ без нарушений обмена веществ.

Общими критериями включения пациентов в исследование были: возраст 50-70 лет, синусовый ритм, наличие гипертонической болезни 2-й стадии, АГ 1-2-й степени и значения фракции

выброса левого желудочка > 50%. Дополнительным критерием для включения пациентов в группу 1 было наличие сахарного диабета 2-го типа при уровне HbA1c, не превышающем 10,5%.

Критериями исключения служили: инсулинотерапия, верифицированная ИБС, подтвержденные симптоматические формы артериальной гипертензии; морбидное ожирение (индекс массы тела > 45 кг/м²); тяжелая сопутствующая патология (печеночная, почечная недостаточность, онкологические заболевания), хронические заболевания в стадии обострения, фибрилляция предсердий и желудочковые аритмии высоких градаций, пороки сердца, воспалительные заболевания сердца, патология правых камер сердца.

Сравнительная клиническая характеристика больных, включенных в исследование, представлена в таблице 1.

Все пациенты находились на постоянной антигипертензивной терапии, часть пациентов принимали средние дозы статинов. Большинство пациентов группы 1 получали стандартную пероральную сахароснижающую терапию. Значимых межгрупповых различий по спектру и дозам принимаемых препаратов не отмечалось.

Всем пациентам проводили клинко-диагностическое обследование, включающее оценку общего анализа крови, биохимического анализа крови, эхокардиографическое исследование, иммунологическое исследование. Для биохимических исследований венозную кровь забирали утром натощак. У 27 пациентов (20 пациентов из группы 1 и 7 пациентов из группы 2) дополнительно забирали 4 мл гепаринизированной крови для иммунологических исследований.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ. До включения в исследование от всех пациентов получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Проточная цитометрия

Мононуклеары периферической крови получали из гепаринизированной крови путем центрифугирования на Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, США).

Th1- и Th17-лимфоциты идентифицировали по внутриклеточной продукции интерферона-гамма (IFN γ) и интерлейкина-17 (IL-17) соответственно. Для этого мононуклеары культивировали в полной среде RPMI 1640 (10% фетальной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин, 1% пенициллина/стрептомицина) при 37 °C, 5% CO₂. Часть мононуклеаров составляла интактную клеточную культуру; часть мононуклеаров стимулировали форобол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА) (50 нг/мл, Sigma-Aldrich, США) с иономицином (1 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США). Через

2 часа после начала культивирования для блокады секреции цитокинов добавляли GolgiPlug (BD Pharmingen, США). Через 6 часов к 100 мкл клеточной суспензии добавляли моноклональные антитела анти-CD4-PE-Cy5 (BD Biosciences, США), фиксировали, пермеабилizировали (буферы BD Pharmingen, США), окрашивали моноклональными антителами анти-IL-17-PE (R&D, США) и анти-IFN γ -FITC (BD Biosciences, США). Окрашенные клетки ресуспендировали в фиксирующем буфере (BD Pharmingen, США) и анализировали в течение 24 часов.

FoxP3⁺Treg-лимфоциты идентифицировали по наличию внутриклеточного фактора транскрипции FoxP3. Мононуклеары окрашивали моноклональными антителами анти-CD4-FITC и анти-CD25-APC (BD Biosciences, США), фиксировали, пермеабилizировали соответствующим набором буферных растворов (BD Pharmingen, США) и добавляли моноклональные антитела анти-FoxP3-PE (BD Pharmingen, США). Окрашенные клетки ресуспендировали в фиксирующем буфере (BD Pharmingen, США).

Клетки анализировали на проточном цитометре FACSCalibur с использованием программного обеспечения CellQuestPro (BD Biosciences, США).

Определение содержания цитокинов

Оценка сывороточного содержания цитокинов IL-10, IL-17, IFN γ и TNF α проводилась методом проточной цитометрии с помощью набора для мультиплексного анализа (Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, BD Biosciences, США).

Эхокардиографическое исследование

Эхокардиографию проводили из трансторакального доступа на ультразвуковых диагностических системах Vivid 9 (GE Healthcare, США) с помощью секторного датчика M5S и Vivid 7 Dimension (GE Healthcare, США) с помощью секторного датчика M4S. Использовали М-режим, В-режим и доплеровские режимы сканирования. Определяли линейные размеры, объемы левого желудочка (ЛЖ) по Simpson в фазу систолы и диастолы, фракцию выброса (ФВ) ЛЖ, толщину стенок ЛЖ. Массу миокарда ЛЖ (ММ ЛЖ) рассчитывали на основании толщины задней стенки ЛЖ в диастолу (ТЗСлжд), межжелудочковой перегородки в диастолу (ТМЖПд) и конечного диастолического размера ЛЖ (КДРлж) по формуле, предложенной Devereux R. и Reichek N. [14]. Определяли индекс ММ ЛЖ (ИММ ЛЖ), как ММ ЛЖ, деленную на площадь поверхности тела. При значениях ИММ ЛЖ более 115 г/м² у мужчин и более 95 г/м² у женщин диагностировали гипертрофию ЛЖ (ГЛЖ) [4]. Рассчитывали индекс относительной толщины стенки ЛЖ (ОТС) по формуле: ОТС ЛЖ = ТЗСлжд + ТМЖПд / КДРлж.

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Параметр Parameter		Группа 1 Пациенты с АГ + СД2 Group 1 AH + DM2 patients (n = 25)	Группа 2 Пациенты с АГ Group 2 AH patients (n = 14)
Пол (мужчины/женщины) Male/female, n		13/12	10/4
Возраст, лет Age, years		58,5 (50,0-63,0)	56,0 (51,0-58,0)
Продолжительность СД2, годы DM2 duration, years		5,0 (1,0-90,0)	—
Продолжительность АГ, годы AH duration, years		9,0 (3,0-11,0)	7,5 (4,0-10,0)
Офисное систолическое АД, мм рт. ст. Office systolic BP, mm Hg		130,0 (113,0-140,0)	120,0 (111,0-140,0)
Офисное диастолическое АД, мм рт. ст. Office diastolic BP, mm Hg		80,0 (76,0-90,0)	80,0 (70,0-80,0)
ИМТ, кг/м ² BMI, kg/m ²		32,2 (29,3-35,3)	29,5 (26,7-36,0)
Индекс висцерального ожирения Visceral adiposity index		3,8 (2,3-4,8)	2,0 (1,9-4,3)
Окружность талии, см Waist circumference, cm	мужчины male	104,0 (102,0-106,0)	97,0 (90,0-100,0)*
	женщины female	108,0 (105,0-112,0)	94,0 (90,0-100,0)
Инсулин, мкМЕ/мл Insulin, μ U/ml		15,4 (10,5-27,5)	6,0 (5,4-14,8)**
Глюкоза, мМ Glucose, mM		7,5 (6,4-9,3)	5,8 (4,8-7,2)
НОМА-IR		5,4 (3,5-9,4)	2,3 (1,8-5,0)**
HbA1c, %		8,1 (6,7-9,3)	5,8 (5,5-6,5)**
Общий холестерин, мМ Total cholesterol, mM		5,9 (4,7-6,6)	6,8 (5,9-7,2)*
Триглицериды, мМ Triglycerides, mM		2,1 (1,7-2,9)	2,1 (1,2-2,6)
Холестерин ЛПНП, мМ LDL-cholesterol, mM		3,5 (2,8-4,2)	4,7 (4,5-4,9)**
Холестерин ЛПВП, мМ HDL-cholesterol, mM		1,0 (0,9-1,3)	1,1 (0,8-1,2)
ЛПНП/ЛПВП LDL/HDL		3,3 (2,6-4,4)	4,6 (3,4-5,9)*

Примечание. Уровень значимости межгрупповых различий * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$. СД 2 – сахарный диабет 2 типа; АГ – артериальная гипертензия; ИМТ – индекс массы тела; АД – артериальное давление; НОМА – индекс инсулинорезистентности (homeostatic model assessment); HbA1c – гликозилированный гемоглобин; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ЛПВП – липопротеины высокой плотности.

Note. Level of significance *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. DM2, diabetes mellitus type 2; AH, arterial hypertension; BMI, body mass index; BP, blood pressure; HOMA-IR, insulin resistance according to homeostatic model assessment; HbA1c, glycated hemoglobin; LDL, low density lipoproteins; HDL, high density lipoproteins.

На основании ИММ ЛЖ и ОТС выделяли 4 типа геометрии ЛЖ: нормальная геометрия (нормальный ИММ ЛЖ, $ОТС \leq 0,42$), концентрическое ремоделирование (нормальный ИММ ЛЖ, $ОТС ЛЖ > 0,42$), концентрическая гипертрофия (повышенный ИММ ЛЖ, $ОТС ЛЖ > 0,42$) и эксцентрическая гипертрофия (повышенный ИММ ЛЖ, $ОТС \leq 0,42$) [28].

Для оценки диастолической функции ЛЖ определяли объем левого предсердия (ЛП) по методу Симпсона, индексированный объем ЛП (объем ЛП к площади поверхности тела), пиковые скорости трансмитрального кровотока в фазу раннего диастолического наполнения (E , см/с) и во время систолы левого предсердия (A , см/с), время изоволюмического расслабления ЛЖ (ВИР, мс), скорость раннего диастолического наполнения перегородки и боковой стенки ЛЖ (e' , см/с), отношение скоростей E/e' , скорость трикуспидальной регургитации (TRV, м/с). Критерием диастолической дисфункции ЛЖ служило наличие двух и более из следующих признаков: значения $E/A < 1,0$, $ВИР \geq 90$ мс, $E/A > 2,0$, $ВИР < 50$ мс, индекс объема ЛП > 34 мл/м², e' перегородки < 8 см/с, боковой стенки < 10 см/с, $E/e' > 13$, $TRV > 2,8$ м/с [34, 37].

Биохимические исследования

Концентрацию инсулина определяли методом иммуноферментного анализа (AccuBind, США). Содержание глюкозы в плазме оценивали глюкозооксидазным методом с помощью анализатора BIOSEN C-line Clinic (EKF diagnostic, Германия). По результатам определения концентрации инсулина и глюкозы рассчитывали индекс инсулинорезистентности НОМА-IR (homeostatic model assessment) с помощью формулы: $НОМА = G_0 \times I_0 / 22,5$ (G_0 — содержание глюкозы натощак; I_0 — содержание инсулина натощак). Ферментативный колориметрический метод использовался для определения сыровоточного содержания общего холестерина, триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) (наборы «Диакон», Россия). Рассчитывали концентрацию холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и соотношение ЛПНП/ЛПВП. Содержание гликозилированного гемоглобина определяли иммунотурбидиметрическим методом (DiaSys, Германия). Расчет индекса висцерального ожирения (ИВО) у мужчин проводили по формуле: $ИВО = (ОТ / (39,68 + (1,88 \times ИМТ))) \times (ТГ / 1,03) \times (1,31 / ЛПВП)$; у женщин по формуле: $ИВО = (ОТ / (36,58 + (1,89 \times ИМТ))) \times (ТГ / 0,81) \times (1,52 / ЛПВП)$ (ОТ — окружность талии; ИМТ — индекс массы тела) [5].

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft Inc., США) и SPSS 11.5.0 for Windows (SPSS Inc., США). Характер распределения параметров оценивался методом Шапиро–Уилка. Данные представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (1-ый [$Q_{0,25}$]; 3-ий [$Q_{0,75}$] квартили). Критерий Манна–Уитни использовался для оценки достоверности различий между группами. Корреляционный анализ применяли для оценки связи двух различных количественных признаков и проводили по методу Спирмена. Во всех методах статистической обработки результатов принимали альтернативную гипотезу (о различии выборок или взаимосвязи параметров) при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Содержание различных субпопуляций Т-лимфоцитов и цитокинов

Диабетические пациенты из основной группы (группа 1) характеризовались достоверно повышенным содержанием $IFN\gamma^+Th1$ -лимфоцитов в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов и в культуре мононуклеаров, стимулированных ФМА (рис. 1). Данные изменения сопровождалось увеличением средней интенсивности флуоресценции $IFN\gamma$ в клетках (рис. 1). Кроме того, было выявлено снижение содержания $FoxP3^+Treg$ и тенденция к снижению соотношения содержания $FoxP3^+T$ -регуляторных лимфоцитов и $Th1$ -лимфоцитов (рис. 1). Мы обнаружили увеличение сыровоточного содержания цитокинов IL-10, IL-17, $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ у пациентов из группы 1 по сравнению с пациентами из группы 2 (рис. 1).

Данные эхокардиографического исследования пациентов с АГ и пациентов с сочетанием АГ и СД 2-го типа

Статистически значимых различий по массе миокарда ЛЖ, ИММ ЛЖ и типам ремоделирования ЛЖ между пациентами из 1 и 2 групп выявлено не было. Так, обнаружены следующие типы геометрии миокарда ЛЖ: нормальная геометрия у 8 (32%) и у 3 (27,3%) пациентов 1 и 2 групп соответственно; концентрическое ремоделирование у 5 (20%) и 2 (14,3%) пациентов 1 и 2 групп соответственно; концентрическая ГЛЖ у 1 (4%) и 1 (7,1%) соответственно; эксцентрическая ГЛЖ у 2 (8%) и 1 (7,1%) соответственно. Также группы не отличались между собой по объему ЛЖ (мл) в фазу систолы: 38,0 (33,5; 49,0) (гр. 1) vs 42,5 (38,0; 47,0) (гр. 2) и диастолы: 118,0 (96,2; 137,5) (гр. 1) vs 130,0 (118,0; 135) (гр. 2), ФВ ЛЖ (%): 66,5 (63,0; 69,0) (гр. 1) vs 67,0 (65,0; 69,5). У 11 (78,6%) пациентов в группе АГ и у 17 (68%) гипертензив-

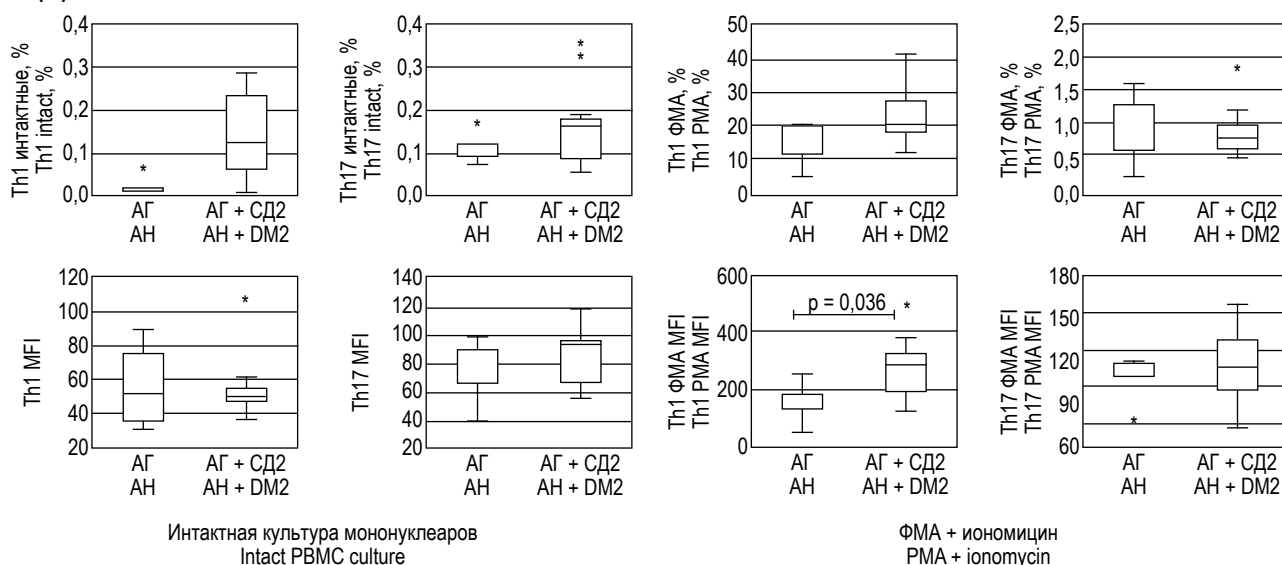
ных пациентов с СД 2-го типа выявлялись признаки диастолической дисфункции: замедление ВПР ≥ 90 мс, снижение Е/А ($< 1,0$) либо сочетание увеличения Е/е' > 13 , TRV $> 2,8$ м/сек, индекса объема ЛП > 34 мл/м² при нормальном соотношении Е/А.

Взаимосвязь между эхокардиографическими и иммунологическими параметрами

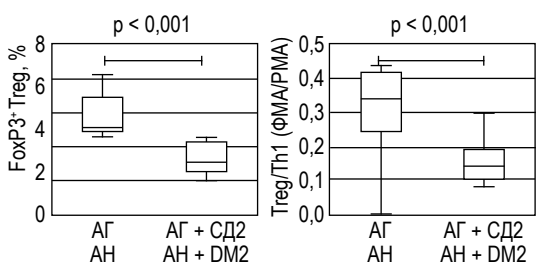
В соответствии с данными корреляционного анализа в группе 1 были определены отрицатель-

ные взаимосвязи между минутным объемом крови и содержанием IL17⁺Th17-лимфоцитов после стимуляции, между содержанием FoxP3⁺Treg и фракцией выброса, а также между содержанием FoxP3⁺Treg и временем изоволюметрического расслабления левого желудочка (рис. 2). Были выявлены положительные взаимосвязи между содержанием FoxP3⁺Treg и величинами конечного диастолического объема, конечного систолического объема и конечного систолического

А (A)



Б (B)



В (C)

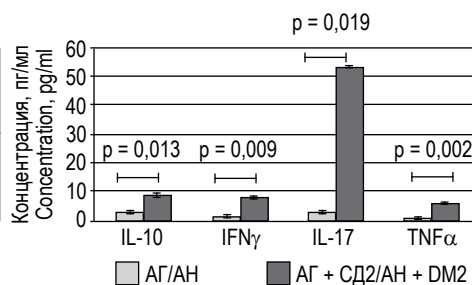


Рисунок 1. Содержание субпопуляций CD4⁺T-лимфоцитов и сыывороточная концентрация цитокинов

Примечание. А – содержание (верхний ряд) и средняя интенсивность флуоресценции (MFI) (нижний ряд) Th1- и Th17-лимфоцитов в интактной культуре мононуклеарных лимфоцитов и после стимуляции форобол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА) с иономицином у пациентов из группы 1 (АГ + СД2) и группы 2 (АГ). Указан процент клеток от общего количества CD4⁺ лимфоцитов в культуре клеток. Б – содержание FoxP3⁺Treg-регуляторных лимфоцитов (Treg) и соотношение между содержанием FoxP3⁺Treg и Th1-, Th17-лимфоцитов при стимуляции форобол-12-миристан-13-ацетатом с иономицином у пациентов из группы 1 (АГ + СД2) и группы 2 (АГ). В – концентрации цитокинов IL-10, IFN γ , IL-17 и TNF α в сыыворотке крови пациентов из группы 1 (АГ + СД2) и группы 2 (АГ); АГ – артериальная гипертензия; СД2 – сахарный диабет 2-го типа.

Figure 1. Subpopulations of CD4⁺T lymphocytes and cytokines concentrations in blood serum

Note. A, percentage (upper row) and mean fluorescence intensity (MFI) (lower row) of Th1 and Th17 lymphocytes in intact and stimulated with phorbol-12-miristate-13-acetate (PMA) and ionomycin peripheral blood mononuclear cells' culture in patients from group 1 (AH + DM2) and group 2 (AH only). Data are presented as percentages of cells from the total number of CD4⁺ lymphocytes in cell culture.

B, percentage of FoxP3⁺Treg regulatory lymphocytes (Treg) and ratio between FoxP3⁺Treg and Th1, Th17 lymphocytes after stimulation with phorbol-12-miristate-13-acetate and ionomycin in group 1 (AH + DM2) and group 2 (AH only) patients.

C, blood serum concentrations of cytokines IL-10, IFN γ , IL-17 and TNF α in group 1 (AH + DM2) and group 2 (AH only) patients; AH, arterial hypertension; DM2, diabetes mellitus type 2.

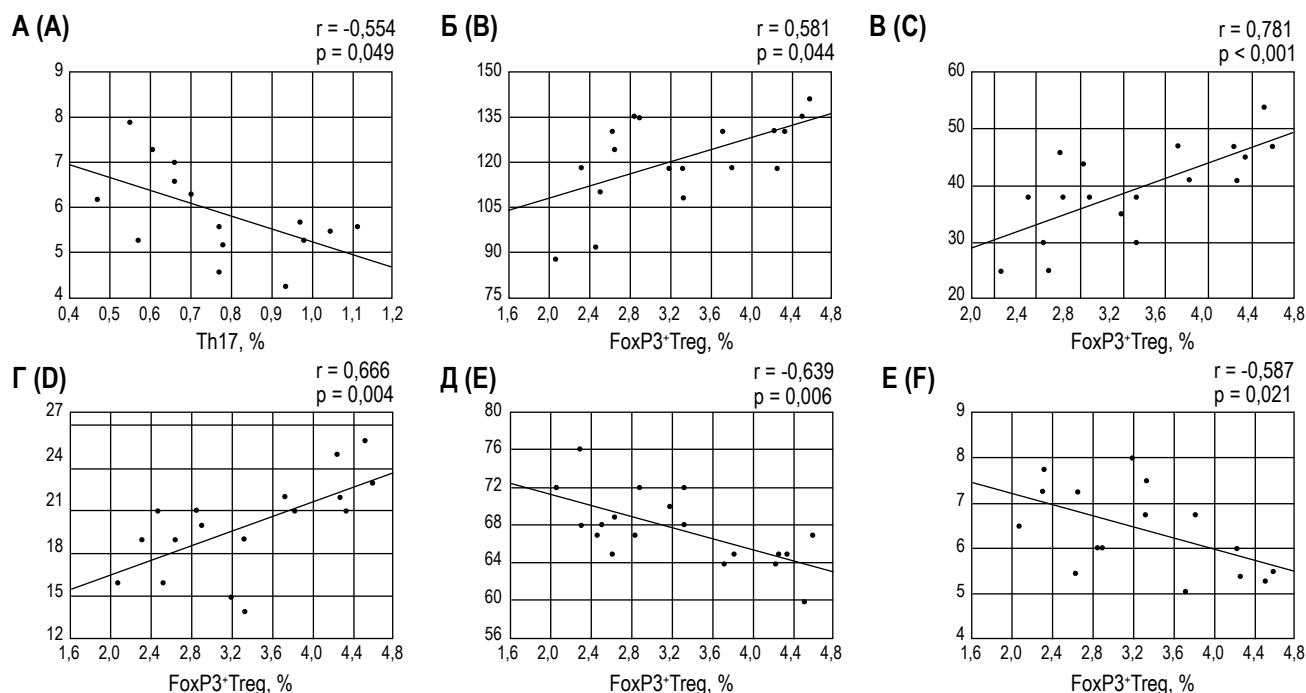


Рисунок 2. Взаимосвязи между содержанием Th17-лимфоцитов, FoxP3⁺T-регуляторных лимфоцитов и эхокардиографическими параметрами у пациентов группы 1

Примечание. Уровни значимости p были рассчитаны по методу Спирмена; коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (r) указаны над p .

Figure 2. Relationships between numbers of Th17 lymphocytes, FoxP3⁺T regulatory lymphocytes and echocardiographic parameters in patients from group 1

Note. The indicated p -values were calculated using Spearman correlation; Spearman's rank correlation coefficients (r) are indicated above p .

индекса левого желудочка (рис. 2). У пациентов из группы 2 (без нарушений углеводного обмена) данных взаимосвязей выявлено не было.

Анализ иммунологических и метаболических параметров у пациентов с сочетанием АГ и СД 2-го типа в зависимости от наличия диастолической дисфункции

Среди всех диабетических пациентов из группы 1 диастолическая дисфункция была выявлена у 17 больных. У пациентов с диастолической дисфункцией мы обнаружили тенденцию к снижению содержания FoxP3⁺Treg-лимфоцитов и соотношения между Treg-лимфоцитами и Th17-лимфоцитами по сравнению с диабетическими больными без диастолической дисфункции (рис. 3). При этом интенсивность продукции IL-17 в Th17-лимфоцитах, определенная по средней интенсивности флуоресценции, была ниже у пациентов с диастолической дисфункцией, что может рассматриваться как признак функционального истощения Th17-лимфоцитов (рис. 3). Пациенты с диастолической дисфункцией характеризовались худшим контролем гипергликемии и более высокими значениями индекса висцерального ожирения по сравнению с пациентами с нормальным функциональным состоянием сердца (табл. 2). Выявленные изменения сопро-

вождались повышенным содержанием общего холестерина и триглицеридов в крови (табл. 2).

Анализ иммунологических и метаболических параметров у пациентов с диастолической дисфункцией в зависимости от наличия сахарного диабета 2-го типа

Учитывая, что у ряда пациентов из группы 2 также была выявлена диастолическая дисфункция (у 11 пациентов из 14, включенных в исследование), следующей целью нашего исследования стало определить, чем различаются метаболические и иммунологические параметры при наличии диастолической дисфункции у пациентов с АГ и у пациентов с сочетанием АГ и СД 2-го типа. Помимо того, что для диабетических пациентов с диастолической дисфункцией было характерно состояние гиперинсулинемии, гипергликемии и инсулинорезистентности в соответствии с индексом HOMA-IR, в данной группе мы выявили повышенные значения окружности талии и индекса висцерального ожирения по сравнению с пациентами с АГ и диастолической дисфункцией (табл. 2). Это сопровождалось увеличением концентрации IL-10, TNF α и IFN γ в сыворотке крови, а также увеличением содержания IFN γ ⁺Th1-лимфоцитов в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов и снижением

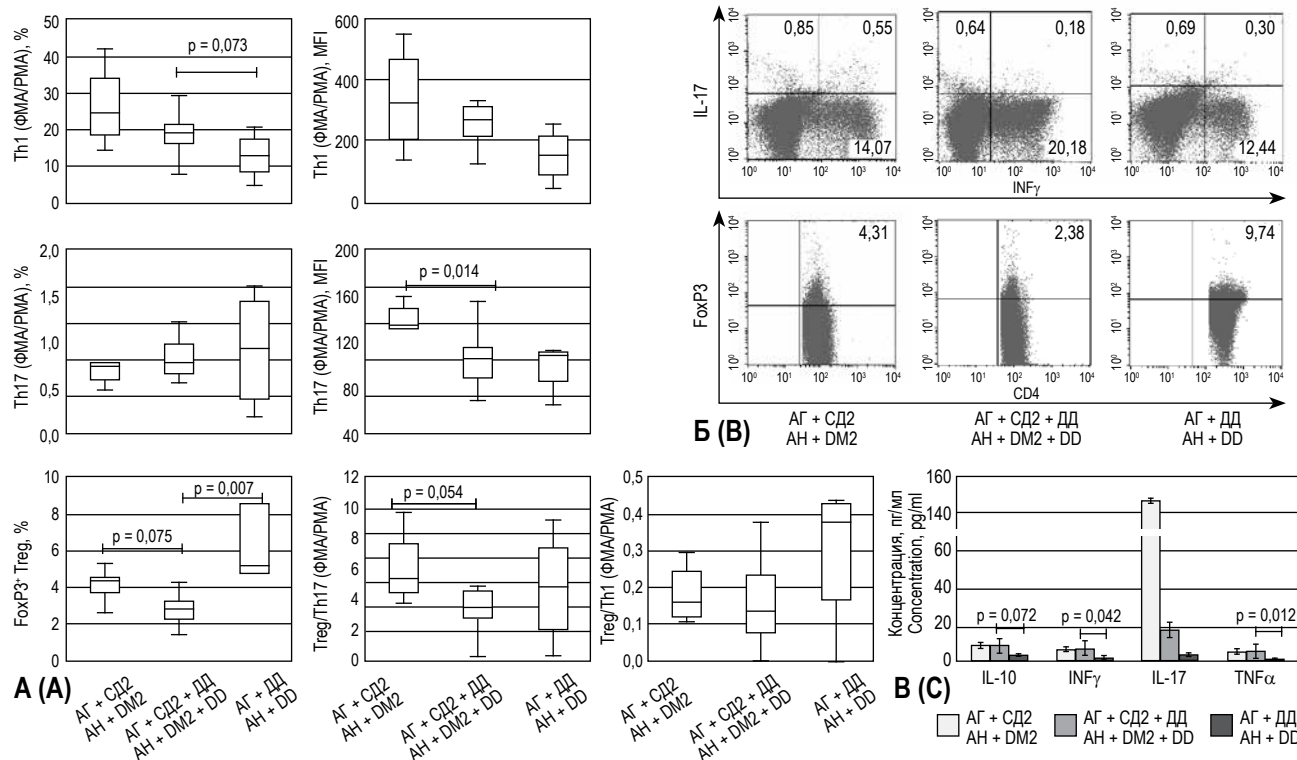


Рисунок 3. Субпопуляции CD4⁺T-лимфоцитов и сыывороточная концентрация цитокинов в зависимости от наличия диастолической дисфункции и сахарного диабета у пациентов

Примечание. А – содержание и средняя интенсивность флуоресценции Th1- и Th17-лимфоцитов; содержание FoxP3⁺T-регуляторных лимфоцитов (Treg) и соотношение между содержанием FoxP3⁺Treg и Th1-, Th17-лимфоцитов у пациентов. Б – примеры точечных диаграмм, отражающих содержание Th1-, Th17- и FoxP3⁺Treg-лимфоцитов у пациентов. В – концентрации цитокинов IL-10, IFN γ , IL-17 и TNF α в сыыворотке крови пациентов; АГ – артериальная гипертензия; СД2 – сахарный диабет 2-го типа; ДД – диастолическая дисфункция.

Figure 3. CD4⁺T lymphocytes' subpopulations and serum concentration of cytokines according to the presence or absence of diastolic dysfunction and diabetes mellitus in patients

Note. A, percentage and mean fluorescence intensity of Th1 and Th17 lymphocytes; percentage of FoxP3⁺T regulatory lymphocytes (Treg) and ratio between numbers of FoxP3⁺Treg and Th1, Th17 lymphocytes in patients.

B, representative dot plots showing numbers of Th1, Th17 and FoxP3⁺Treg lymphocytes in patients.

C, concentrations of cytokines IL-10, IFN γ , IL-17 and TNF α in patients' blood serum; AH, arterial hypertension; DM2, diabetes mellitus type 2; DD, diastolic dysfunction.

содержания FoxP3⁺T-регуляторных лимфоцитов (рис. 3).

Обсуждение

В соответствии с новой парадигмой важная роль в развитии ХСН с сохранной фракцией выброса отводится системному воспалению. По мере прогрессирования оно приводит к локальному воспалению эндотелия мелких коронарных сосудов и снижению биодоступности оксида азота, уменьшению содержания циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) и активности протеинкиназы G (PKG) в миокарде. Это в конечном итоге вызывает структурные нарушения миокарда, проявляющиеся в изменениях сократительного аппарата отдельных кардиомиоцитов и распространенным миокардиальным

фиброзом [36]. Было показано, что для пациентов с ХСН характерно увеличение концентрации провоспалительных хемокинов и цитокинов в периферической крови, наличие моноцитоза и предпочтительное направление дифференцировки моноцитов в сторону провоспалительных M2-макрофагов [20].

В нашем исследовании мы показали, что для диабетических пациентов с диастолической дисфункцией характерны вполне определенные особенности функционирования субпопуляций Т-лимфоцитов и нарушения со стороны метаболических параметров (инсулинорезистентность, дислипидемия, висцеральное ожирение). У пациентов с СД 2-го типа без структурно-функциональных нарушений сердца выявленные нарушения функционирования субпопуляций Т-лимфоцитов были выражены в меньшей степени, тогда как у

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ДИАСТОЛИЧЕСКОЙ ДИСФУНКЦИИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF PATIENTS ACCORDING TO THE PRESENCE OF DIASTOLIC DYSFUNCTION, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Параметр Parameter		Пациенты АГ + СД2 без ДД AH + DM2 patients without DD (n = 8)	Пациенты с АГ + СД2 с ДД AH + DM2 patients with DD (n = 17)	Пациенты с АГ с ДД AH patients with DD (n = 11)	p
Мужчины/женщины Male/female, n		6/2	10/7	8/3	
Возраст, лет Age, years		55,5 (46,5-63,5)	57,0 (51,0-62,0)	54,0 (47,0-58,0)	p ₁ = 0,840 p ₂ = 0,251
ИМТ, кг/м ² BMI, kg/m ²		31,5 (28,2-32,4)	32,8 (29,4-35,5)	29,9 (26,8-35,8)	p ₁ = 0,152 p ₂ = 0,193
Окружность талии, см Waist circumference, cm	мужчины male	102,0 (96,0-104,0)	106,0 (105,0-110,0)	98,5 (88,0-102,5)	p ₁ = 0,030 p ₂ = 0,030
	женщины female	107,0 (105,0-109,0)	107,5 (98,5-110,0)	94,0 (87,0-109,0)	p ₁ = 1,000 p ₂ = 0,629
Систолическое АД, мм рт. ст. Systolic BP, mm Hg		120,0 (113,0-130,0)	140,0 (128,0-147,0)	125,0 (110,0-140,0)	p ₁ = 0,054 p ₂ = 0,203
Диастолическое АД, мм рт. ст. Diastolic BP, mm Hg		76,0 (76,0-80,0)	83,0 (75,0-90,0)	80,0 (70,0-90,0)	p ₁ = 0,281 p ₂ = 0,762
Продолжительность СД2, годы DM2 duration, years		3,0 (1,0-9,0)	5,0 (0,5-12,0)	–	p ₁ = 0,962
Продолжительность АГ, годы AH duration, years		1,0 (0,5-10,0)	10,0 (9,0-12,0)	7,0 (4,0-10,0)	p ₁ = 0,071 p ₂ = 0,112
Инсулин, мкМЕ/мл Insulin, µIU/ml		13,6 (9,9-24,0)	19,8 (10,5-28,1)	6,0 (5,4-14,8)	p ₁ = 0,536 p ₂ = 0,016
Глюкоза, мМ Glucose, mM		6,6 (5,2-8,0)	8,5 (7,3-10,0)	5,6 (4,7-7,2)	p ₁ = 0,098 p ₂ = 0,002
НОМА-IR		4,1 (3,3-8,6)	5,6 (4,7-9,4)	2,6 (1,8-5,1)	p ₁ = 0,328 p ₂ = 0,016
HbA1c, %		6,7 (6,1-7,1)	9,2 (8,3-10,3)	5,8 (5,5-6,5)	p ₁ = 0,036 p ₂ = 0,001
Общий холестерин, мМ Total cholesterol, mM		4,9 (4,7-5,9)	6,4 (5,1-7,1)	6,9 (5,6-7,3)	p ₁ = 0,069 p ₂ = 0,316
Триглицериды, мМ Triglycerides, mM		1,8 (1,5-2,2)	2,7 (1,8-3,3)	2,1 (1,2-2,3)	p ₁ = 0,047 p ₂ = 0,051
Холестерин ЛПНП, мМ LDL-cholesterol, mM		3,2 (2,8-4,1)	3,6 (3,0-4,8)	4,7 (4,4-5,1)	p ₁ = 0,305 p ₂ = 0,169
Холестерин ЛПВП, мМ HDL-cholesterol, mM		0,9 (0,7-1,2)	1,1 (0,9-1,3)	1,1 (0,8-1,3)	p ₁ = 0,238 p ₂ = 0,928
ЛПНП/ЛПВП LDL/HDL		3,1 (2,6-5,0)	3,4 (2,6-4,4)	3,7 (3,0-5,6)	p ₁ = 0,851 p ₂ = 0,260

Примечание. ДД – диастолическая дисфункция; p₁ – уровень значимости различий между пациентами с СД с наличием и отсутствием ДД; p₂ – уровень значимости различий между пациентами с АГ + ДД и СД + ДД. Аббревиатуры указаны в таблице 1.

Note. DD, diastolic dysfunction; p₁, significance of differences between DM2 patients according to the presence or absence of DD; p₂, significance of differences between AH + DD and DM2 + DD patients. Abbreviations as in Table 1.

недиабетических пациентов с АГ и диастолической дисфункцией они отсутствовали.

Becher P.M. и соавт. (2013) показали, что при стрептозотоцин-индуцированном диабете у мышей была отмечена аккумуляция CD3⁺ лимфоцитов в ткани сердца, что коррелировало со снижением сократимости левого желудочка и конечного систолического давления и увеличением жесткости [8]. Однако ранее мы не встретили исследований, посвященных изучению субпопуляционного состава Т-лимфоцитов при развитии диастолической дисфункции у диабетических пациентов. Согласно нашим данным, важную роль в развитии системного воспаления при кардиальной дисфункции, ассоциированной с СД 2-го типа, может играть снижение содержания FoxP3⁺Т-регуляторных лимфоцитов. Показано, что Treg-лимфоциты обладают потенциалом нивелировать повреждающие эффекты провоспалительных агентов на миокард за счет межклеточных взаимодействий и секреции противовоспалительных цитокинов [10, 22]. По этим причинам снижение содержания Treg-лимфоцитов может являться одним из звеньев патогенеза диастолической дисфункции при СД 2-го типа.

Результаты нашей работы и ранее проведенных нами исследований позволяют выделить два патогенетических фактора, которые могли способствовать развитию иммунорегуляторного дисбаланса у пациентов с СД 2-го типа и диастолической дисфункцией: висцеральное ожирение и инсулинорезистентность с неудовлетворительным контролем гликемии [3].

Как правило, СД 2-го типа ассоциируется с избыточной массой тела и ожирением у пациентов [13, 17]. В настоящее время жировая ткань рассматривается не как инертное депо липидов в организме, а как эндокринный орган, секретирующий в кровь большое количество цитокинов и хемокинов [30]. Было показано, что при развитии ожирения значительно снижается количество Treg в жировой ткани, что может вносить вклад в развитие локального, а впоследствии и системного воспаления [18]. Показано, что для пациентов с избыточным весом характерно развитие повышенной жесткости артерий. Это, в совокупности с другими патогенетическими факторами, такими как повышенная симпатическая активация, легочная вазоконстрикция, оксидативный стресс, предрасполагает к развитию диастолической дисфункции [38]. В нашем исследовании для пациентов с СД 2-го типа и диастолической дисфункцией было характерно увеличение индекса висцерального ожирения. Хотя этот показатель является суррогатным маркером накопления висцеральной жировой ткани, его диагностическая ценность превышает такие

параметры, как индекс массы тела и окружность талии, рассчитанные независимо [5]. Вполне вероятно, что наличие висцерального ожирения у пациентов могло внести вклад в развитие дисбаланса между провоспалительными субпопуляциями Th1- и Th17-лимфоцитов и Т-регуляторными лимфоцитами, а в дальнейшем приводить к диастолической дисфункции.

Согласно данным Viardot A. и соавт. (2012), наличие ожирения ассоциируется со снижением чувствительности клеток иммунной системы к регуляторному влиянию инсулина [42]. Авторы также показали, что инсулин направляет дифференцировку клеток по пути Th2-лимфоцитов, обладающих антагонистическими свойствами по отношению к Th1 [42]. Таким образом, в условиях инсулинорезистентности Th1-клетки получают преимущество в развитии, что вносит вклад в формирование системного воспаления. Кроме того, в условиях гиперинсулинемии происходит ингибирование Т-регуляторных лимфоцитов, а именно, снижение выработки IL-10, что также способствует созданию условий для активации Т-хелперных субпопуляций с провоспалительной активностью [21]. При этом уровень гликемии (концентрации глюкозы в крови) также является критическим фактором в дифференцировке и активации Т-лимфоцитов. Показано, что в отсутствие глюкозы в среде культивирования дифференцировка в направлении Th17 является невозможной. При этом Treg характеризуются низкой экспрессией как поверхностного белка-транспортера глюкозы Glut1, так и его внутриклеточной формы и в качестве основного источника энергии используют не глюкозу, а липиды [24, 32]. В то же время известно, что неудовлетворительный контроль гликемии способствует развитию диастолической дисфункции [39]. Вероятно, в группе пациентов с СД и диастолической дисфункцией повышенный уровень инсулинорезистентности и гипергликемия могли послужить иницирующими факторами активации Th1- и Th17-лимфоцитов, что привело к функциональному истощению Th17 и способствовало развитию дисбаланса между Treg- и Th17-лимфоцитами. Мы полагаем, что полученные результаты можно рассматривать как выявленную тенденцию, которая требует дальнейшего более детального изучения.

Ограничением нашей работы можно считать проведение исследования субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови. Анализ, проведенный в ткани сердца, позволил бы дать более точную оценку взаимосвязи иммунологических изменений с состоянием миокарда. Так, Becher P.M. и соавт. (2013) показали, что у мышей с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, наблюдается увеличение числа CD3⁺

клеток в кардиальной ткани, которое ассоциируется с нарушениями внеклеточного матрикса и изменением экспрессии структурных белков миокарда [8], однако в данной работе анализ субпопуляционного состава лимфоцитов не проводился. Другими авторами было установлено, что повышенная секреция провоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста Th1-лимфоцитами способствует увеличению сердечного фиброза и нарушению диастолической релаксации [43]. В то же время известно, что особенности функционирования различных субпопуляций Т-лимфоцитов могут отличаться у мышей и у людей, поэтому трансляция экспериментальных данных в клинику может быть затруднена [6]. Преимуществом нашей работы является изучение взаимосвязи иммунорегуляторного дисбаланса, метаболических параметров и функциональных особенностей сердца непосредственно у пациентов с СД 2-го типа.

Заключение

У пациентов с артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа, наличие диастолической дисфункции сочетается с развитием иммунорегуляторного дисбаланса, отличительными чертами которого являются увеличение содержания Th1-лимфоцитов, снижение содержания FoxP3⁺Treg-лимфоцитов и соотношения Treg/Th1- и Treg/Th17-лимфоцитов, истощение функциональной активности Th17-лимфоцитов. В качестве возможных иницирующих факторов выявленных изменений можно рассматривать висцеральное ожирение, ассоциированное с инсулинорезистентностью. Взаимосвязь между функциональной активностью Т-лимфоцитов, метаболическими параметрами и структурно-функциональными изменениями сердца у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа требует дальнейшего изучения.

Список литературы / References

1. Дедов И.И. Сахарный диабет – опаснейший вызов мировому сообществу // Вестник Российской академии медицинских наук, 2012. Т. 67, № 1. С. 7-13. [Dedov I.I. Diabetes mellitus – a dangerous treat to the mankind. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, Vol. 67, no. 1, pp. 7-13. (In Russ.)]
2. Дедов И.И., Омеляновский В.В., Шестакова М.В., Авксентьева М.В., Игнатьева В.И. Сахарный диабет как экономическая проблема в Российской Федерации // Сахарный диабет, 2016. Т. 19, № 1. С. 30-43. [Dedov I.I., Omelyanovsky V.V., Shestakova M.V., Avksentieva M.V., Ignatieva V.I. Diabetes mellitus as an economic problem in Russian Federation. *Sakharnyy diabet = Diabetes Mellitus*, 2016, Vol. 19, no. 1, pp. 30-43. (In Russ.)]
3. Кологривова И.В., Кошельская О.А., Суслова Т.Е., Карпов Р.С. Контроль гликемии, инсулинорезистентность и функциональная активность субпопуляций Т-лимфоцитов-хелперов у больных сахарным диабетом 2-го типа // Российский кардиологический журнал, 2014. № 3. С. 95-101. [Kologrivova I.V., Koshelskaya O.A., Suslova T.E., Karpov R.S. Glycemia control, insulin resistance, and functional activity of T-helper subpopulations in patients with type 2 diabetes mellitus. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*, 2014, no. 3, pp. 95-101. (In Russ.)]
4. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.*, 2013, Vol. 34, no. 28, pp. 2159-2219.
5. Amato M.C., Giordano C., Galia M., Criscimanna A., Vitabile S., Midiri M., Galluzzo A.; AlkaMeSy Study Group. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care*, 2010, Vol. 33, no. 4, pp. 920-922.
6. Annunziato F., Romagnani S. Do studies in humans better depict Th17 cells? *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 11, pp. 2213-2219.
7. Araz M., Bayrac A., Ciftci H. The impact of diabetes on left ventricular diastolic function in patients with arterial hypertension. *North Clin. Istanbul*, 2015, Vol. 2, no. 3, pp. 177-181.
8. Becher P.M., Lindner D., Fröhlich M., Savvatis K., Westermann D., Tschöpe C. Assessment of cardiac inflammation and remodeling during the development of streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy *in vivo*: A time course analysis. *Int. J. Mol. Med.*, 2013, Vol. 32, pp. 158-164.
9. Bhatia R.S., Tu J.V., Lee D.S., Austin P.C., Fang J., Haouzi A., Gong Y., Liu P.P. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based. *N. Engl. J. Med.*, 2006, Vol. 355, pp. 260-269.
10. Cao Y., Xu W., Xiong S. Adoptive transfer of regulatory T cells protects against Coxsackievirus B3-induced cardiac fibrosis. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 9, e74955. doi: 10.1371/journal.pone.0074955.
11. Carbone S., Shah K.B., van Tassell B.W., Canada J.M., Evans R.K., Regan J.A., Buzzetti R., Abbate A. Obesity and diastolic heart failure: is inflammation the link? *Transl. Med.*, 2013, Vol. 3, e124. doi: 10.4172/2161-1025.1000e124.
12. Carugo S., Giannattasio C., Calchera I., Paleari F., Gorgoglione M.G., Grappiolo A., Gamba P., Rovaris G., Failla M., Mancina G.. Progression of functional and structural cardiac alterations in young normotensive uncomplicated patients with type 1 diabetes mellitus. *J. Hypertens.*, 2001, Vol. 19, pp. 1675-1680.
13. DeFronzo R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med. Clin. N. Am.*, 2004, Vol. 88, no. 4, pp. 787-835.

14. Devereux R.B., Alonso D.R., Lutas E.M., Gottlieb G.J., Campo E., Sachs I., Reichek N. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am. J. Cardiol.*, 1986, Vol. 57, no. 6, pp. 450-458.
15. Donath M.Y., Shoelson S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 2, pp. 98-107.
16. Ernande L., Derumeaux G. Diabetic cardiomyopathy: Myth or reality. *Arch. Cardiovasc. Dis.*, 2012, Vol. 105, no. 4, pp. 218-225.
17. Ezquerria E.A., Vázquez J.M.C., Barrero A.A. Obesity, metabolic syndrome and diabetes: Cardiovascular implications and therapy. *Rev. Esp. Cardiol.*, 2008, Vol. 61, no. 7, pp. 752-764.
18. Feuerer M., Herrero L., Cipoletta D., Naaz A., Wong J., Nayer A., Lee J., Goldfine A.B., Benoist C., Shoelson S., Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, no. 8, pp. 930-939.
19. García M.J., McNamara P.M., Kannel W.B. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population: sixteen-year follow up study. *Diabetes*, 1974, Vol. 23, pp. 105-111.
20. Glezeva N., Voon V., Watson C., Horgan S., McDonald K., Ledwidge M., Baugh J. Exaggerated inflammation and monocytes associate with diastolic dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: evidence of M2 macrophage activation in disease pathogenesis. *J. Card. Fail.*, 2015, Vol. 21, no. 2, pp. 167-177.
21. Han J.M., Patterson S.J., Speck M., Ehses J.A., Levings M.K. Insulin inhibits IL-10-mediated regulatory T cell function: Implications for obesity. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 2, pp. 623-629.
22. He S., Li M., Ma X., Lin J., Li D. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells protect the proinflammatory activation of human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010, Vol. 30, no. 12, pp. 2621-2630.
23. Hotamisligil G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 2006, Vol. 444, no. 7121, pp. 860-867.
24. Howie D., Cobbold S.P., Adams E., Bokum A.T., Necula A.S. FoxP3 drives oxidative phosphorylation and protection from lipotoxicity. *JCI Insight*, 2017, Vol. 2, no. 3, e89160. doi:10.1172/jci.insight.89160.
25. Jagannathan-Bogdan M., McDonnell M.E., Shin H., Rehman Q., Hasturk H., Apovian C.M., Nikolajczyk B.S. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 2, pp. 1162-1172.
26. Kannel W.B., Hjortland M., Castelli W.P. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham Study. *Am. J. Cardiol.*, 1974, Vol. 34, pp. 29-34.
27. Kasznicki J., Drzewoski J. Heart failure in the diabetic population – pathophysiology, diagnosis and management. *Arch. Med. Sci.*, 2014, Vol. 10, no. 3, pp. 546-556.
28. Lang R.M., Badano L.P., Mor-Avi V., Afilalo J., Armstrong A., Ernande L., Flachskampf F.A., Foster E., Goldstein S.A., Kuznetsova T., Lancellotti P., Muraru D., Picard M.H., Rietzschel E.R., Rudski L3, Spencer K.T., Tsang W., Voigt J.U. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J. Am. Soc. Echocardiogr.*, 2015, Vol. 28, no. 1, pp. 1-39.
29. Liu Q., Wang S., Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: role of oxidative stress and damage. *J. Diabetes Investig.*, 2014, Vol. 5, no. 6, pp. 623-634.
30. Makki K., Froguel P., Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: Cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, 139239. doi:10.1155/2013/139239.
31. Matheus A.S., Tannus L.R., Cobas R.A., Palma C.C., Negrato C.A., Gomes M.B. Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. *Int. J. Hypertens.*, 2013, Vol. 2013, 653789. doi: 10.1155/2013/653789.
32. Michalek R.D., Gerriets V.A., Jacobs S.R., Macintyre A.N., MacIver N.J., Mason E.F., Sullivan S.A., Nichols A.G., Rathmell 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.
33. Nagueh S.F., Appleton C.P., Gillebert T.C., Marino P.N., Oh J.K., Smiseth O.A., Waggoner A.D., Flachskampf F.A., Pellikka P.A., Evangelisa A. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *Eur. J. Echocardiogr.*, 2009, Vol. 10, no. 2, pp. 165-193.
34. Nagueh S.F., Smiseth O.A., Appleton C.P., Byrd B.F., Dokainish H., Edvardsen T., Flachskampf F.A., Gillebert T.C., Klein A.L., Lancellotti P., Marino P., Oh J.K., Popescu B.A., Waggoner A.D. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J. Am. Soc. Echocardiogr.*, 2016, Vol. 29, no. 4, pp. 277-314.
35. Olefsky J.M., Glass C.K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.*, 2010, Vol. 72, pp. 219-246.
36. Paulus W.J., Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2013, Vol. 62, no. 4, pp. 263-271.
37. Ponikowski P., Voors A.A., Anker S.D., Bueno H., Cleland J.G., Coats A.J., Falk V., González-Juanatey J.R., Harjola V.P., Jankowska E.A., Jessup M., Linde C., Nihoyannopoulos P., Parissis T., Pieske B., Riley J.P., Rosano G.M., Ruilope L.M., Ruschitzka F., Rutten F.H., van der Meer P. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.*, 2016, Vol. 37, no. 27, pp. 2129-2200.

38. Samson R., Jaiswal A., Ennezat P.V., Cassidy M., Le Jemtel T.H. Samson R., Jaiswal A., Ennezat P.V., Cassidy M., le Jemtel T.H. Clinical phenotypes in heart failure with preserved ejection fraction. *J. Am. Heart Assoc.*, 2016, Vol. 5, no. 5, e002477. doi: 10.1161/JAHA.115.002477.
39. Sánchez-Barriga J.J., Rangel A., Castañeda R., Flores D., Frati A.C., Ramos M.A., Amato D. Left ventricular diastolic dysfunction secondary to hyperglycemia in patients with type II diabetes. *Arch. Med. Res.*, 2001, Vol. 32, no. 1, pp. 44-47.
40. Schannwell C.M., Schneppenheim M., Perings S., Plehn G., Strauer B.E. Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy. *Cardiology*, 2002, Vol. 98, no. 1-2, pp. 33-39.
41. Shoelson S.E., Lee J., Goldfine A.B. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 7, pp. 1793-1801.
42. Viardot A., Heilbronn L.K., Samocha-Bonet D., Mackay F., Campbell L.V., Samaras K. Obesity is associated with activated and insulin resistant immune cells. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2012, Vol. 28, no. 5, pp. 447-454.
43. Yu Q., Vazquez R., Zabadi S., Watson R.R., Larson D.F. T-lymphocytes mediate left ventricular fibrillar collagen cross-linking and diastolic dysfunction in mice. *Matrix Biol.*, 2010, Vol. 29, no. 6, pp. 511-518.
44. Zeng C., Shi X., Zhang B., Liu H., Zhang L., Ding W., Zhao Y. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2012, Vol. 90, no. 2, pp. 175-186.

Авторы:

Кологривова И.В. — к.м.н., научный сотрудник отделения функциональной и лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Суслова Т.Е. — к.м.н., ведущий научный сотрудник отделения функциональной и лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Винницкая И.В. — научный сотрудник отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Кошельская О.А. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Бощенко А.А. — д.м.н., старший научный сотрудник отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, заместитель директора по научной работе, Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Трубачева О.А. — к.м.н., научный сотрудник отделения функциональной и лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Authors:

Kologrivova I.V., PhD (Medicine), Research Associate, Department of Functional and Laboratory Diagnostics, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences; Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Suslova T.E., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Functional and Laboratory Diagnostics, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Vinnitskaya I.V., Research Associate, Department of Atherosclerosis and Chronic Ischemic Heart Disease, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Koshelskaya O.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Department of Atherosclerosis and Chronic Ischemic Heart Disease, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Boshchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Atherosclerosis and Chronic Ischemic Heart Disease, Deputy Director for Research, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Trubacheva O.A., PhD (Medicine), Research Associate, Department of Functional and Laboratory Diagnostics, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Поступила 22.01.2018

Отправлена на доработку 07.02.2018

Принята к печати 06.03.2018

Received 22.01.2018

Revision received 07.02.2018

Accepted 06.03.2018

ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЕ ВЛИЯНИЯ ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛДИПЕПТИДА НА НЕТРАНСФОРМИРОВАННЫЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ТРАНСФОРМИРОВАННЫЙ ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИИ CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Нестерова И.В.^{1,2}, Малиновская В.В.³, Хайдуков С.В.⁴,
Нгуен Тхи Зеу Лен¹, Чудилова Г.А.², Ломтатидзе Л.В.²

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

³ ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Российской академии медицинских наук», Москва, Россия

⁴ ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Москва, Россия

Резюме. Современными исследованиями доказана высокая пластичность и существование множества фенотипов нейтрофильных гранулоцитов (НГ) с разной рецепторной оснащённостью, являющейся для исследователей диагностическим маркером функциональной возможности клетки, реализуемой в ходе работы. Исследованы НГ периферической крови, полученные от здоровых лиц обоего пола в возрасте от 26 до 66 лет. Оценка экспрессии рецепторов на мембране НГ проводилась методом проточной цитометрии. Оценивали относительное количество нейтрофильных гранулоцитов, несущих мембранные CD62L, CD63, CD66d рецепторы, и интенсивность их экспрессии по значению средней интенсивности флуоресценции. Проведено изучение поверхностных мембранных рецепторов НГ – CD62L, CD63, CD66d – под влиянием бактериального пептида N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP) (модель 1), под воздействием глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) (модель 2) и при одновременной инкубации НГ цельной крови с fMLP и ГМДП (модель 3) в созданных в системе *in vitro* экспериментальных моделях. Под влиянием бактериального пептида fMLP в созданной в системе *in vitro* экспериментальной модели получена трансформация фенотипа НГ условно здоровых субъектов, экспрессирующих CD62, CD63, CD66d молекулы: значительно уменьшилось

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
Министерства образования и науки РФ
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123-1.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Nesterova Irina V.
People's Friendship University of Russia
117513, Russian Federation, Moscow, Leninsky ave, 123-1.
Phone: 7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Нестерова, В.В. Малиновская, С.В. Хайдуков, Тхи Зеу Лен Нгуен, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе «Дифференцированные влияния глюкозаминилмурамилдипептида на нетрансформированный и экспериментально трансформированный фенотип субпопуляции CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺ нейтрофильных гранулоцитов условно здоровых лиц» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 847-854.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-847-854

© Нестерова И.В. и соавт., 2018

For citation:

I.V. Nesterova, V.V. Malinovskaya, S.V. Khaydukov, Thi Dieu Lien Nguyen, G.A. Chudilova, L.V. Lomtadidze "Differentiated effects of glucosaminyl muramyl dipeptide on the non-transformed and experimentally transformed phenotype of CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺ neutrophilic granulocytes in conventionally healthy people", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 847-854. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-847-854

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-847-854

как относительное количество нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих CD62L, так и плотность экспрессии CD62L с параллельным повышением плотности экспрессии CD63. Воздействие ГМДП на нетрансформированный фенотип НГ условно здоровых субъектов не изменяло количества CD62L⁺НГ и CD63⁺НГ и плотность экспрессии CD62L и CD63 на поверхностной мембране НГ, однако при этом достоверно увеличилось количество CD66d⁺НГ, при неизменившейся плотности экспрессии молекул CD66d. ГМДП, введенный одномоментно с бактериальным пептидом fMLP, нивелировал некоторые трансформационные изменения фенотипа НГ, возникающие под влиянием fMLP: незначительно восстановилось количество CD62L⁺НГ и достоверно возросла плотность экспрессии CD62L; при этом ГМДП не корректировал негативное влияние fMLP на количество CD63⁺НГ и CD66d⁺НГ и плотность экспрессии молекул CD63 и CD66d. Одномоментное введение fMLP и ГМДП достоверно увеличило количество CD66d⁺НГ и плотность экспрессии молекул CD63 на мембране CD63⁺НГ по сравнению с интактными НГ условно здоровых субъектов. Полученные данные важны для разработки новых иммунотерапевтических стратегий, направленных на коррекцию негативно трансформированного фенотипа НГ при нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваниях бактериальной этиологии.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, эксперимент *in vitro*, трансформация иммунофенотипа

DIFFERENTIATED EFFECTS OF GLUCOSAMINYLMURAMILDIPEPTIDE ON THE NON-TRANSFORMED AND EXPERIMENTALLY TRANSFORMED PHENOTYPE OF CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺ NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CONVENTIONALLY HEALTHY PEOPLE

Nesterova I.V.^{a, b}, Malinovskaya V.V.^c, Khaydukov S.V.^d,
Nguyen Thi Dieu Lien^a, Chudilova G.A.^b, Lomtadze L.V.^b

^a People's Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

^b Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^c N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^d M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Abstract. Modern studies have shown a high plasticity and phenotypic diversity of neutrophilic granulocytes (NG) provided by different receptors, which are diagnostic markers for the functional capacity of the cell in the course of their activities. We investigated NG from peripheral blood, obtained from healthy people of both sexes aged from 26 to 66 years. Evaluation of the neutrophil membrane receptor expression was carried out by flow cytometry. The relative amount of neutrophilic granulocytes expressing membrane CD62L, CD63, CD66d receptors and the intensity of their expression were determined according to their fluorescence intensities. The surface NG membrane receptors, i.e., CD62L, CD63, CD66d were studied upon the *in vitro* experimental influence of the following bacterial peptides: N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP, model 1); glucosaminylmuramyl dipeptide (GMDP, model 2), and simultaneous incubation of NG blood with fMLP and GMDP (model 3). The *in vitro* treatment with fMLP in the *in vitro* model was used to transform the NG phenotype of conventionally healthy subjects, expressing CD62, CD63, CD66d molecules. The treatment caused a significant decrease in both CD62L and the CD62L expression in relative amounts of neutrophilic granulocytes with a parallel increase of CD63 expression density. The effect of GMDP on the NG phenotype of conditionally healthy subjects did not change the amount of CD62L⁺NG and CD63⁺NG, and did not affect CD62L and CD63 expression density on the surface of NG. However, the amount of CD66d⁺NG was significantly increased with the unchanged expression of CD66d molecules. GMDP introduced together with the bacterial fMLP peptide was shown to neutralize some features of the NG phenotype transformation caused by fMLP, i.e., the amount of CD62L⁺NG was restored by 22 % and the CD62L expression density increased significantly. At the same time, GMDP did not correct the negative effect of fMLP upon the number of CD63⁺NG and CD66d⁺NG, and on the CD63 and CD66d expression. Simultaneous addition of fMLP

and GMDP did significantly increase the amount of CD66d⁺NG and expression density of CD63 molecules on the CD63⁺NG membrane as compared to intact NG of conditionally healthy subjects. The obtained data are important in order to justify some new immunotherapeutic strategies aimed at correction of the negatively transformed NG phenotype, which accompanies some infectious and inflammatory diseases of bacterial etiology with atypical clinical course.

Keywords: neutrophilic granulocytes, in vitro experiment, immunophenotype transformation

Введение

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) являются доминантными клетками иммунной системы, которые способны молниеносно реагировать на изменение экстрацеллюлярного микроокружения (острофазные белки, стрессорные половые гормоны, хемокины, цитокины, бактерии, вирусы, грибы и т.д.) благодаря мощному рецепторному оснащению. Очевиден факт, свидетельствующий о том, что богатый арсенал высокочувствительных мембранных поверхностных структур предопределяет функциональную направленность НГ и резервную способность к молниеносной перестройке фенотипов различных субпопуляций НГ в зависимости от инициирующего сигнала [1, 4, 7, 11]. Современными исследованиями доказана высокая пластичность и существование множества фенотипов нейтрофильных гранулоцитов с разной рецепторной оснащенностью, являющейся для исследователей диагностическим маркером функциональной возможности клетки, реализуемой в ходе работы. Отсутствие адекватного реагирования, а также гиперактивация или полная функциональная блокада НГ приводят к развитию заболеваний, не отвечающих на традиционную терапию.

Изучение поверхностных мембранных рецепторов НГ — CD62L, CD63, CD66d — представляет несомненно большой интерес.

CD62L — L-селектин [LAM-1] относится к семейству поверхностных селектинов, участвующих в «роллинге» НГ на поверхности эндотелия. CD62L экспрессируются на всех циркулирующих неактивированных НГ и костномозговых миелоидных клетках. Известно, что при запуске воспалительного процесса в ходе иммунного ответа уровень экспрессии CD62L может меняться [3].

CD63 — лизосомальный мембран-ассоциированный гликопротеин-3 (LAMP-3) семейства тетраспанинов (TM4SF, transmembrane-4 superfamily). CD63 и другие тетраспанины (CD9, CD81, CD82) образуют связь с VLA-3, фосфатидилинозитол-4-киназой, VLA-6, CD11/CD18 и тирозин-киназой. CD63 экспрессируется на поверхности и цитоплазме многих клеток организма человека. Известно, что CD63 содержится только в азурофильных гранулах неактивированных нейтрофилов, и увеличение уров-

ня экспрессии данного рецептора на мембране клетки свидетельствует о запуске процесса дегрануляции, что в свою очередь является маркером активации НГ в процессе фагоцитоза [9].

CD66d рецептор НГ — молекула клеточной адгезии — раково-эмбриональный антиген, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов (CEACAM). CD66d (GM-1) является эксклюзивным маркером гранулоцитов, экспрессия которого увеличивается под влиянием многих стимуляторов. Известно, что повышение адгезионной активности НГ, опосредованной молекулой CD66d, сопряжена с увеличением экспрессии CD11/CD18 и снижением экспрессии CD62L на поверхностной мембране НГ. Интересен тот факт, что данный рецептор может играть роль паттернраспознающего рецептора для некоторых бактерий [12, 13].

В настоящее время описаны особенности изменения интенсивности оснащения рецепторами CD62L, CD16 субпопуляции CD16⁺CD62L⁺ при вирусных и вирусно-бактериальных инфекциях новорожденных [6] и CD62L, CD63 субпопуляции CD62L⁺CD63⁺НГ здоровых новорожденных и новорожденных с врожденной пневмонией и при пневмонии, осложненной сепсисом [10]. Наши исследования выявили наличие субпопуляций НГ: CD62L^{dim}CD63^{dim}, CD62L^{bright}CD63^{dim}, CD62L^{dim}CD63^{mid}. Изменение соотношения субпопуляций (увеличение CD62L^{dim}CD63^{mid}НГ на фоне снижения CD62L^{bright}CD63^{dim}НГ) является маркером тяжести протекающего инфекционного процесса [10]. Оценка антигенного репертуара НГ с учетом интенсивности экспрессии рецепторов на мембранной поверхности клетки дает возможность оценивать не только полноценность функционального состояния нейтрофильных гранулоцитов, но и их доминантную направленность как при нормальных физиологических, так и при различных патологических процессах. Проведенные ранее исследования позволили заключить, что ядерный аппарат НГ быстро отвечает изменением уровня реструктуризации хроматина и его биологической активности на самые различные внешние стимулы. Реструктуризация хроматина является предверием проявления матричной активности ДНК с последующим белковым синтезом. Так, при воздействии на НГ в эксперименте в системе *in vitro* таких цитокинов,

как $\text{IFN}\gamma$, G-CSF, $\text{TNF}\alpha$ или их комплекса, наблюдались различные трансформации фенотипа субпопуляций НГ $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+$ и $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+$, коррелирующие с достоверным увеличением реструктуризации хроматина НГ [2]. Показано, что при инкубации НГ здоровых субъектов с $\text{IFN}\gamma$ *in vitro* повышается уровень экспрессии генов IL-8, IL-1 β и $\text{TNF}\alpha$ относительно неиндуцированного контроля. Следует отметить, что в ходе исследования была отмечена сильная прямая корреляционная связь между трансформационными изменениями фенотипа НГ, экспрессией генов цитокинов и уровнем реструктуризации хроматина [2].

Эксперимент *in vitro*, в ходе которого создается модель, предоставляет исследователю неограниченные возможности, поскольку есть тесная связь между действующим причинным фактором и инициируемым процессом. Исследования, проводимые с целью выявления возможностей влияния на клетку определенной иммуотропной субстанции (ИТС), позволяют оценить непосредственное воздействие ИТС на рецепторное оснащение НГ, сопряженное с модуляцией их функциональной активности, и по-прежнему представляют определенный интерес. Полученные в ходе таких исследований данные в дальнейшем могут явиться основой для разработки новых методов таргетных иммунотерапевтических воздействий на дефектно функционирующие НГ (нейтропения, депрессия фагоцитарной функции, негативная гиперактивация, «парализис»-блокада активации при контакте с микробным антигеном) при многих иммунозависимых заболеваниях.

В связи с изложенным определенный интерес представляет изучение влияния глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) с доказанными иммуотропными свойствами на трансформированный фенотип НГ. ГМДП представляет собой основную структурную единицу пептидогликана клеточной стенки бактерий, который связывается с цитозольными рецепторами NOD2 и YB1, запускает сигналинг, что в конечном итоге приводит к повышению экспрессии генов провоспалительных цитокинов, инициирующих базисную воспалительную реакцию [5]. Известно, что воздействие ГМДП вызывает стимуляцию эффекторных функций фагоцитов (фагоцитоз, синтез активных форм кислорода, активация микробицидных систем, презентация антигенов) [8], тем не менее исследования влияния ГМДП на экспрессию мембранных рецепторов CD62L, CD63, CD66d НГ до настоящего времени не проводилось. Таким образом, создание экспериментальных моделей дисфункций НГ и экспериментальный поиск новых иммуотропных субстанций,

действие которых будет корректировать работу дефектно функционирующих НГ, является, с нашей точки зрения, перспективным направлением и представляет определенный интерес.

Цель исследования — оценить особенности влияния ГМДП на экспериментально трансформированный фенотип НГ условно здоровых лиц, экспрессирующих молекулы CD62L, CD63, CD66d в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Исследованы 40 образцов НГ периферической крови 10 условно здоровых лиц обоего пола в возрасте от 26 до 66 лет. Оценка экспрессии рецепторов на мембране НГ проводилась методом проточной цитометрии с использованием проточного цитофлуориметра FC 500 (Beckman Coulter, США) и конъюгатов моноклональных антител CD62L-ECD, CD63-FITC, CD66d-PE (Beckman Coulter International S.A., Франция). Оценивали относительное количество НГ (% НГ), экспрессирующих мембранные CD62L, CD63, CD66d рецепторы и интенсивность их экспрессии по MFI (middle fluorescence intensity). Для создания моделей *in vitro* были использованы N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP) и глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП).

На первом этапе проведена оценка количества интактных НГ, экспрессирующих CD62L, CD63, CD66d молекулы с параллельной детекцией интенсивности их экспрессии по MFI (контрольная группа). На втором этапе для создания в системе *in vitro* экспериментальной модели трансформированного фенотипа НГ, экспрессирующих CD62L, CD63, CD66d молекулы (экспериментальная модель 1), использовали N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), который является пептидом бактериального происхождения, активирующим фагоцитоз, дегрануляцию и метаболизм кислородзависимых микробицидных систем НГ. Образцы цельной крови условно здоровых лиц инкубировали с fMLP в конечной концентрации 7×10^{-7} М в течение 1 часа при температуре 37 °С. Далее оценивали особенности трансформированного фенотипа НГ. На третьем этапе оценивали влияние в системе *in vitro* глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) на неизмененный фенотип НГ, экспрессирующих мембранные молекулы CD62L, CD63, CD66d условно здоровых лиц (экспериментальная модель 2). Образцы цельной крови условно здоровых лиц инкубировали с ГМДП в конечной концентрации 10^{-6} г/л в течение 1 часа при температуре 37 °С. На четвертом этапе оценивали совместное одномоментное влияние fMLP в конечной концентрации 7×10^{-7} М

и ГМДП в конечной концентрации 10^{-6} г/л на фенотип НГ условно здоровых лиц, экспрессирующих мембранные CD62L, CD63, CD66d (экспериментальная модель 3). Инкубацию проводили в течение 1 часа при температуре 37 °С. Оценка относительного количества НГ, экспрессирующих CD62L, CD63, CD66d молекулы на фоне детекции по MFI уровня экспрессии исследуемых рецепторов, была проведена во всех экспериментальных моделях *in vitro*.

Полученные результаты исследования были обработаны при помощи методов вариационной статистики и представлены в виде среднего значения с показателем стандартной ошибки и минимального, максимального значения ($M \pm m$ [min; max]). При анализе количественных признаков оценка достоверности различий между группами проводилась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия, связи и зависимости считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Ввод данных – в таблицах Microsoft Excel 2007. Обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 20.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал, что у условно здоровых лиц относительное количество интактных НГ, несущих CD62L, CD63

и CD66d рецепторы, составило: CD62L⁺НГ – $94,19 \pm 0,63$ [92,20; 96,50] с плотностью оснащения по MFI $5,08 \pm 0,24$ [4,29; 6,20]; CD63⁺НГ – $99,83 \pm 0,09$ [99,10; 100,00] с MFI $3,14 \pm 0,06$ [2,81; 3,41]; CD66d⁺НГ – $78,07 \pm 1,54$ [72,30; 81,40] с уровнем экспрессии по MFI $2,29 \pm 0,06$ [2,09; 2,58] (табл. 1).

Культивирование образцов периферической крови с fMLP (экспериментальная модель 1) способствовало значительному снижению относительного количества CD62L⁺НГ в 1,7 раза (на $58,7\%$ – с $94,19 \pm 0,63$ до $55,29 \pm 3,40$) [42,10; 70,60] ($p < 0,01$), коэффициент регрессии составил $0,6 \pm 0,11$. При этом наблюдалось уменьшение плотности данного рецептора на мембране НГ в 2,24 раза (на $44,7\%$) в сравнении с контрольными показателями ($p < 0,01$) (в частности, MFI CD62L составил $2,27 \pm 0,11$ [1,86; 2,70]), коэффициент регрессии был равен $0,4 \pm 0,06$. Кроме того, под влиянием fMLP умеренно, но достоверно увеличилась плотность экспрессии молекул CD63⁺НГ с $3,14 \pm 0,07$ [2,81; 3,41] до $3,52 \pm 0,08$ [3,23; 3,90] ($p < 0,05$), при этом относительное количество CD63⁺НГ не отличалось от контрольных значений. Следует отметить, что инкубация образцов периферической крови с fMLP не привела к достоверному изменению уровня CD66d⁺НГ ($82,54 \pm 1,1$ [78,50; 86,60])

ТАБЛИЦА 1. ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ CD62L, CD63, CD66d НА ПОВЕРХНОСТНОЙ МЕМБРАНЕ ИНТАКТНЫХ НГ И НГ, ПОДВЕРГНУТЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

TABLE 1. PECULIARITIES OF THE EXPRESSION OF CD62L, CD63, CD66d MOLECULES ON THE SURFACE MEMBRANE OF INTACT NG AND NG, SUBJECTED TO EXPERIMENTAL INFLUENCE

Фенотип Phenotype Группы Groups	CD62L		CD63		CD66d	
	% НГ % NG	MFI	% НГ % NG	MFI	% НГ % NG	MFI
Контроль (интактные НГ) Control (intact NG)	$94,19 \pm 0,63$ [92,20; 96,50]	$5,08 \pm 0,24$ [4,29; 6,20]	$99,83 \pm 0,09$ [99,10; 100,00]	$3,14 \pm 0,066$ [2,81; 3,41]	$78,07 \pm 1,54$ [72,30; 81,40]	$2,29 \pm 0,06$ [2,09; 2,58]
Экспериментальная модель 1 – fMLP Experimental model 1 – fMLP	$55,29 \pm 3,40$ [42,10; 70,60] p_1^{**}	$2,27 \pm 0,11$ [1,86; 2,70] p_1^{**}	$99,92 \pm 0,05$ [99,50; 100,00]	$3,52 \pm 0,077$ [3,23; 3,90] p_1^*	$82,54 \pm 1,18$ [78,50; 86,60]	$2,40 \pm 0,05$ [2,22; 2,54]
Экспериментальная модель 2 – ГМДП Experimental model 2 – GMDP	$92,68 \pm 0,63$ [90,80; 94,80]	$4,76 \pm 0,31$ [4,01; 5,88]	$99,78 \pm 0,07$ [99,30; 100,00]	$3,21 \pm 0,075$ [3,00; 3,46]	$88,27 \pm 1,48$ [83,90; 92,40] p_1^{**}	$2,38 \pm 0,09$ [2,05; 2,69]
Экспериментальная модель 3 – fMLP + ГМДП Experimental model 3 – fMLP + GMDP	$77,33 \pm 1,98$ [72,30; 84,30] $p_1^{**}, p_2^{**}, p_3^{**}$	$2,79 \pm 0,15$ [2,34; 3,15] $p_1^{**}, p_2^*, p_3^{**}$	$99,92 \pm 0,05$ [99,50; 100,00]	$3,44 \pm 0,068$ [3,23; 3,59] p_1^{**}	$85,69 \pm 1,30$ [80,40; 90,00] p_1^{**}	$2,38 \pm 0,06$ [2,22; 2,64]

Примечание. p_1 – достоверность различий между контролем и экспериментальными моделями; p_2 – достоверность различий между экспериментальной моделью 1 и моделью 3; p_3 – достоверность различий между экспериментальной моделью 2 и моделью 3; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Note. p_1 , reliability of differences between the control and the experimental models; p_2 , reliability of differences between the experimental model 1 and model 3; p_3 , reliability of differences between the experimental model 2 and model 3; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

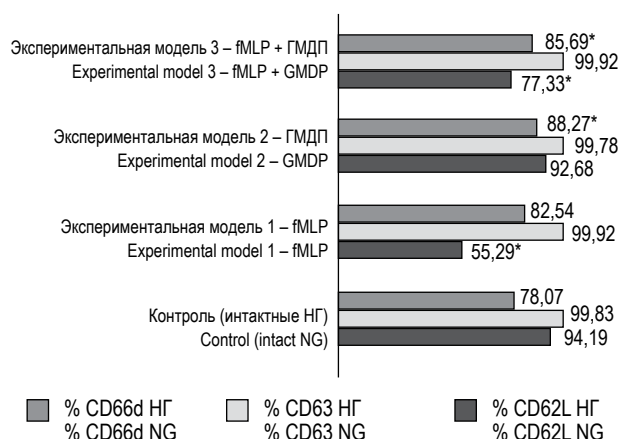


Рисунок 1. Фенотипический профиль нейтрофильных гранулоцитов в экспериментах *in vitro*

Примечание. * – $p < 0,05$ (достоверность различий между контролем и экспериментальными моделями).

Figure 1. Phenotypic profile of neutrophilic granulocytes in experiments *in vitro*

Note. *, $p < 0.05$ (reliability of differences between the control and the experimental models).

и MFI CD66d ($2,4 \pm 0,05$ [2,22; 2,54]) в сравнении с контрольными показателями (рис. 1, 2).

Выявленная динамика перераспределения изучаемых поверхностных мембранных молекул CD62L, CD63, CD66d НГ под воздействием fMLP, полученная в созданной в системе *in vitro* экспериментальной модели 1 по трансформации фенотипа CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺НГ, сходна с ранее выявленными нами изменениями экспрессии молекул CD62L и CD63 у новорожденных с врожденной пневмонией и пневмонией тяжелого течения, осложненной сепсисом, в виде снижения относительного количества CD62L⁺CD63⁺НГ и уровня плотности экспрессии CD62L⁺НГ на фоне увеличения уровня экспрессии CD63⁺НГ [10].

В созданной на третьем этапе исследования экспериментальной модели 2 проводилась оценка влияния регуляторного ГМДП на НГ условно здоровых лиц. После инкубации образцов крови с ГМДП наблюдалось умеренное повышение относительного количества НГ (по сравнению с контролем), экспрессирующих CD66d⁺НГ: с $78,07 \pm 1,54$ до $88,27 \pm 1,48$ [83,90; 92,40] ($p < 0,01$), при этом плотность экспрессии этой молекулы была неизменна (табл. 1). Полученные данные продемонстрировали отсутствие позитивных и негативных влияний ГМДП на относительный уровень CD62L⁺НГ, CD63⁺НГ и плотность их экспрессии по сравнению с контролем (рис. 2).

Оценка одномоментного комбинированного воздействия fMLP и ГМДП на четвертом этапе

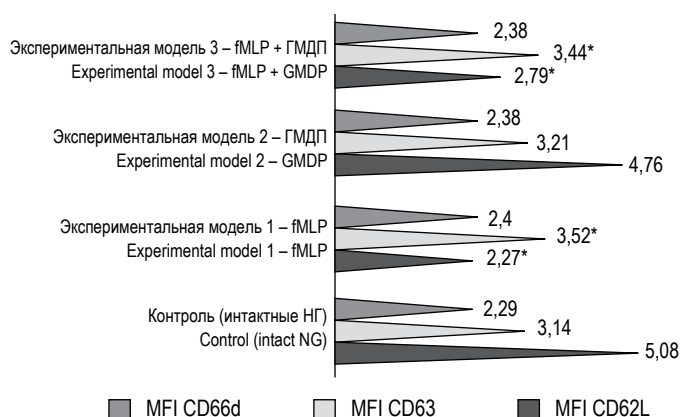


Рисунок 2. Изменение уровня интенсивности оснащения рецепторами CD62L, CD63, CD66d нейтрофильных гранулоцитов в экспериментах *in vitro*

Примечание. * – $p < 0,05$ (достоверность различий между контролем и экспериментальными моделями).

Figure 2. Changing of intensity level equipment receptors CD62L, CD63, CD66d of neutrophilic granulocytes in experiments *in vitro*

Note. *, $p < 0.05$ (reliability of differences between the control and the experimental models).

исследования (экспериментальная модель 3) позволила установить нивелирование выявленных ранее негативных эффектов fMLP на CD62L⁺НГ. Так, под влиянием ГМДП значительно увеличилось количество CD62L⁺НГ с 55,29% (моновлияние fMLP) до $77,33 \pm 1,98$ [72,30; 84,30] ($p < 0,01$) (рис. 1). Кроме того, умеренно возросла плотность экспрессии молекул CD62L с $2,27 \pm 0,11$ [1,86; 2,70] до $2,79 \pm 0,15$ [2,34; 3,15] ($p < 0,05$). Однако при этом ГМДП не корректировал негативное влияние fMLP на относительное количество CD63⁺НГ и CD66d⁺НГ и плотность CD63 и CD66d рецепторов на поверхностной мембране НГ (табл. 1, рис. 2). Следует отметить, что одновременная инкубация НГ с fMLP и ГМДП привела к достоверному приросту относительного количества CD66d⁺НГ ($85,69 \pm 1,30$ против $78,07 \pm 1,54$ в контроле, $p < 0,01$) и достоверному увеличению плотности CD63⁺НГ в сравнении с контролем ($3,44 \pm 0,07$ против $3,14 \pm 0,07$ в контроле, соответственно, $p < 0,01$). Таким образом, выявлен иммуномодулирующий эффект ГМДП – нивелирование негативных трансформационных изменений фенотипических характеристик НГ, которые были вызваны влиянием бактериального пептида fMLP, наиболее выраженные в отношении значимого восстановления количества НГ, экспрессирующих CD62L, и полного восстановления плотности экспрессируемых на мембране НГ CD62L, что, с нашей точки зрения, важно для полноценного перемещения НГ к очагу воспаления.

Выводы

1. Под влиянием бактериального пептида fMLP в созданной в системе *in vitro* экспериментальной модели получена трансформация фенотипа НГ условно здоровых субъектов, одномоментно экспрессирующих CD62, CD63, CD66d молекулы: значительно уменьшилось как количество НГ, экспрессирующих CD62L, так и плотность экспрессии CD62L с параллельным повышением плотности экспрессии CD63.

2. Воздействие ГМДП на нетрансформированный фенотип НГ условно здоровых субъектов не изменяло количество CD62L⁺НГ и CD63⁺НГ, не менялась и плотность экспрессии CD62L и CD63 на поверхностной мембране НГ, однако при этом достоверно увеличилось количество CD66d⁺НГ, при неизменившейся плотности экспрессии молекул CD66d.

3. ГМДП, введенный одномоментно с бактериальным пептидом fMLP, нивелировал некото-

рые трансформационные изменения фенотипа НГ, возникающие под влиянием fMLP: на 22,04% восстановилось количество CD62L⁺НГ и достоверно возросла плотность экспрессии CD62L; при этом ГМДП не корректировал негативное влияние fMLP на количество CD63⁺НГ и CD66d⁺НГ и плотность экспрессии молекул CD63 и CD66d.

4. Одномоментное введение fMLP и ГМДП достоверно увеличило количество CD66d⁺НГ и плотность экспрессии молекул CD63 на мембране CD63⁺НГ по сравнению с интактными НГ условно здоровых субъектов.

5. Полученные данные представляют определенный интерес для разработки новых иммунотерапевтических стратегий, направленных на коррекцию негативно трансформированного фенотипа НГ при нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваниях бактериальной этиологии.

Список литературы / References

1. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С. В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм // Инфекция и иммунитет, 2017. Т. 7, № 3. С. 219-230. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 219-230. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.
2. Нестерова И.В., Евглевский А.А., Чудилова Г. А., Фомичева Е.В., Ковалева С. В., Ломтатидзе Л.В. Реструктуризация хроматина нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии / Под ред. И.В. Нестеровой и А.А. Евглевского. М.: Capricorn Publishing, Inc., 2017. 356 с. [Nesterova I.V., Evglevsky A.A., Chudilova G.A., Fomicheva E.V., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V. Chromatin restructuring of neutrophilic granulocytes in normal and pathology. Ed. by I.V. Nesterova and A.A. Evglevsky. Moscow: Capricorn Publishing, Inc., 2017. 356 p.]
3. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В., Черданцев Д.В., Первова О.В. Взаимосвязь фенотипа и метаболизма нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода // Инфекция и иммунитет, 2017. Т. 7, № 3. С. 259-270. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V., Cherdantsev D.V., Pervova O.V. Interrelation of the phenotype and metabolism of blood neutrophils in patients with advanced purulent peritonitis in the dynamics of the postoperative period. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 259-270. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-259-270.
4. Boer K., Vogelsang H., Deufel T., Pfister W., Kiehntopf M. CD62L on neutrophil granulocytes, a useful, complementary marker for the prediction of ventriculitis in blood-containing CSF. *Clin. Biochem.*, 2010, Vol. 43, no. 16-17, pp. 1351-1355.
5. Boyle J.P., Parkhouse R., Monie T.P. Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway. *Open Biol.*, 2014, Vol. 4, no. 12, pp. 140-178.
6. Cortjens B., Ingelse S.A., Calis J.C., Valar A.P., Koendetman L., Bem R.A., van Woensel J.B. Neutrophil subset responses in infants with severe viral respiratory infection. *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 176, pp. 100-106.
7. de Jong E., de Lange D.W., Beishuizen A., van de Ven P.M., Girbes A.R., Huisman A. Neutrophil CD64 expression as a longitudinal biomarker for severe disease and acute infection in critically ill patients. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2016, Vol. 38, no. 5, pp. 576-584.
8. Laman A.G., Lathe R., Shepelyakovskaya A.O., Gartseva A., Brovko F.A., Guryanova S., Alekseeva L., Meshcheryakova E.A., Ivanov V.T. Muramyl peptides activate innate immunity conjointly via YB1 and NOD2. *Innate Immunity*, 2016, Vol. 22, no. 8, pp. 1-8.
9. Naegelen I., Beaume N., Plançon S., Schenten V., Tschirhart E.J., Bréhard S. Regulation of neutrophil degranulation and cytokine secretion: a novel model approach based on linear fitting. *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, 817038. doi:10.1155/2015/817038.

10. Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Kleschenko E., Kovaleva S. Smerchinskaya T., Sapun O. Three neutrophilic granulocyte's subpopulations CD62L^{dim}CD63^{dim}, CD62L^{bright}CD63^{dim} and CD62L^{dim}CD63^{mid} in newborns with congenital pneumonia. In: Allergy, John Wiley & Sons A/S, Barcelona, 2015, 70, Suppl. S101, p. 217.
11. Qian W., Huang G.Z. Neutrophil CD64 as a marker of bacterial infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Immunol. Invest.*, 2016, Vol. 45, no. 6, pp. 490-503.
12. Skubitz K.M., Campbell K.D., Skubitz A.P. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 1996, Vol. 60, no. 1, pp. 106-117.
13. Skubitz K.M., Campbell K.D., Skubitz A.P. Synthetic peptides of CD66a stimulate neutrophil adhesion to endothelial cells. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, no. 8, pp. 4257-4264.

Авторы:

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФПК МР Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ, Москва; главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Малиновская В.В. — д.б.н., профессор, руководитель лаборатории онтогенеза и коррекции системы интерферона ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Российской академии медицинских наук», Москва, Россия

Хайдуков С.В. — д.б.н., старший научный сотрудник отдела химической биологии гликанов и липидов ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Москва, Россия

Нгуен Тхи Зеу Лен — аспирант кафедры аллергологии и иммунологии ФПК МР Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ, Москва, Россия

Чудилова Г.А. — к.б.н., доцент, заведующая отделом клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Ломтадзе Л.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Allergology and Immunology at the Medical Institute, People's Friendship University of Russia, Moscow; Chief Research Associate, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Malinovskaya V.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Ontogenesis and Correction of Interferon System, N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Khaydukov S.V., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Department of Chemical Biology of Glycans and Lipids, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Nguyen Thi Dieu Lien, Postgraduate Student, Department of Allergology and Immunology, People's Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Chudilova G.A., PhD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Lomtadze L.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 03.03.2018
Принята к печати 13.03.2018

Received 06.03.2018
Accepted 13.03.2018

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ СОПОСТАВЛЕНИЕ ПРИ Th-ЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМАХ ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Калинина Е.П.¹, Виткина Т.И.², Кнышова В.В.², Федосеева Е.А.²,
Новгородцева Т.П.², Гвозденко Т.А.²

¹ Медицинский центр ООО «Мой доктор», г. Владивосток, Россия

² Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения —
Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»,
г. Владивосток, Россия

Резюме. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является глобальной проблемой здравоохранения. Актуальным является изучение иммунологических особенностей и их сопряженности с клиническим течением ХОБЛ. Цель исследования — установить клинико-иммунологические особенности ХОБЛ разной степени тяжести при Th1- и Th17-зависимых типах иммунного ответа.

Обследовано 132 пациента с ХОБЛ и 32 практически здоровых лица. По клинико-функциональным вариантам пациенты с ХОБЛ разделены по группам: 36 человек (28%) с легкой степенью тяжести, 62 человека (48%) со средней степенью тяжести и 30 человек (23%) с тяжелой степенью тяжести. Проводилось клинико-функциональное и лабораторное исследование. Субпопуляции Th1- и Th17-лимфоцитов оценивали по уровню цитокинов в сыворотке крови (туморнекротизирующий фактор (TNF α), интерлейкинов (IL) IL-4, IL-10, IL-17A, IL-21, IFN γ), трансформирующего фактора роста β 1 (TGF- β 1)), определяли экспрессию рецептора IL-6R (CD126⁺) на зрелых Т-лимфоцитах (CD3⁺) и Т-хелперах (CD4⁺) периферической крови. Результаты исследования показали, что у больных ХОБЛ легкой степени тяжести определялись три разных фенотипа с превалированием Th1-зависимого иммунного ответа. Уровень экспрессии IL-6R представлен в большей степени на CD3⁺CD126⁺ клетках при Th1/Th17-фенотипе и CD4⁺CD126⁺ клетках при Th17-зависимом типе иммунного ответа. У больных ХОБЛ средней степени тяжести соотношение между Th1-, Th17- и Th1/Th17-типами иммунного ответа определялось в равных долях. Уровень экспрессии IL-6R на зрелых Т-лимфоцитах и Т-хелперах возрастает в наибольшей степени при Th17-зависимом иммунном ответе. У больных ХОБЛ тяжелой степени преобладал иммунный ответ по Th17- и Th1/Th17-типам. Уровень экспрессии IL-6R увеличивается при Th17- и Th1/Th17-зависимых типах иммунного ответа, при этом наиболее значимое возрастание отмечается для CD4⁺ клеток при Th17-фенотипе. Установлено, что с фенотипами иммунного ответа у пациентов с ХОБЛ сопряжены особенности клинического течения заболевания. Полученные данные позволяют определить фенотип воспаления, спрогнозировать течение хронического заболевания и подобрать адекватную терапию.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, Th-зависимый тип иммунного ответа, IL-6 сигналинг

Адрес для переписки:

Кнышова Вера Васильевна
Научно-исследовательский институт медицинской
климатологии и восстановительного лечения
690105, Россия, г. Владивосток, ул. Русская, 73г.
Тел./факс: 8 (423) 278-82-01.
E-mail: v.knyshova@mail.ru

Address for correspondence:

Knyshova Vera V.
Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation
Treatment
690105, Russian Federation, Vladivostok, Russkaya str., 73g.
Phone/Fax: 7 (423) 278-82-01.
E-mail: v.knyshova@mail.ru

Образец цитирования:

Е.П. Калинина, Т.И. Виткина, В.В. Кнышова,
Е.А. Федосеева, Т.П. Новгородцева, Т.А. Гвозденко
«Клинико-иммунологическое сопоставление при
Th-зависимых механизмах иммунного ответа
у больных хронической обструктивной болезнью легких»
// медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6.
С. 855–864. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-855-864
© Калинина Е.П. и соавт., 2018

For citation:

E.P. Kalinina, T.I. Vitkina, V.V. Knyshova, E.A. Fedoseeva,
T.P. Novgorodtseva, T.A. Gvozdenko "Clinical and
immunological comparisons in Th-dependent immune response
mechanisms among patients with chronic obstructive pulmonary
disease", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 855–864.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-855-864
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-855-864

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL COMPARISONS IN Th-DEPENDENT IMMUNE RESPONSE MECHANISMS AMONG PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Kalinina E.P.^a, Vitkina T.I.^b, Knysheva V.V.^b, Fedoseeva E.A.^b,
Novgorodtseva T.P.^b, Gvozdenko T.A.^b

^a Medical Center "My Doctor", Vladivostok, Russian Federation

^b Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a global public health problem. Studies in immunological features and their correlations with clinical course of COPD are of importance. The aim of this study was to elucidate clinical and immunological features in COPD of different severity grade, concerning Th1- and Th17-dependent types of immune response.

The study included 132 COPD patients and 32 healthy individuals. According to clinical and functional patterns, the patients with COPD were divided into 3 groups, i.e., 36 cases (28%) of mild severity; 62 individuals (48%), of moderate severity, and 30 patients (23%) of severe clinical grade. We have performed both clinical and immunological evaluation of the patients. The Th1- and Th17-specific lymphocyte subpopulations were assessed according to the serum levels of cytokines, i.e. tumor necrosis factor (TNF α), IL-4, IL-10, IL-17A, IL-21, IFN γ , as well as transforming growth factor β 1 (TGF- β 1). We have also determined expression of IL-6R receptor (CD126⁺) on mature T lymphocytes (CD3⁺) and T helper cells (CD4⁺) from peripheral blood. We have obtained the following results: the patients with mild-grade COPD exhibited three different T cell phenotypes were determined, with a prevalence of Th1-dependent immune response. The IL-6R were mostly expressed on CD3⁺CD126⁺ cells for the Th1/Th17 phenotype, and CD4⁺CD126⁺ cells in cases of Th17-dependent type immune response. In patients with COPD of moderate severity, the Th1, Th17, or Th1/Th17 types of immune response was revealed at similar rates. The level of IL-6R expression on mature T lymphocytes and T-helper cells increased to the greatest extent in cases of Th17-dependent immune response. In severe COPD patients, we have found a dominance of Th17 and Th1/Th17 type immune response. The levels of IL-6R expression were increased in Th17- and Th1/Th17-dependent types of immune response, the most significant increase was observed for CD4⁺ cells in Th17 phenotype. Clinical features of COPD proved to be associated with the phenotypes of immune response. These results allow of specifying the inflammatory phenotype, predicting the course of chronic disease, and selecting appropriate therapy.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, Th-dependent type immune response, IL-6 signaling

Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – одна из ведущих причин заболеваемости и смертности во всем мире. По данным некоторых исследований, распространенность ХОБЛ среди взрослого населения составляет 5-9%. Это единственная болезнь, смертность от которой продолжает увеличиваться. Летальность от ХОБЛ занимает 4-е место среди всех причин смерти в общей популяции, что составляет около 4% в структуре общей летальности [10].

ХОБЛ характеризуется повышением уровня маркеров воспаления в периферической крови (С-реактивный белок, фибриноген, лейкоциты, провоспалительные цитокины IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α). Наличие системного воспаления у больных ХОБЛ стабильного течения показано в мета-

анализе W.Q. Gan, в котором было рассмотрено 14 исследований по изучению маркеров системного воспаления при ХОБЛ [9]. Предполагается, что взаимосвязь между местным бронхолегочным и системным воспалением осуществляют индуцированные из бронхолегочной системы в системную циркуляцию цитокины [1, 5, 9, 12]. Другим важным признаком системного воспалительного процесса являются клеточные факторы крови, среди которых особая роль отводится популяции Т-хелперов (Th). В настоящее время рассматривают четыре типа адаптивного иммунного ответа, которые регулируются разными популяциями Т-хелперов (Th), а именно Th1, Th2, Th17, и Т-регуляторными клетками (Treg) [4, 6, 7, 15]. Различные субпопуляции Th-клеток способны управлять развитием иммунного от-

вета, активируя соответствующие эффекторные клетки. В свою очередь, дифференцировка той или иной субпопуляции Th зависит от цитокинового микроокружения.

Многие исследователи предпринимали попытку охарактеризовать тип иммунного ответа у пациентов с ХОБЛ, но полученные результаты довольно противоречивы. В некоторых работах показано, что у пациентов с ХОБЛ преобладает Th1-модель иммунного ответа, в то время как другие отмечают Th2-фенотип [6]. В ряде исследований было обнаружено увеличение числа Th17 в периферической крови больных ХОБЛ, что говорит об усилении Th17-типа иммунного ответа [3, 7, 13]. Основным биологическим эффектом IL-17 является усиление образования нейтрофилов и поддержание их гомеостаза. При ХОБЛ поддержание персистирующего воспаления в дыхательных путях сопровождается преимущественно накоплением нейтрофилов и Т-лимфоцитов [6].

В последние годы значительный интерес вызывает роль IL-6 в прогрессировании ХОБЛ. Согласно проведенным исследованиям, повышенный системный уровень IL-6 является отличительной чертой ХОБЛ и коррелирует со степенью воспаления нижних дыхательных путей и снижением легочной функции [2, 14]. В связи с этим изучение молекулярных механизмов действия IL-6 при ХОБЛ вызывает большой интерес. Однако исследований, посвященных изучению сигналинга IL-6 у больных ХОБЛ при различных типах Т-клеточного иммунного ответа, не проводилось.

Цель исследования — установить клинико-иммунологические особенности ХОБЛ разной степени тяжести при Th1- и Th17-зависимых типах иммунного ответа.

Материалы и методы

В исследовании на условиях добровольного информированного согласия участвовали 160 пациентов (96 мужчин и 64 женщины), средний возраст составил $57,5 \pm 4,8$ года. Критерием разделения пациентов по группам была степень тяжести клинического течения ХОБЛ (GOLD, 2014) [10]. По клинико-функциональным вариантам пациенты разделялись по группам: 36 человек (28%) с легкой степенью, 62 человека (48%) со средней степенью и 30 человек (24%) с тяжелой степенью течения ХОБЛ. На момент обследования пациенты не получали регулярной противовоспалительной терапии. Критериями исключения из исследования явилось наличие у пациентов острых инфекционных заболеваний, хронических заболеваний внутренних органов в фазе обострения, хронической сердечной недостаточности в ста-

дии декомпенсации. В контрольную группу вошли 32 практически здоровых лица (6 мужчин и 26 женщин), некурящих, с нормальной функцией внешнего дыхания, средний возраст — $42,0 \pm 3,4$ года.

Заболевания бронхолегочной системы диагностировали на основании данных анамнеза, объективного осмотра, пикфлоуметрии, спирометрии с выполнением бронхолитического теста (спирограф "FUK.UDA", Япония), результатов тестов «шкала одышки» mMRC (Modified British Medical Research Council) и «оценка качества жизни» CAT (COPD Assessment Test), рентгенологического и лабораторного исследования. В соответствии с рекомендациями «Глобальной стратегии: диагностика, лечение и профилактика ХОБЛ» диагноз ХОБЛ выставляли при ОФВ₁/ФЖЕЛ < 0,70 [10]. По результатам спирометрии у пациентов с легкой степенью тяжести ХОБЛ постбронходилатационный показатель ОФВ₁ составил $90,13 \pm 1,99\%$, по данным опроса определялась одышка в 1 балл по шкале mMRC и качество жизни в 4-6 баллов по тесту CAT. У пациентов со среднетяжелой степенью ХОБЛ показатель ОФВ₁ составил $73,9 \pm 2,56\%$, определялась одышка в 2 балла по шкале mMRC и качество жизни в 7-9 баллов по тесту CAT. У пациентов с тяжелой степенью ХОБЛ показатель ОФВ₁ составил $48,6 \pm 1,76\%$, по шкале одышки mMRC определялись 2 балла и более, по тесту CAT — 10 баллов и более.

Субпопуляции Th1- и Th17-лимфоцитов оценивали по уровню цитокинов в сыворотке крови: туморнекротизирующий фактор альфа (TNF α), интерлейкины (IL) IL-4, IL-10, IL-17A, интерферон-гамма (IFN γ) методом проточной цитометрии (тест-системы фирмы BD, США). Обработку данных проводили с использованием программы FCAP Array 3.0 (BD, США). Уровень содержания трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) и IL-21 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом (Genzyme diagnostics, США). Определяли экспрессию рецептора IL-6R (CD126⁺) на зрелых Т-лимфоцитах (CD3⁺) и Т-хелперах (CD4⁺) периферической крови методом проточной цитометрии с использованием реагентов фирмы BD (США).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В рамках поставленной цели для выявления патогенетической значимости цитокинов Th1-

и Th17-типов иммунного ответа в формировании воспаления обследовали больных ХОБЛ разной степени тяжести.

В группе больных ХОБЛ легкой степени тяжести у 67% пациентов (24 чел.) выявлено увеличение концентрации $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$ и снижение уровня IL-4 по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Дефицит IL-4 на фоне высокой концентрации провоспалительных цитокинов ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$) указывает на дифференцировку наивных Т-лимфоцитов по Th1-зависимому пути. У 28% пациентов (10 чел.) наблюдалось повышение уровня провоспалительных (IL-17 и IL-21) и противовоспалительных (IL-10, $\text{TGF-}\beta 1$) цитокинов, падение уровня IL-4 по сравнению с группой контроля. Это свидетельствует о формировании специфического цитокинового паттерна, приводящего к дифференцировке Т-хелперов 17 типа. У 5% пациентов (2 чел.) наблюдалось повышение IL-17, IL-21, $\text{IFN}\gamma$ и $\text{TNF}\alpha$, что свидетельствует о равнозначной по силе активации Т-хелперов 1-го и 17-го типов. Повышение уровней IL-21, IL-6 и $\text{TGF-}\beta 1$, являющихся важнейшими факторами дифференцировки Th17-клеток, ведет к росту числа этих клеток при утяжелении течения ХОБЛ [15]. В свою очередь, Th17-клетки, посредством продукции IL-17A, активируют синтез клетками врожденного иммунитета $\text{TNF}\alpha$, IL-6 и других провоспалительных факторов [11]. В то же время продуцируемый Th17-клетками провоспалительный цитокин IL-17 способствует активации легочных фибробластов, эпителиальных клеток и клеток гладкой мускулатуры бронхов. После активации эти клетки экспрессируют цитокины IL-6, IL-8 и гранулоцитарно-колониестимулирующий фактор (G-CSF), вызывающие инфильтрацию дыхательных путей нейтрофилами и усиление их пролиферации. Нейтрофилы, в свою очередь, выделяют протеолитические ферменты, разрушающие паренхиму легких, тем самым снижая их функцию [3, 7]. Таким образом, Th17 обеспечивают пролонгацию врожденного иммунного ответа, что обуславливает хронизацию воспаления. В ходе настоящего исследования выявлены изменения в количественном содержании Т-клеток, несущих на своей поверхности IL-6R (CD126^+) в зависимости от степени тяжести ХОБЛ (табл. 2). У пациентов с легким течением ХОБЛ наблюдалась тенденция к повышению процентного содержания CD4^+ клеток, несущих на своей мембране IL-6R, в сравнении с группой контроля. У пациентов с Th1-зависимым иммунным ответом увеличилось количество $\text{CD4}^+\text{CD126}^+$ клеток на 37% ($p < 0,05$) относительно контрольной группы. У пациентов с Th17-зависимым иммунным ответом возросло количество $\text{CD3}^+\text{CD126}^+$ клеток

на 65% ($p < 0,05$), а с Th1/Th17-типом иммунного ответа — на 84% ($p < 0,05$) относительно контрольной группы. У больных ХОБЛ легкой степени тяжести определялось три Т-клеточных фенотипа иммунного ответа с превалированием Th1-зависимого варианта. Уровень экспрессии IL-6R при легком течении ХОБЛ наиболее выражен при Th1-зависимом типе иммунного ответа на $\text{CD4}^+\text{CD126}^+$ клетках, при Th17- и Th1/Th17-фенотипах — на $\text{CD3}^+\text{CD126}^+$ клетках.

В группе больных ХОБЛ средней степени тяжести в 39% случаев (24 чел.) выявлен Th1-путь иммунного ответа. Этот путь характеризуется снижением уровня цитокинов IL-4, IL-21 и повышением продукции $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$ по сравнению с контрольной группой (табл. 1). У 34% больного (21 чел.) установлен Th17-путь иммунного ответа, который поддерживается высокими значениями провоспалительных цитокинов IL-17A, IL-21 и противовоспалительных — IL-10, $\text{TGF-}\beta 1$. У 27% пациентов (17 чел.) выявлен Th1/Th17-тип иммунного ответа с одновременной экспрессией IL-17A, IL-21, $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$ цитокинов. Среди пациентов ХОБЛ со среднетяжелым течением выявлено статистически значимое увеличение количества клеток с маркером CD126^+ относительно контрольной группы (табл. 2). У пациентов с Th1-зависимым иммунным ответом на 27% возросло количество $\text{CD3}^+\text{CD126}^+$ клеток относительно контрольной группы. У пациентов с Th17-зависимым иммунным ответом было отмечено увеличение в 2 раза ($p < 0,01$) количества $\text{CD4}^+\text{CD126}^+$ и на 53% ($p < 0,05$) $\text{CD3}^+\text{CD126}^+$ клеток относительно контрольной группы. У пациентов с Th1/Th17-типом иммунного ответа возросло количество как $\text{CD4}^+\text{CD126}^+$, так и $\text{CD3}^+\text{CD126}^+$ клеток на 35% ($p < 0,05$) и 31% соответственно, по сравнению с контрольной группой. У больных ХОБЛ среднетяжелой степени Th1-, Th17- и Th1/Th17-типы иммунного ответа встречались в равных долях. Уровень экспрессии IL-6R при среднетяжелом течении ХОБЛ на зрелых Т-лимфоцитах и Т-хелперах в наибольшей степени возрастает при Th17-типе иммунного ответа.

Среди пациентов с тяжелой степенью ХОБЛ Th1-тип иммунного ответа, характеризуемый высоким уровнем $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$ на фоне низких значений IL-21, выявлен у 6% (2 чел.) (табл. 1). У 43% больных (13 чел.) диагностированы максимальные значения провоспалительных цитокинов IL-17, IL-21 и противовоспалительных — IL-10, $\text{TGF-}\beta 1$, что указывает на продуцирующую активацию Th17-лимфоцитов, играющих роль дирижера воспалительной реакции. У 50% пациентов (15 чел.) данной группы преобладала экспрессия IL-17, IL-21, $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$, харак-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С ХОБЛ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)
TABLE 1. INDICATORS OF CYTOKINE STATUS IN PATIENTS WITH COPD, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели, пг/мл Parameter studied (pg/ml)	Контрольная группа Control group n = 32	ХОБЛ легкая степень тяжести COPD mild severity n = 36			ХОБЛ средняя степень тяжести COPD moderate severity n = 62			ХОБЛ тяжелая степень тяжести COPD severe severity n = 30		
		Th1-путь Th1 path n = 24	Th17-путь Th17 path n = 10	Th1/Th17- путь Th1/Th17 path n = 2	Th1-путь Th1 path n = 24	Th17-путь Th17 path n = 21	Th1/Th17- путь Th1/Th17 path n = 17	Th1-путь Th1 path n = 2	Th17-путь Th17 path n = 13	Th1/Th17- путь Th1/Th17 path n = 15
IL-4	77,9 (66,2-81,0)	45,4* (43,0-52,3)	59,3* (48,3-65,8)	63,4 (51,9-67,1)	56,2* (45,4-61,3)	62,4 (58,0-71,2)	39,8* (32,5-44,1)	64,3 (54,8-73,8)	81,2# (77,0-99,4)	92,7° (87,6-98,5)
IL-10	32,4 (31,1-33,7)	36,5 (29,0-41,0)	43,6* (36,3-46,1)	48,1* (39,5-55,7)	59,6* (52,4-62,4)	58,9* (40,3-66,7)	47,2* (41,2-55,1)	39,7 (33,0-43,0)	69,8*# (61,0-92,1)	78,7*° (73,5-86,3)
IL-17A	378,4 (360,0-395,1)	402,0 (352,0-412,0)	605,3*# (601,9-620,5)	583,2*° (563,6-623,4)	419,7 (337,3-502,1)	541,1*# (508,1-725,0)	578,2*° (551,6-602,4)	364,4 (303,1-425,7)	640,1*# (526,1-705,3)	591,4*° (573,1-612,1)
IL-21	75,5 (74,0-82,0)	81,6 (72,3-92,4)	200,0*# (152,0-252,0)	157,2*° (148,3-192,6)	68,0 (52,0-80,0)	208,5*# (168,0-249,0)	186,4*° (171,9-198,2)	51,5* (48,0-55,0)	254,0*# (250,0-276,0)	212,9*° (201,7-223,6)
TNF α	46,3 (43,2-48,9)	93,0* (89,6-107,5)	59,4*# (49,0-69,0)	70,8* (62,1-74,8)	59,9* (52,4-62,4)	55,7 (42,5-62,8)	64,8* (60,3-69,2)	146,7* (145,7-147,8)	70,2*# (60,0-94,0)	94,8*° (88,3-99,1)
IFN γ	103,5 (91,6-125,7)	325,3* (308,1-344,0)	125,9# (114,0-151,0)	146,4° (142,9-154,3)	155,2* (125,9-187,3)	110,2 (107,5-138,0)	136,4 (130,7-145,3)	195,6* (191,5-209,6)	108,0# (102,0-161,1)	152,4* (149,4-179,4)
TGF- β 1	150,0 (118,0-180,0)	162,0 (88,0-184,0)	180,0*# (175,0-275,0)	172,5 (159,3-183,6)	158,5 (145,0-205,0)	204,5*# (195,0-275,0)	187,2 (172,8-198,4)	215,0* (210,0-220,0)	280,0*# (240,0-340,0)	254,1* (231,5-284,4)
IL-6	38,2 (35,7-39,0)	40,0 (37,1-46,2)	78,1*# (64,7-80,3)	59,3 (54,2-66,1)	43,6 (37,0-53,6)	90,1*# (78,5-106,7)	73,7*° (69,5-79,2)	60,5* (52,7-62,7)	79,0*# (69,1-84,5)	85,8*° (72,9-89,3)

Примечание. * p – достоверность различий с контрольной группой (p < 0,05); * p – достоверность различий показателей Th1- и Th17-путь в группе больных ХОБЛ (p < 0,05). ° p – достоверность различий показателей Th1- и Th17/Th17-путь в группе больных ХОБЛ (p < 0,05).

Note. * p, significance of differences with the control group (p < 0.05); * p, significance of differences in the Th1 and Th17 pathways in the COPD group (p < 0.05); ° p, significance of differences in the Th1 and Th17/Th17 pathways in the COPD group (p < 0.05).

терная для Th1/Th17-типа иммунного ответа. Статистически значимое различие внутри группы по уровню исследуемых цитокинов выявлено для всех показателей. У пациентов тяжелого течения ХОБЛ с Th1-зависимым иммунным ответом определялось увеличение в 2 раза ($p < 0,001$) количества CD4⁺CD126⁺ клеток по сравнению с контрольной группой. У пациентов с Th17-зависимым иммунным ответом отмечено значительное возрастание Т-клеток, экспрессирующих IL-6R относительно контрольной группы. В наибольшей степени увеличение затронуло Т-хелперы – на 286% ($p < 0,001$). У пациентов с Th1/Th17-типом иммунного ответа количество CD4⁺CD126⁺ клеток возросло на 212% ($p < 0,001$), количество CD3⁺CD126⁺ – на 197% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой. У больных ХОБЛ тяжелой степени преобладали Th17- и Th1/Th17-типы иммунного ответа. Уровень экспрессии IL-6R при тяжелом течении ХОБЛ увеличивается в 3 раза при Th17- и Th1/Th17-зависимых типах иммунного ответа. Отмечено наиболее значимое возрастание CD4⁺CD126⁺ клеток при Th17-фенотипе.

Полученные данные показали, что по мере утяжеления ХОБЛ происходило увеличение числа Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности IL-6R. Это указывает на значимую роль IL-6 в развитии системного воспалительного процесса при ХОБЛ. IL-6 является важным фактором для дифференциации субпопуляций Th-клеток. Он обладает супрессорной активностью по отношению к Th1 и Treg и способствует развитию Th17-типа иммунного ответа [2, 11]. Кроме того, IL-6 способен подавлять апоптоз клеток посредством индукции антиапоптотических регуляторов. Предполагается, что благодаря этому IL-6 может способствовать развитию хронических заболеваний путем сохранения Т-клеток на участках воспаления. Усиливая активность Т-лимфоцитов, IL-6 способствует утяжелению хронического интерстициального воспаления в легких с различными системными эффектами.

В ходе исследования выявлены особенности клинической картины у пациентов с ХОБЛ в зависимости от фенотипа иммунного ответа (табл. 3). Так, у 59% больных ХОБЛ с Th1-фенотипом иммунного ответа одышка возникала при умеренных физических нагрузках, кашель с незначительным количеством мокроты слизистого характера беспокоил в период обострений. САТ-тест превышал 10 баллов. Ограничение скорости воздушного потока (ОФВ₁) у этих больных уменьшалось в среднем до 65%. Течение заболевания характеризовалось развитием обострений 1-2 раза в год, чаще в холодное время года. Признаки сердечной недостаточности, развившей-

ся на фоне артериальной гипертензии и ИБС, появлялись у каждого третьего пациента. У 64% больных ХОБЛ с Th1/Th17-типом иммунного ответа течение заболевания характеризовалось одышкой при умеренных физических нагрузках (2 балла по шкале MRS), развитием обострений 3-4 раза в год. Ограничение скорости воздушного потока (ОФВ₁) уменьшалось в среднем до 53%. Выраженность симптомов (кашель, выделение мокроты), оцененных по САТ-тесту, соответствовала в среднем 18 баллам. Количество сопутствующих заболеваний увеличилось, к сердечно-сосудистым заболеваниям у каждого второго обследуемого добавились метаболические нарушения. Для 77% больных ХОБЛ с Th17-типом иммунного ответа течение заболевания характеризовалось уменьшением скорости воздушного потока (ОФВ₁) в среднем до 40%, прогрессированием хронической дыхательной недостаточности (3-4 балла по шкале MRS), т.е. одышка беспокоила во время повседневной деятельности, при медленной ходьбе по ровной поверхности, уборке постели, одевании. Таких пациентов постоянно беспокоил кашель с большим количеством отделяемой мокроты часто гнойного характера, САТ-тест более 20 баллов. Частота обострений у этих больных увеличилась до 5-7 раз в год. Среди сопутствующих заболеваний, которые беспокоили пациентов, в 100% случаев преобладали гипертоническая болезнь, ИБС, мерцательная аритмия, метаболический синдром, сахарный диабет и остеопороз. Таким образом, клинические проявления ХОБЛ при Th17-типе иммунного ответа отличаются от клинических проявлений при Th1- и Th1/Th17-типах иммунного ответа. При Th17-фенотипе увеличивается количество обострений заболевания в год, количество отделяемой мокроты, часто носящей гнойный характер, и количество сопутствующих заболеваний.

С учетом ведущей роли воспаления в патогенезе ХОБЛ, диагностика ключевых маркеров воспалительного процесса является первоочередной задачей. Результаты исследования показали, что по мере утяжеления клинического течения ХОБЛ возрастает число Th17-клеток и Т-клеток, экспрессирующих мембраносвязанный IL-6R, посредством которого происходит классическая передача сигнала в клетку. Известно, что при связывании IL-6 с IL-6R на поверхности Т-хелперных лимфоцитов в них запускается JAK/STAT (Janus Kinases – signal transducer and activator of transcription) сигнальный каскад либо MAPK (mitogen-activated protein kinase) сигнальный путь, контролирующие пролиферацию и дифференцировку клеток [8, 14]. Эти сигнальные каскады регулируют дифференцировку Th, влияют на их выживаемость посредством запу-

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ КЛЕТОЧНОГО IL-6 РЕЦЕПТОРА НА Т-КЛЕТКАХ У ПАЦИЕНТОВ С ХОБЛ, Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)
TABLE 2. LEVEL OF EXPRESSION OF CELL IL-6 RECEPTOR ON T CELLS IN PATIENTS WITH COPD, Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)

Показатели, % Parameter studied, %	Контрольная группа Control group n = 32	ХОБЛ легкая степень тяжести COPD mild severity n = 36			ХОБЛ средняя степень тяжести COPD moderate severity n = 52			ХОБЛ тяжелая степень тяжести COPD severe severity n = 24		
		Th1-путь Th1 path n = 24	Th17-путь Th17 path n = 10	Th1/Th17-путь Th1/Th17 path n = 2	Th1-путь Th1 path n = 24	Th17-путь Th1 path n = 21	Th1/Th17-путь Th1/Th17 path n = 7	Th1-путь Th1 path n = 6	Th17-путь Th17 path n = 13	Th1/Th17-путь Th1/Th17 path n = 5
CD3 ⁺	2,25 (2,15-2,40)	2,80 (2,60-2,90)	3,72* (3,42-4,28)	4,15** (3,82-4,64)	2,85* (2,70-3,10)	3,45* (2,99-3,84)	2,95 (2,83-3,40)	4,50***# (4,20-4,80)	6,90***## (6,10-7,90)	7,02***## (6,70-7,80)
CD126 ⁺		2,4* (2,26-2,72)	2,58* (2,13-2,71)	2,19 (1,89-2,30)	1,50 (1,30-2,13)	3,79** (2,53-4,15)	2,36* (2,01-2,94)	3,70***# (3,40-4,20)	6,75***## (5,50-8,50)	5,20***## (5,40-6,89)

Примечание. * p – достоверность различий с контрольной группой (* – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001); # p – достоверность различий между группами ХОБЛ легкой и тяжелой степени тяжести (* – p < 0,05; ** – p < 0,01).

Note. * p, significance of differences with the control group (*, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001); # p, significance of differences between COPD groups of mild and severe severity (*, p < 0.05; **, p < 0.01).

ТАБЛИЦА 3. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ХОБЛ С Тh-ЗАВИСИМЫМИ ТИПАМИ ИММУННОГО ОТВЕТА
TABLE 3. CLINICAL MANIFESTATIONS IN COPD PATIENTS WITH Th-DEPENDENT TYPES OF IMMUNE RESPONSE

Группы пациентов Patient groups	Одышка, в баллах Shortness of breath, in points	Кашель, в баллах Cough, in points	Мокрота, в баллах Sputum, in points	CAT-тест, сред. балл CAT test, medium score	Количество сопутствующих заболеваний Number of concomitant diseases	Количество обострений в год Number of exacerbations per year	ОФВ ₁ , сред. % FEV ₁ , medium %
Th1-тип Th1 type n = 50	1,5	1,5	1,5	14	1,5	1,5	65
Th1/Th17-тип Th1/Th17 type n = 34	2,5#	2,5#	3#	18#	3,5#	3,5#	53#
Th17-тип Th17 type n = 44	4*	4*	5*	24*	7*	6,5*	40*

Примечание. * p < 0,05 – статистическая значимость различий между группами с Th1- и Th17-типами иммунного ответа. # p < 0,05 – статистическая значимость различий между группами с Th1- и Th17-типами иммунного ответа.

Note. * p, the statistical significance of the differences between groups with Th1 and Th17 types of immune response (p < 0.05); # p, the statistical significance of the differences between groups with Th1 and Th17 types of immune response (p < 0.05).

ска синтеза антиапоптотических регуляторов, модулируют продукцию эффекторных цитокинов этими клетками. Увеличение числа CD126-позитивных Т-клеток при прогрессировании ХОБЛ указывает на вовлечение классического IL-6 сигнального пути в патогенез заболевания.

Заключение

Таким образом, у больных ХОБЛ определяются три Т-клеточных фенотипа иммунного ответа – Th1, Th17 и Th1/Th17. При ХОБЛ легкой степени тяжести превалирует Th1-зависимый иммунный ответ. Уровень экспрессии IL-6R представлен в большей степени на CD3⁺CD126⁺ клетках при Th1/Th17-фенотипе и CD4⁺CD126⁺ клетках при Th17-зависимом типе иммунного ответа. У больных ХОБЛ средней степени тяжести Th1-, Th17- и Th1/Th17-типы иммунного ответа определяются в равных долях. Уровень экспрессии IL-6R на зрелых Т-лимфоцитах и Т-хелперах возрастает в наибольшей степени при Th17-зависимом иммунном ответе. У больных ХОБЛ тяжелой степени преобладает иммунный ответ по Th17- и Th1/Th17-типам. Уровень экспрессии IL-6R увеличивается при Th17- и Th1/Th17-зависимых типах иммунного ответа, при этом наиболее значимое увеличение отмечается для CD4⁺CD126⁺ клеток при Th17-фенотипе.

У пациентов с ХОБЛ определяются особенности клинической картины, сопряженные с фенотипом иммунного ответа. При Th1- и Th1/Th17-фенотипах иммунного ответа определяются умеренная степень ограничения скорости воздушного потока и умеренное влияние ХОБЛ на качество жизни пациента, которые сопровождаются редкими сезонными обострениями при Th1-фенотипе и частыми обострениями заболевания при Th1/Th17-фенотипе. У пациентов с Th17-фенотипом иммунного ответа определяется средняя степень тяжести ограничения скорости воздушного потока, выраженное влияние ХОБЛ на качество жизни пациента и частые обострения.

Результаты исследования демонстрируют, что на основе анализа уровня секреции цитокинов, играющих ключевую роль в организации воспалительного процесса, и экспрессии рецепторов можно определить степень активности основных эффекторных Т-клеток и фенотип воспаления. Это позволит спрогнозировать течение хронического заболевания, исход воспаления и определить назначение адекватной терапии с целью предотвращения прогрессирования главных морфологических составляющих ХОБЛ – фиброза, эмфиземы и ремоделирования легких.

Список литературы / References

1. Антонович Ж.В., Царев В.П., Гончарова Н.В. Естественные регуляторные Т-клетки и цитокины у больных бронхиальной астмой в разные периоды заболевания // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2012. № 4. С. 35-44. [Antonovich Zh.V., Tsarev V.P., Goncharova N.V. Natural regulatory T cells and cytokines in patients with bronchial asthma in different periods of the disease. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya* = *International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2012, no. 4, pp. 35-44. (In Russ.)]
2. Виткина Т.И., Денисенко Ю.К., Сидлецкая К.А. Изменение экспрессии рецептора к IL-6 на поверхности иммунокомпетентных клеток при прогрессировании хронической обструктивной болезни легких // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 191-196. [Vitkina T.I., Denisenko Yu.K., Sidletskaya K.A. Changes in the expression of receptor for IL-6 on the surface of immunocompetent cells in the progression of chronic obstructive pulmonary disease. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 191-196. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-191-196.
3. Калинина Е.П., Лобанова Е.Г. Особенности цитокинового профиля у больных хронической обструктивной болезнью легких // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 6. С. 501-506. [Kalinina E.P., Lobanova E.G. Peculiarities of cytokine profile in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 6, pp. 501-506. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-6-501-506.
4. Кириллова Н.А., Деев И.А., Кремер Е.Э., Огородова Л.М., Черногорюк Г.Э. Субпопуляции Т-регуляторных клеток при бронхиальной астме и гетерогенных фенотипах хронической обструктивной болезни легких // Бюллетень сибирской медицины, 2011. № 1. С. 48-54. [Kirillova N.A., Deev I.A., Kremer E.E., Ogorodova L.M., Chernogoryuk G.E. A subpopulation of regulatory T-cells in bronchial asthma and the heterogeneous phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease. *Byulleten sibirskoy meditsiny* = *Bulletin of Siberian Medicine*, 2011, Vol. 1, pp. 48-54. (In Russ.)]
5. Bade G., Khan M.A., Srivastava A.K., Khare P., Solaiappan K.K., Guleria R., Palaniyar N., Talwar A. Serum cytokine profiling and enrichment analysis reveal the involvement of immunological and inflammatory pathways in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2014, Vol. 5, no. 9, pp. 759-773.
6. Barnes P.J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 3, pp. 183-192.

7. Cosmi L., Liotta F., Annunziato F. Th17 regulating lower airway disease. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 1, pp. 1-6.
8. Durham A.L., Caramori G., Chung K.F., Adcock I.M. Targeted anti-inflammatory therapeutics in asthma and chronic obstructive lung disease. *Transl. Res.*, 2016, Vol. 167, no. 1, pp. 192-203.
9. Gan W.Q., Man S.F., Senthilselvan A., Sin D.D. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: systematic review and meta-analysis. *Thorax*, 2004, Vol. 59, no. 7, pp. 574-580.
10. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, Inc. (2014).
11. Hunter C.A., Jones S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 5, pp. 448-457.
12. Kalinina E.P., Denisenko Y.K., Vitkina T.I., Lobanova E.G., Novgorodtseva T.P., Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A., Knyshova V.V., Nazarenko A.V. The mechanisms of the regulation of immune response in patients with comorbidity of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Can. Respir. J.*, 2016, 4503267, 8 p. doi: 10.1155/2016/4503267.
13. Li X.N., Pan X., Qiu D. Imbalances of Th17 and Treg cells and their respective cytokines in COPD patients by disease stage. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2014, Vol. 7, no. 12, pp. 5324-5329.
14. Matera M.G., Page C., Rogliani P., Calzetta L., Cazzola M. Therapeutic monoclonal antibodies for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Drugs*, 2016, Vol. 76, no. 13, pp. 1257-1270.
15. Wang H., Ying H., Wang S., Gu X., Weng Y., Peng W., Xia D., Yu W. Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Respir. J.*, 2015, Vol. 9, no. 3, pp. 330-341.

Авторы:

Калинина Е.П. — д.м.н., главный врач, Медицинский центр ООО «Мой доктор», г. Владивосток, Россия
Виткина Т.И. — д.б.н., профессор РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия
Кнышова В.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории восстановительного лечения, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия

Authors:

Kalinina E.P., PhD, MD (Medicine), Head Physician, Medical Center "My Doctor", Vladivostok, Russian Federation
Vitkina T.I., PhD, MD (Biology), Professor, Russian Academy of Sciences, Leading Research Associate, Laboratory of Biomedical Research, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation
Knyshova V.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Rehabilitation Treatment Laboratory, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Федосеева Е.А. — аспирант, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия

Новгородцева Т.П. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия

Гвозденко Т.А. — д.м.н., профессор РАН, главный научный сотрудник лаборатории восстановительного лечения, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия

Fedosееva E.A., Postgraduate Student, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Novgorodtseva T.P., PhD, MD (Biology), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Biomedical Research, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Gvozdenko T.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Russian Academy of Sciences, Chief Research Associate, Rehabilitation Treatment Laboratory, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 20.03.2018

Отправлена на доработку 22.03.2018

Принята к печати 09.04.2018

Received 20.03.2018

Revision received 22.03.2018

Accepted 09.04.2018

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОФЕРОНА НА КЛЕТОЧНУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ИНТЕРФЕРОНУ- $\alpha 2$ *IN VITRO* У БОЛЬНЫХ ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ, ВЫЗВАННЫМ ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА–БАРР

Куртасова Л.М.^{1,2}, Шакина Н.А.², Шмидт А.Р.², Иккес Л.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора
В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

² КГАУЗ «Красноярский краевой центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия

Резюме. Цель исследования — изучение влияния циклоферона на чувствительность лейкоцитов периферической крови к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* у детей в острый период инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ).

Обследовано 23 ребенка в острый период инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна–Барр, в возрасте 4–6 лет. Контрольную группу составили 15 здоровых детей аналогичного возраста. Чувствительность лейкоцитов периферической крови к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* определяли способом Л.М. Куртасовой и соавт. (2007).

Выявлено 4 типа реакций лейкоцитов периферической крови к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* на индукцию циклофероном у здоровых детей и больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна–Барр. Обнаружены различия в частоте встречаемости, выявленных типов реакций у больных ВЭБ-инфекцией по сравнению с группой здоровых детей.

В группе детей с ВЭБ-инфекцией отсутствует выявляемая у здоровых детей закономерность изменений чувствительности лейкоцитов периферической крови к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* после индукции циклофероном в зависимости от дозы препарата.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, инфекционный мононуклеоз, лейкоциты, чувствительность, интерферон-альфа, циклоферон

Адрес для переписки:

Куртасова Людмила Михайловна
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения РФ
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 1.
Тел.: 8 (391) 220-06-28.
Факс: 8 (391) 221-16-38.
E-mail: sibmed-obozenie@yandex.ru

Address for correspondence:

Kurtasova Ludmila M.
V. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk
State Medical University
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan
Zheleznyak, str., 1.
Phone: 7 (391) 220-06-28.
Fax: 7 (391) 221-16-38.
E-mail: sibmed-obozenie@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.М. Куртасова, Н.А. Шакина, А.Р. Шмидт,
Л.А. Иккес «Влияние циклоферона на клеточную
чувствительность к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* у больных
инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом
Эпштейна–Барр» // Медицинская иммунология, 2018.
Т. 20, № 6. С. 865–870.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-865-870

© Куртасова Л.М. и соавт., 2018

For citation:

L.M. Kurtasova, N.A. Shakina, A.R. Smidt, L.A. Ikkes
“Influence of cycloferon on the cellular susceptibility to
interferon- $\alpha 2$ *in vitro* in patients with infectious mononucleosis
caused by Epstein–Barr virus”, *Medical Immunology*
(Russia)/*Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 6,
pp. 865–870. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-865-870

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-865-870

INFLUENCE OF CYCLOFERON ON THE CELLULAR SUSCEPTIBILITY TO INTERFERON- $\alpha 2$ *IN VITRO* IN PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS CAUSED BY EPSTEIN-BARR VIRUS

Kurtasova L.M.^{a, b}, Shakina N.A.^b, Smidt A.R.^b, Ikkes L.A.^a

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

^b Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Our aim was to study the effect of cycloferon on *in vitro* susceptibility of peripheral blood leukocytes to interferon- $\alpha 2$ in children with infectious mononucleosis in acute phase caused by Epstein-Barr virus (EBV).

Materials and methods were as follows: the study included 23 children 4 to 6 years of age admitted in acute period of infectious mononucleosis. The control group consisted of 15 healthy children of the same age group. *In vitro* susceptibility of peripheral blood leukocytes to interferon- $\alpha 2$ was determined by the method of L.M. Kurtasova (2007).

Four types of *in vitro* response of peripheral blood leukocytes to interferon- $\alpha 2$ upon induction by cycloferon have been revealed in both healthy children and patients with EBV-positive infectious mononucleosis. Differences in occurrence rates of these 4 types of reactions have been found among patients with EBV-infection, in comparison with the group of healthy children.

There was no regular dose-dependent changes in susceptibility of peripheral blood leukocytes to interferon- $\alpha 2$ *in vitro* after cycloferon induction in the group of children with EBV-infection, depending on the dose, which have been revealed in healthy children.

Keywords: Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, leukocytes, susceptibility, interferon-alfa, cycloferon

Введение

Вirus Эпштейна-Барр (ВЭБ) имеет широкое распространение, обладает способностью к персистенции и латенции в организме человека. В последние годы наблюдается повышение частоты ВЭБ-инфекции как среди взрослого, так и детского населения [2, 4, 10]. При этом одной из наиболее частых клинических форм ВЭБ-инфекции у детей является инфекционный мононуклеоз. Учитывая, что в настоящее время инфекционный мононуклеоз относится к болезням иммунной системы, целесообразность использования иммуномодулирующих препаратов в лечении данного заболевания не подлежит сомнению [7, 8].

Интерфероны (IFN) являются постоянным и естественным компонентом против вирусной защиты. Они, прежде всего, подавляют ранние реакции репликационного цикла вирусов, такие как прикрепление, пенетрация и «раздевание». При этом IFN являются цитокинами с широким спектром действия. Наиболее вероятно действие IFN в фазу раннего иммунного ответа [1, 3].

Образуюсь на ранней стадии вирусной инфекции, IFN стимулируют выработку противовирусных белков в интактных клетках, создавая в них так называемое противовирусное состояние. Кро-

ме того, IFN усиливают функцию макрофагов и естественных киллеров, а также цитотоксических Т-лимфоцитов, в результате разрушаются вирус-индуцированные клетки [1, 3, 5].

Для проявления биологических эффектов IFN необходимо связывание их со специфическими рецепторами на поверхности клеток макроорганизма и запуском сложного каскада межклеточных взаимодействий, приводящих к IFN-обусловленной экспрессии многочисленных генных продуктов и маркеров [5]. Разные клетки экспрессируют неодинаковое количество интерфероновых рецепторов, чем, в частности, определяется чувствительность клеток к действию IFN. Необходимо отметить, что для реализации действия IFN на клетках должна быть экспрессия достаточного количества специфических рецепторов к IFN.

Циклоферон — низкомолекулярный индуктор эндогенного интерферона, относящийся к классу акридонов, индуцирует синтез раннего альфа-интерферона [3].

В связи с вышеизложенным целью исследования явилось изучение влияния циклоферона на чувствительность лейкоцитов периферической крови к интерферону- $\alpha 2$ у детей в острый

период инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна–Барр.

Материалы и методы

Проведено открытое клиническое исследование. Обследовано 23 ребенка в острый период инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна–Барр, в возрасте 4–6 лет. Исследование проводилось на базе инфекционного стационара Краевого государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Красноярская межрайонная детская клиническая больница № 1» и КГАУЗ «Краевой центр профилактики и борьбы со СПИД». Контрольную группу составили 15 здоровых детей аналогичного возраста.

Диагноз инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна–Барр, верифицировали методом ПЦР с применением набора реагентов для выделения ДНК ВЭБ в лимфоцитах крови фирмы «ДНК-технологии» (Москва) и методом ИФА с использованием тест-систем фирмы Human (Германия) определяли IgM VCA, IgG EA-Д, IgG EBNA-1 в сыворотке крови. Все больные дети в острую фазу заболевания имели положительный результат на ДНК ВЭБ в лимфоцитах крови и серологические маркеры острой ВЭБ-инфекции (ВЭБ – VCA IgM [+], ВЭБ – EA-Д IgG [+]).

Клеточную чувствительность к реаферону (интерферон- $\alpha 2$) *in vitro* определяли способом Л.М. Куртасовой и соавт. [6], исследуя хемилюминесцентный ответ (ХЛ) лейкоцитов крови без воздействия реаферона и при наличии разных доз препарата в реакционной среде. ХЛ-анализ проводили по методу de Sole и соавт. [9].

Концентрацию реаферона в пробах рассчитывали исходя из среднего количества лейкоцитов в периферической крови ребенка 4–6 лет, количество клеток в пробе и лечебных доз реаферона. Дозы реаферона для расчетов составили 500 тыс. МЕ, 1 млн МЕ и 1,5 млн МЕ. В пробы добавляли 200 мг циклоферона, исходя из возрастной терапевтической дозы препарата.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, Ins., США).

Описательная статистика результатов исследования представлена для относительных величин в виде процентных долей и их стандартных ошибок, для абсолютных – в виде средних арифметических (M) и стандартных отклонений средних (σ).

Результаты и обсуждение

При исследовании чувствительности лейкоцитов крови *in vitro* к интерферону- $\alpha 2$ у большинства здоровых детей после индукции циклоферо-

ном лейкоциты крови теряли чувствительность к интерферону- $\alpha 2$ (62,23%).

Известно, что под действием циклоферона увеличивается выработка эндогенного IFN. При этом, когда продукция IFN достигает максимума, вступают в действие контрольные механизмы его синтеза и наступает фаза так называемой гипореактивности, то есть неспособности отвечать выработкой IFN в ответ на поступающий стимул. Логично предположить, что у большинства здоровых детей вырабатывается достаточное количество эндогенного IFN и в дополнительной стимуляции, в частности циклофероном, они не нуждаются.

Иную картину мы наблюдаем в группе детей с инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна–Барр. Только у 28,99% больных после индукции циклофероном лейкоциты периферической крови теряли чувствительность к реаферону *in vitro*, что в 2,15 раза ($p = 0,0051$) меньше, чем в группе здоровых детей.

Тип реакции – появление клеточной чувствительности к интерферону- $\alpha 2$, отсутствующей до индукции циклофероном, – отмечался с одинаковой частотой в группе здоровых детей (8,89%) и в группе детей с ВЭБ-инфекцией (8,70%). Появление клеточной чувствительности к реаферону после индукции циклофероном, вероятно, обусловлено тем, что у этих детей циклоферон не повышает выработку эндогенного IFN, а, наоборот, снижает, в связи с чем и появляется потребность в экзогенном IFN.

В группе здоровых детей в 13,33% случаев, как в период до индукции циклофероном, так и после, лейкоциты крови имели клеточную чувствительность к интерферону- $\alpha 2$.

В 15,55% случаев чувствительность лейкоцитов крови к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro*, отсутствующая в период до индукции, не появлялась и после индукции циклофероном.

В группе больных ВЭБ-инфекцией лейкоциты крови приблизительно с одинаковой частотой отвечали на индукцию циклофероном реакциями: наличие чувствительности к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* до индукции циклофероном и сохранение ее после индукции (30,43%), отсутствие чувствительности как до индукции, так и после индукции циклофероном (31,88%).

Результаты изучения чувствительности лейкоцитов крови к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* после индукции циклофероном в зависимости от исследуемой дозы препарата представлены на рисунке 1.

Из приведенных данных следует, что в группе здоровых детей чаще встречался тип реакции, когда после индукции циклофероном чувствительность лейкоцитов крови к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* исчезала, по сравнению с другими типами

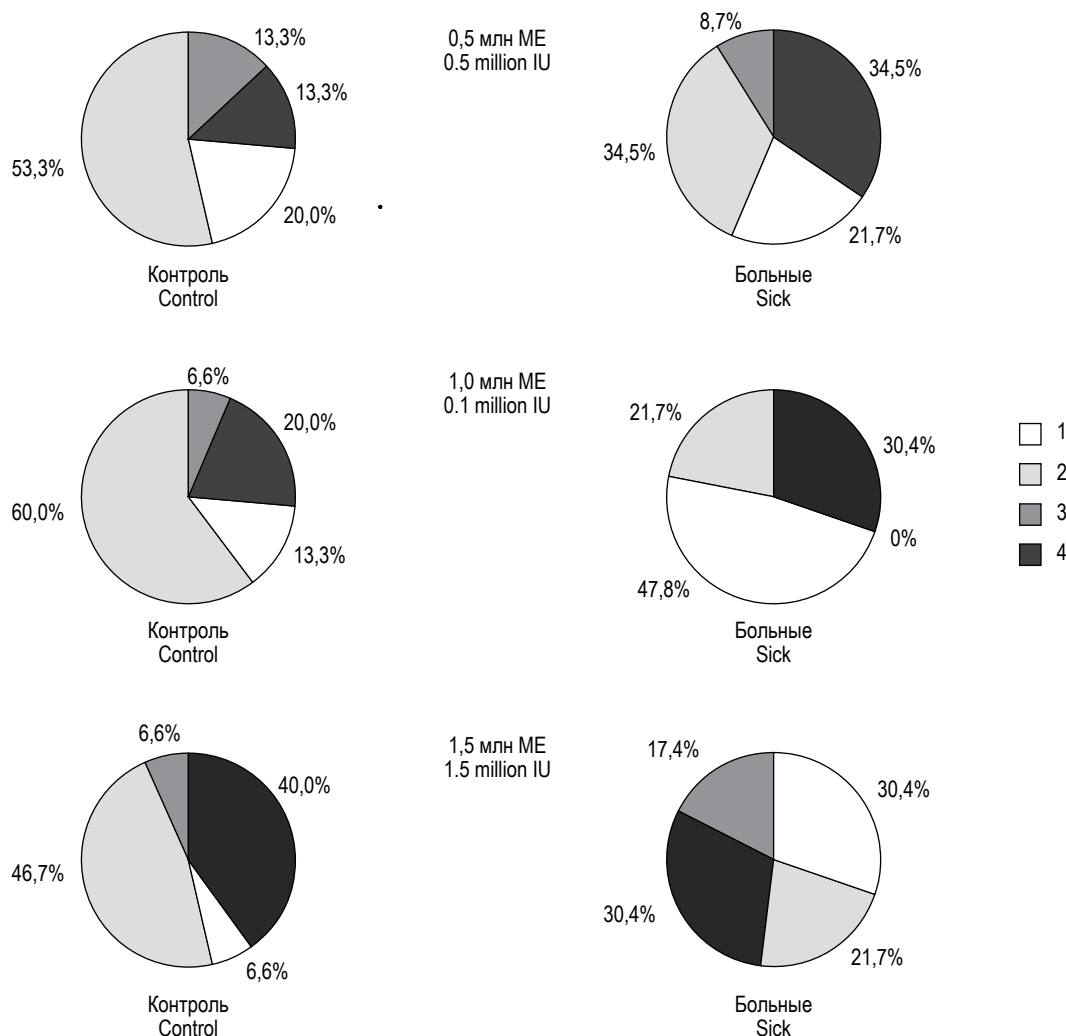


Рисунок 1. Изменение чувствительности лейкоцитов крови к интерферону-α2 после индукции циклофероном

Примечание. 1 – сохранение чувствительности; 2 – исчезновение чувствительности; 3 – появление чувствительности; 4 – отсутствие чувствительности.

Figure 1. Change in the sensitivity of white blood cells to interferon-α2 after induction by cycloferon

Note. 1, preservation of sensitivity; 2, disappearance of sensitivity; 3, appearance of sensitivity; 4, lack of sensitivity.

реакций (500 тыс. МЕ – 53,33-20,00, $p = 0,0582$; 53,33-13,33, $p = 0,0201$; 53,33-13,33, $p = 0,0201$; 1,0 млн МЕ – 60,00-13,33, $p = 0,008$; 60,00-6,60, $p = 0,001$; 60,00-20,00, $p = 0,025$; 1,5 млн МЕ – 46,70-6,60, $p = 0,013$; 46,70-6,60, $p = 0,013$; 46,70-40,00, $p = 0,71$). В группе детей с ВЭБ-инфекцией такой тип реакции чаще наблюдался только по сравнению с типом, когда чувствительность к интерферону-α2 *in vitro* до индукции циклофероном отсутствовала и появлялась после индукции и только на дозу 500 тыс. МЕ (34,50-8,70, $p = 0,032$).

Следует отметить, что максимальный удельный вес данного типа реакции в группе здоровых детей определялся на дозу 1,0 млн МЕ реаферона и соответствовал 60%, в то время как в группе больных ВЭБ-инфекцией данным типом реакции на дозу 1,0 млн МЕ реаферона отвечало наи-

меньшее количество наблюдаемых детей (60,0-21,7%, $p = 0,016$).

В группе здоровых детей прослеживается определенная направленность изменений клеточной чувствительности лейкоцитов крови к интерферону-α2 *in vitro* после индукции циклофероном в зависимости от исследуемой дозы препарата. С увеличением дозы препарата снижается частота встречаемости таких типов реакции лейкоцитов крови, как сохранение клеточной чувствительности после индукции циклофероном и появление клеточной чувствительности, отсутствующей до индукции циклофероном (рис. 1). При этом частота реакции – отсутствие чувствительности к препарату до индукции циклофероном и после индукции – имела противоположную направленность, повышалась с увеличением дозы препарата (рис. 1).

В группе детей с ВЭБ-инфекцией такой зависимости не наблюдалось (рис. 1).

В группе больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна–Барр, реже встречался тип реакции, когда клеточная чувствительность к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* отсутствовала до индукции циклофероном и появлялась после индукции по сравнению с другими типами реакции.

Так, на дозу 500 тыс. МЕ реаферона данный тип клеточной реакции появлялся в 3,97 раза ($p = 0,032$) реже относительно реакции — наличие чувствительности до индукции циклофероном и исчезновение чувствительности после индукции циклофероном, в 2,49 раза ($p = 0,035$) реже по сравнению с частотой реакции — наличие чувствительности к препарату как до индукции циклофероном, так и после индукции и в 3,94 раза ($p = 0,030$) реже по сравнению с реакцией — отсутствие клеточной чувствительности до индукции и после индукции циклофероном. Необходимо отметить, что на дозу 1,0 млн МЕ реаферона такой тип реакции лейкоцитов крови на индукции циклоферона вообще отсутствовал (рис. 1). Анализ распределения частоты типов клеточной реакции лейкоцитов крови после индукции циклофероном на дозу 1,5 млн МЕ препарата показал однонаправленность изменений с дозой 500 тыс. МЕ (в 1,74 раза, 1,25 раза и 1,74 раза встречался реже соответственно). При этом различия не имели статистической значимости.

Таким образом, изучение клеточной чувствительности *in vitro* к интерферону- $\alpha 2$ после индукции циклофероном в группе здоровых детей и в группе больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна–Барр, выявило четыре типа реакции лейкоцитов крови: «потерю» чувствительности после индукции циклофероном, сохранение чувствительности, появление чувствительности, отсутствующей до индукции, и отсутствие чувствительности как до индукции, так и после индукции циклофероном.

Сравнительный анализ показал, что тип реакции — появление чувствительности лейкоцитов крови к интерферону- $\alpha 2$ после индукции циклофероном — с одинаковой частотой определяется у здоровых детей и у больных ВЭБ-инфекцией

и регистрируется значительно реже относительно других выявляемых типов реакций.

В то же время у здоровых детей наибольший удельный вес среди всех выявленных типов реакций лейкоцитов крови к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* после индукции циклофероном составляет реакция «потеря» чувствительности после индукции (62,23%). У больных ВЭБ-инфекцией приблизительно с равной частотой встречаются большинство типов выявленных после индукции циклофероном реакций («потеря» чувствительности — 28,99%; сохранение чувствительности — 30,43%; отсутствие чувствительности как до индукции, так и после — 31,88%), исключение составляет реакция — появление чувствительности после индукции циклофероном (8,7%).

Заключение

Результаты проведенного исследования позволили установить четыре типа реакции лейкоцитов крови к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* после индукции циклофероном у больных в острый период инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна–Барр. Отмечены особенности распределения частоты встречаемости выявленных типов реакций лейкоцитов крови к интерферону *in vitro* после индукции циклофероном у больных ВЭБ-инфекцией по сравнению с группой здоровых детей.

У детей с ВЭБ-инфекцией отсутствует характерная для здоровых детей закономерность изменений чувствительности лейкоцитов крови к интерферону- $\alpha 2$ *in vitro* после индукции циклофероном в зависимости от дозы препарата.

Необходимо отметить, что определенными ограничениями нашего исследования являются относительно небольшое число обследованных больных ВЭБ-инфекцией ($n = 23$) и только одна наблюдаемая возрастная группа детей. Кроме того, представляется интересным проанализировать клеточную чувствительность к интерферону после индукции циклофероном в динамике заболевания и в зависимости от тяжести болезни. Дальнейшие проспективные исследования в данном направлении позволят более полно оценить клиническую значимость определения клеточной чувствительности к интерферону у больных ВЭБ-инфекцией.

Список литературы / References

1. Богомолов С.В. Система интерферона: современные представления о структуре, организации и роли в реализации иммунитета // Инфекционные болезни, 2009. Т. 7, № 1. С. 49-53. [Bogomolov S.V. The interferon system: modern ideas of its structure, organization and role in realization of immunity. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2009, Vol. 7, no. 1, pp. 49-53. (In Russ.)]
2. Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированными

патологиями и у здоровых лиц // Вопросы вирусологии, 2015. Т. 60, № 2. С. 11-17. [Goncharova E.V., Senyuta N.B., Smirnov K.V., Shcherbak L.N., Gurtsevich V.E. Epstein-Barr virus (EBV) in Russia, the infection of the population and the analysis of gene LMP1 variants at the patients with EBV-associated disease and at healthy patients. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, Vol. 60, no. 2, pp. 11-17. (In Russ.)]

3. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Использование индукторов интерферона при вирусных инфекциях // Вопросы вирусологии, 2015. Т. 60, № 2. С. 5-10. [Ershov F.I., Narovlyansky A.N. Usage of interferon inducers during viral infections. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, Vol. 60, no. 2, pp. 5-10. (In Russ.)]

4. Львов Н.Д., Дудукина Е.А. Ключевые вопросы диагностики Эпштейна-Барр вирусной инфекции // Инфекционные болезни. Журнал для непрерывного медицинского образования врачей, 2013. № 3. С. 24-32. [Lvov N.D., Dudukina E.A. Key questions of the Epstein-Barr virus infection diagnostics. *Infektsionnye bolezni. Zhurnal dlya nepreryvnogo meditsinskogo obrazovaniya vrachev = Infectious Diseases. Journal of Continuing Medical Education for Physicians*, 2013, no. 3, pp. 24-32. (In Russ.)]

5. Оспельникова Т.П. Роль интерферона при гриппе и генитальном герпесе // Вопросы вирусологии, 2013. № 5. С. 4-10. [Ospelnikova T.P. The role of interferons in the socially important human viral diseases. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, Vol. 5, no. 5, pp. 4-11. (In Russ.)]

6. Патент 2293988 Российской Федерации. Способ оценки чувствительности к интерферону у больных раком почки / Л.М. Куртасова, Е.А. Шкапова, А.А. Савченко, А.И. Крыжановский, Р.А. Зуков, Н.В. Рачкова № 2005 1006.10; Заявл. 11.01.05; Опубл. 20.02.07, Изобретения. Полезные модели. 2007, Бюл., № 5. 4 с. [Patent 2293988 of Russian Federation. A method of evaluation of susceptibility to interferon at patients with clear cell carcinoma / L.M. Kurtasova, E.A. Shkapova, A.A. Savchenko, A.I. Krizhanovsky, R.A. Zukow, N.V. Rachkova No. 2005 1006.10; Stated. 11.01.05; Published. 20.02.07, Inventions. Utility Models. 2007 Bull., No. 5. 4 p].

7. Разгуляева А.В., Уханова О.П., Безроднова С.М. Современные представления об этиологии, патогенезе, клинике и лечении инфекционного мононуклеоза у детей // Наука. Инновации. Технологии, 2012. Т. 78, № 1. С. 222-227. [Razgulyaeva A.V., Ukhanova O.P., Bezrodnova S.M. Modern ideas about the etiology, pathogenesis, clinic and treatment of infectious mononucleosis in children. *Nauka. Innovatsii. Tekhnologii = Science. Innovation. Technologies*, 2012, Vol. 78, no. 1, pp. 222-227. (In Russ.)]

8. Шведова Н.М., Михайлова Е.В., Цека Ю.С., Чудакова Т.К. Инфекционный мононуклеоз у детей: клинко-лабораторное обследование и экономическая эффективность применения иммунокорректоров // Саратовский научно-медицинский журнал, 2013. Т. 9, № 3. С. 512-517. [Shvedova N.M., Mikhailova E.V., Tseka Yu.S., Chudakova T.K. Infectious mononucleosis in children: clinical and laboratory examination and cost-effectiveness of immunocorrectors. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2013, Vol. 9, no. 3, pp. 512-517. (In Russ.)]

9. de Sole P., Lippa S., Lixxarru G. Whole blood chemiluminescence: a new technical approach to access oxygen-dependent microbial activity of granulocytes. *J. Clin. Lab. Autom.*, 1983, Vol. 3, pp. 391-400.

10. Odumade O.A., Hogquist K.A., Balfour H.H. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2011, Vol. 24, pp. 193-209.

Авторы:

Куртасова Л.М. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; КГАУЗ «Красноярский краевой центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия

Шакина Н.А. — к.м.н., врач-лаборант отделения иммунологических исследований КГАУЗ «Красноярский краевой центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия

Шмидт А.Р. — заместитель главного врача по лечебной части КГАУЗ «Красноярский краевой центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия

Иккес Л.А. — аспирант кафедры детских инфекционных болезней с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Authors:

Kurtasova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, V. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Shakina N.A., PhD (Medicine), Doctor for Clinical Diagnostics, Department of Immunological Research, Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Smidt A.R., Deputy Medical Director, Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Ikkes L.A., Postgraduate Student, Department of Pediatric Infections, V. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 16.01.2018
Принята к печати 17.01.2018

Received 16.01.2018
Accepted 17.01.2018

РАСТВОРИМЫЕ МОЛЕКУЛЫ АДГЕЗИИ У ДЕТЕЙ С АТИПИЧНЫМ ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Панкратенко Т.Е., Москалец О.В., Абасеева Т.Ю.

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт
имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Резюме. Атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС) относится к редким тяжелым жизнеугрожающим формам тромботических микроангиопатий. Считается, что аГУС, прежде всего, обусловлен нарушением регуляции функциональной активности системы комплемента вследствие мутаций или реаранжировки генов различных компонентов комплемента или факторов-регуляторов комплемента, а также продукции аутоантител к этим факторам. В результате этого на поверхности эндотелиальных клеток происходит неконтролируемая активация комплемента по альтернативному пути, а затем развивается эндотелиальная дисфункция, микротромбоз и повреждение внутренних органов, особенно почек. Во многих исследованиях было показано, что биомаркеры эндотелиальной активации/дисфункции, в том числе молекула межклеточной адгезии 1 типа (ICAM-1) и молекула адгезии сосудистого эндотелия 1-го типа (VCAM-1), ассоциируются со степенью тяжести заболевания и могут являться прогностическими маркерами для осложнений и исходов при разных патологиях. При аГУС тоже отмечено повышение уровня этих биомаркеров. До последнего времени аГУС характеризовался неблагоприятными исходами: высокая смертность в острый период, а в дальнейшем у 2/3 больных развивалась терминальная стадия почечной недостаточности. Понимание роли дезрегуляции системы комплемента в его патогенезе кардинально изменило подходы к лечению. Экулизумаб (гуманизированные моноклональные антитела к C5-компоненту) ингибирует терминальные этапы активации комплемента, его появление привело к революционному перевороту в терапии и улучшило прогноз при аГУС. У больных, получавших экулизумаб, отмечалось выраженное снижение C3-компонента. Но вопрос о продолжительности таргетной терапии в фазу ремиссии до сих пор остается неясным. Цель исследования – оценить содержание C3-компонента комплемента, sICAM-1, sVCAM-1 в сыворотке крови у детей с атипичным ГУС в период ремиссии, получающих и не получающих поддерживающую терапию экулизумабом. Уровень C3, sICAM-1 и sVCAM-1 в сыворотке крови определяли у 25 детей в ремиссии аГУС (14 из них получали экулизумаб, 15 не получали). Контрольную группу составили 17 детей с типичным ГУС в анамнезе. Во всех группах уровни sICAM-1 и sVCAM-1 соответствовали возрастным нормам. У детей, получавших экулизумаб, уровень C3 был ниже (99 ± 20 мг/л против 112 ± 15 мг/л и 123 ± 40 мг/л соответственно), а sICAM-1 выше (483 ± 103 нг/мл против 343 ± 50 нг/мл и 401 ± 91 нг/мл соответственно), чем в других группах ($p < 0,05$). Уровень sVCAM-1 между группами не различался. Таким образом, в группе детей, не получавших

Адрес для переписки:

Панкратенко Татьяна Евгеньевна
ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт
имени М.Ф. Владимирского»
129110, Россия, Москва, ул. Щепкина, 61/2.
Тел.: 8 (495) 681-60-00.
E-mail: 6816000@mail.ru

Address for correspondence:

Pankratenko Tatiana E.
M. Vladimirsky Regional Research Clinical Institute
129110, Russian Federation, Moscow, Shchepkin str., 61/2.
Phone: 7 (495) 681-60-00.
E-mail: 6816000@mail.ru

Образец цитирования:

Т.Е. Панкратенко, О.В. Москалец, Т.Ю. Абасеева
«Растворимые молекулы адгезии у детей с атипичным
гемолитико-уремическим синдромом» // Медицинская
иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 871-876.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-871-876
© Панкратенко Т.Е. и соавт., 2018

For citation:

T.E. Pankratenko, O.V. Moskalets, T.Yu. Abaseeva
“Soluble adhesion molecules in children with hemolytic uremic
syndrome”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 871-876.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-871-876
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-871-876

экулизумаб, признаков субклинической активации комплемента или эндотелиальной дисфункции не выявлено. Нормальный уровень C3, sICAM-1, sVCAM-1 в сыворотке крови свидетельствует о возможности полного восстановления нормального состояния эндотелия при аГУС, которое сохраняется и после прекращения таргетной терапии. Наши результаты указывают, что мониторинг уровня C3-компонента комплемента и молекул адгезии sICAM-1 и sVCAM-1 целесообразен для определения дальнейшей тактики ведения таких больных и прогнозирования обострений.

Ключевые слова: атипичный гемолитико-уремический синдром, дети, растворимые молекулы адгезии, комплемент, экулизумаб, ремиссия

SOLUBLE ADHESION MOLECULES IN CHILDREN WITH HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME

Pankratenko T.E., Moskalets O.V., Abaseeva T.Yu.

M. Vladimirsky Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract. Atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) is a rare severe life-threatening form of thrombotic microangiopathy. aHUS is thought to be primarily mediated by dysfunctional complement regulation, due to mutations or genetic rearrangement of the complement components, or regulatory factors, as well as autoantibody production to the complement factors. These alterations promote uncontrolled complement activation by the alternative pathway on the surface of endothelial cells, followed by endothelial dysfunction, microthrombosis and organ damage, especially, renal pathology. Many studies showed that the biomarkers of endothelial activation/dysfunction including intercellular adhesion molecule type 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule type 1 (VCAM-1) were associated with severe disease and could predict complications and clinical outcomes in different disorders. Increase of these biomarkers was observed in aHUS as well. Until recently, aHUS resulted in unfavorable outcomes, with high death rates in acute phase, and up to 2/3 patients progressed to the end-stage renal failure. Understanding the role of complement dysregulation in aHUS pathogenesis has led to major changes in therapeutic approaches. Eculizumab (a humanized anti-C5 monoclonal antibody) inhibits the terminal complement pathway. This drug has revolutionized treatment and improved prognosis in aHUS. Those patients who received eculizumab have shown sharp decrease in the C3 levels. However, the questions concerning duration of targeted therapy in remission still remains unclear.

The aim of the present study was to evaluate serum C3, sICAM-1, sVCAM-1 levels in the children with aHUS remission supported by eculizumab maintenance treatment, or without it. Serum C3, sICAM-1 and sVCAM-1 levels were determined in 25 children with aHUS (14 treated with eculizumab and 15, without eculizumab). A control group included 17 children with a history of typical HUS. Serum levels of C3, sICAM-1 and sVCAM-1 were within normal age ranges in all the groups. The children treated with eculizumab showed decreased C3 levels (99 ± 20 mg/l vs 112 ± 15 mg/l, and 123 ± 40 mg/l, respectively), and increased sICAM-1 levels (483 ± 103 ng/ml vs 343 ± 50 ng/ml and 401 ± 91 ng/ml, respectively) compared to other groups ($p < 0.05$). No differences in sVCAM-1 levels were revealed in the groups. Hence, no signs of subclinical complement activation or endothelial dysfunction were revealed in the group free of eculizumab therapy. Normal C3, sICAM-1 and sVCAM-1 levels in blood indicate that normal endothelial state could be restored in aHUS, and this condition is maintained after discontinuation of the targeted therapy. Our results suggest that C3, sICAM-1 and sVCAM-1 monitoring may be useful for further management of these patients and for prediction of relapses.

Keywords: atypical hemolytic uremic syndrome, children, soluble adhesion molecules, complement, eculizumab, remission

Введение

Гемолитико-уремический синдром (ГУС) — это гетерогенная группа редких, но тяжело протекающих заболеваний, в основе которых лежат тромботические микроангиопатии (ТМА) и выраженные повреждения эндотелиальных

клеток. Выделяют типичный, или диарея-ассоциированный, ГУС (тГУС), главная роль в развитии которого принадлежит шига-токсину, который продуцируют определенные штаммы *E. coli* и *Sh. dysenteriae*, и атипичный ГУС (комплеммент-ассоциированный) (аГУС), в боль-

шинстве случаев связанный с генетически обусловленным и/или приобретенным дефицитом факторов-регуляторов системы комплемента (мутации или реаранжировка генов, продукция аутоантител). Неконтролируемая активация комплемента по альтернативному пути на поверхности эндотелиальных клеток, обусловленная воздействием различных триггеров (инфекции, вакцинации, операции, травмы), приводит к повреждению эндотелия, развитию ТМА различных органов и тканей, преимущественно в сосудах почек [6, 8].

Как известно, активация эндотелия, сменяющаяся его дисфункцией, играет ключевую роль в патогенезе многих заболеваний. Диагностическая и прогностическая ценность биомаркеров активации эндотелия, в том числе молекул клеточной адгезии, изучалась при разной патологии: сепсис, малярия, лихорадка денге, ишемическая болезнь сердца, ревматоидный артрит, рассеянный склероз и др. [1, 2, 10, 11]. Ранее мы выявили, что у детей с тГУС в остром периоде содержание sICAM-1 было достоверно ниже, а sVCAM-1 — достоверно выше, чем у детей с тГУС в анамнезе [3]. В зарубежной литературе сообщается, что эти биомаркеры повышены и при аГУС [6].

До последнего времени прогноз при аГУС был плохой: в течение 2-3 лет с момента дебюта у двух третей больных развивалась терминальная стадия почечной недостаточности [8]. Сейчас применение таргетной терапии экулизумабом (моноклональными антителами к C5-компоненту комплемента) позволяет в подавляющем большинстве случаев достичь гематологической ремиссии и восстановить почечную функцию [5, 7, 9, 11]. Отмечено, что при лечении экулизумабом в сыворотке крови еще снижается и содержание ряда маркеров воспаления и эндотелиального повреждения, хотя показатели остаются более высокими, чем у практически здоровых лиц, что свидетельствует о сохранении субклинической активации комплемента по альтернативному пути [6, 7]. После прекращения таргетной терапии даже на фоне гематологической ремиссии аГУС можно обнаружить повышение уровня этих маркеров, в частности sVCAM-1 [6], что настоятельно требует в отношении возможности прогрессирования поражения почек. С другой стороны, учитывая высокую стоимость таргетной терапии, вопрос о возможности отмены экулизумаба у больных с аГУС в фазу ремиссии остается более чем актуальным [9, 12, 13].

Мы посчитали целесообразным провести исследование содержания в сыворотке крови

больных в ремиссии аГУС C3-компонента комплемента, sICAM-1 и sVCAM-1 для выявления признаков субклинической активации/повреждения эндотелия и активации комплемента, а также для оптимизации дальнейшей тактики лечения.

Материалы и методы

Обследовано 25 детей в клинической ремиссии аГУС (14 — на терапии экулизумабом [группа 1], 11 — без таргетной терапии [группа 2], группу сравнения составили 17 детей — реконвалесцентов тГУС [группа 3]).

Определение концентрации C3-компонента комплемента, sICAM-1, sVCAM-1 проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем Assay Pro (США) и Bender Medsystem (Австрия). Кроме этого, в соответствии со стандартами обследования, определяли содержание гемоглобина, лейкоцитов, тромбоцитов, ЛДГ, креатинина, среднюю скорость клубочковой фильтрации по формуле Шварца (pСКФ). Обработку результатов проводили с помощью стандартного пакета программ прикладного статистического анализа Statistica 7.0 (Statsoft, США). Для характеристики количественных показателей в группе рассчитывалась средняя величина и стандартное отклонение ($M \pm \sigma$). С учетом небольшого числа наблюдений и отличного от нормального распределения данных, для выявления различий между группами использовали критерий Манна-Уитни для независимых переменных. Различия считались достоверными при вероятности безошибочного суждения $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Характеристика пациентов представлена в таблице 1. Дети-реконвалесценты тГУС были несколько моложе. Длительность ремиссии у больных с аГУС и срок после острого периода тГУС достоверно не различались. На момент обследования ни у кого не было признаков активной ТМА или воспаления. В активной стадии аГУС в диализе нуждались 9/14 (64%) пациентов 1-й группы и 4/11 (36%) пациентов 2-й группы ($p < 0,05$). У 5-ти (36%) детей с аГУС 1-й группы таргетная терапия была назначена в поздние сроки (более 1 мес.) от начала заболевания, и у них развивалась хроническая болезнь почек (ХБП) 3 стадии. У детей 2-й группы ХБП 3 ст. отмечена только у одного ребенка, у всех детей-реконвалесцентов тГУС функции почек были сохранены. Соответственно, средняя скорость клубочковой

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ-РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ ГУС

TABLE 1. CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF CHILDREN-RECONVALESCENTS OF HUS

Показатель Characteristic	Группа 1 Group 1 (n = 14)	Группа 2 Group 2 (n = 11)	Группа 3 Group 3 (n = 17)
Возраст, лет Age, years	7,2±5,2	6,75±4,0	3,25±1,75
Длительность ремиссии, мес. Remission period, months	22±20	22±12	20±23
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	128±14	129±16	128±14
Тромбоциты, × 10 ⁹ /л Platelets, × 10 ⁹ /l	310±123	309±84	331±68
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л Leucocytes, × 10 ⁹ /l	7,6±2,5	6,5±1,3	8,5±3,2
ЛДГ, % от верхней границы нормы LDG, % from upper normal limits	96±27	98±19	103±21
Креатинин сыворотки, ммоль/л Serum creatinine, mmol/l	89±53*	54±26	52±18
рСКФ, мл/мин eGFR, ml/min	84±34 [#]	122±35	107±27

Примечание. * – различия с другими группами достоверны, $p < 0,05$; [#] – различие с группой 2 достоверно, $p < 0,05$.

Note. *, differences between groups are significant, $p < 0.05$; [#], difference with group 2 is significant, $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ С3-КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА, sICAM-1, sVCAM-1 У ДЕТЕЙ С ГУС В ФАЗУ РЕМИССИИ

TABLE 2. C3 FRACTION COMPLEMENT, sICAM-1, sVCAM-1 LEVELS IN CHILDREN WITH REMISSION OF HUS

Референсные значения Reference values	Группа 1 Group 1 (n = 14)	Группа 2 Group 2 (n = 11)	Группа 3 Group 3 (n = 17)
С3 (90-180 мг/л) C3 (90-180 mg/l)	99±20*	112±15	123±40
sICAM-1 (206,8-486,8) нг/мл sICAM-1 (206,8-486,8 ng/ml)	483±103*	343±50	401±91
sVCAM-1 (359,6-822,0) пг/мл sVCAM-1 (359,6-822,0) pg/ml)	509±221	439±132	407±141

Примечание. * – различия с другими группами достоверны, $p < 0,05$.

Note. *, differences between groups are significant, $p < 0.05$.

фильтрации (рСКФ) в этой группе была ниже, чем в двух других.

Результаты сравнения содержания sICAM-1, sVCAM-1 и С3-компонента комплемента в исследуемых группах представлены в таблице 2. У детей с аГУС на терапии экулизумабом уровень С3 был ниже, а sICAM-1 выше, чем в других

группах, хотя в целом они соответствовали нормальным значениям у детей данного возраста [4]. Уровень sVCAM-1 не различался между группами и в целом тоже оставался в пределах нормы. Как видно из приведенных данных, в группе пациентов с аГУС, не получавших терапию экулизумабом, мы не выявили достоверных при-

знаков субклинической активации комплемента и повреждения эндотелия. Следует отметить, что в группе больных на терапии экулизумабом уровень С3-компонента комплемента был несколько ниже, что может быть обусловлено его избыточным потреблением вследствие активации по альтернативному пути. Вероятно, это связано с изначально более тяжелым генетическим дефектом регуляторов комплемента в этой группе пациентов (что привело к более тяжелому течению заболевания, развитию хронической болезни почек, необходимостью применения экулизумаба для достижения и сохранения ремиссии). Теоретически экулизумаб, ингибируя образование мембрано-атакующего комплекса (С5-С9), не должен влиять на первые этапы альтернативного пути активации комплемента и, соответственно, на потребление С3-компонента. Некоторое повышение sICAM-1 в этой груп-

пе пациентов, возможно, связано с активацией шеддинга и/или уменьшением его потребления в условиях полной блокады функции терминальных компонентов системы комплемента.

Заключение

Таким образом, нормальный уровень С3-компонента комплемента и молекул адгезии sICAM-1 и sVCAM-1 в сыворотке крови детей в ремиссии аГУС, не получающих поддерживающую терапию экулизумабом, свидетельствует о возможности полного восстановления нормального состояния эндотелия при аГУС, которое сохраняется и после прекращения таргетной терапии. Мониторинг данных показателей у этого контингента больных можно использовать для оптимизации тактики лечения и прогнозирования возможного рецидива.

Список литературы / References

1. Белокопытова И.С., Москалец О.В., Палеев Ф.Н., Зотова О.В. Диагностическое значение молекул адгезии sICAM-1 и sVCAM-1 при ишемической болезни сердца // Атеросклероз и дислипидемии, 2012. Т. 12, № 4. С. 62-65. [Belokopytova I.S., Moskalets O.V., Paleev F.N., Zotova O.V. The diagnostic value of adhesion molecules sICAM-1 and sVCAM-1 in ischemic heart disease. *Ateroskleroz i dislipidemii = Journal of Atherosclerosis and Dislipidemias*, 2013, Vol. 12, no. 4, pp. 62-65. (In Russ.).]
2. Корой П.В., Саритхала В.Д., Ягода А.В. Растворимые молекулы суперсемейства иммуноглобулинов при ревматоидном артрите // Медицинский вестник Северного Кавказа, 2017. Т. 12, № 3. С. 256-260. [Koroy P.V., Saritkhala V.D., Yagoda A.V. Soluble molecules of immunoglobulins superfamily in rheumatoid arthritis. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of the North Caucasus*, 2017, Vol. 12, no. 3, pp. 256-260. (In Russ.).]
3. Панкратенко Т.Е., Москалец О.В., Абасеева Т.Ю. Клинико-диагностическое значение определения растворимых молекул адгезии sICAM и sVCAM у детей с типичным гемолитико-уремическим синдромом // Вопросы практической педиатрии, 2017. Т. 12, № 4. С. 7-14. [Pankratenko T.E., Moskalets O.V., Abaseeva T.Yu. Clinical-diagnostic significance of detection of soluble adhesion molecules sICAM and sVCAM in children with typical haemolytic-uraemic syndrome. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*, 2017, Vol. 12, no. 4, pp. 7-14. (In Russ.).]
4. Andrys C., Rozier O., Krejser J., Derner V., Drahosová M., Kopecky O. Serum soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, E-selectin) in healthy school aged children and adults. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2000, Vol. 43, no. 3, pp. 103-106.
5. Carter S., Hewitt I., Kausman J. Long-term remission with eculizumab in atypical haemolytic uraemic syndrome. *Nephrology (Carlton)*, 2017, Vol. 22, Suppl. 1, pp. 7-10.
6. Cofield R., Kukreja A., Bedard K., Yan Y., Mickle A.P., Oqawa M., Bedrosian C.L., Faas S.J. Eculizumab reduces complement activation, inflammation, endothelial damage, thrombosis and renal injury markers in aHUS. *Blood*, 2015, Vol. 125, no. 21, pp. 3253-3262.
7. Ito N., Hataya H., Saida K., Amano Y., Hidaka Y., Motoyoshi Y., Ohta T., Yoshida Y., Terano C., Iwasa T., Kubota W., Takada H., Hara T., Fujimura Y., Ito S. Efficacy and safety of eculizumab in childhood atypical haemolytic uraemic syndrome in Japan. *Clin. Exp. Nephrol.*, 2016, Vol. 20, no. 2, pp. 265-272.
8. Loirat C., Frémeaux-Bacchi V. Atypical hemolytic uraemic syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2011, Vol. 6, p. 60.
9. Loirat C., Fakhouri F., Ariceta G., Besbas N., Bitzan M., Bjerre A., Coppo R., Emma F., Johnson S., Karpman D., Landau D., Langman C.B., Lapeyraque A.L., Licht C., Nester C., Pecoraro C., Riedl M., van de Kar N.C., van de Walle J., Vivarelli M., Frémeaux-Bacchi V. An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uraemic syndrome in children. *Pediatr. Nephrol.*, 2016, Vol. 31, no. 1, pp. 15-39.
10. Matsui M. Immunology for understanding the pathogenesis of multiple sclerosis. *Rinsho Shinkeigaku*, 2013, Vol. 53, no. 11, pp. 898-901.

11. Page A.V., Liles C.W. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious disease. *Virulence*, 2013, Vol. 4, no. 6, pp. 507-516.
12. Rodrigues E., Barrios C., Soler M.G. Should eculizumab be continued in patients with atypical hemolytic uremic syndrome? *Clin. Kidney J.*, 2017, no. 3, pp. 320-322.
13. Wetzels J.F., van de Kar N.C. Discontinuation of eculizumab maintenance treatment for atypical hemolytic uremic syndrome. *Am. J. Kidney Dis.*, 2015, Vol. 65, p. 342.

Авторы:

Панкратенко Т.Е. — к.м.н., заведующая отделением детского диализа и гемокоррекции ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Москалец О.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Абасеева Т.Ю. — к.м.н., старший научный сотрудник отделения детского диализа и гемокоррекции ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Authors:

Pankratenko T.E., PhD (Medicine), Head, Department of Pediatric Dialysis and Hemocorrection, M. Vladimirsky Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Moskalets O.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Research Laboratory, M. Vladimirsky Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Abaseeva T.Yu., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Pediatric Dialysis and Hemocorrection, M. Vladimirsky Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.01.2018
Принята к печати 08.02.2018

Received 29.01.2018
Accepted 08.02.2018

ВЛИЯНИЕ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ПОДГОТОВКИ УГЛЕВОДАМИ НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ, ИММУННЫЙ И ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУСЫ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ НА ПИЩЕВОДЕ

**Тарасова И.А.¹, Инвиева Е.В.², Бунятян К.А.², Цховребов А.Т.²,
Никода В.В.², Шестаков А.Л.²**

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

² ФГБНУ «Российский центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Резюме. Цель — изучение влияния предоперационной подготовки углеводами на выраженность метаболических, иммунных и воспалительных реакций при проведении обширных реконструктивных вмешательств на пищеводе.

В 2014-2017 гг. в отделении хирургическом I проведено проспективное рандомизированное исследование роли преднагрузки углеводами в модуляции выраженности операционного стресс-ответа у пациентов после обширных торакоабдоминальных операций (торакоскопическая и открытая эзофагэктомия, заградительная пластика пищевода) в сочетании с протоколом программы ускоренного выздоровления. 30 пациентов путем рандомизации были распределены на 2 группы: пациенты группы А (n = 16) получали преднагрузку углеводами в виде 12,5% раствора мальтодекстрина *per os* или энтерально. У пациентов с дисфагией преднагрузка проводилась внутривенным введением 12,5% раствора глюкозы в эквивалентных объемах. Пациентам группы В (n = 14) преднагрузка углеводами не проводилась. Группы не отличались по полу, возрасту, типам операций и заболеваний. Уровень глюкозы, инсулина с расчетом индекса инсулинорезистентности (НОМА-IR) были измерены до и в 1-е сутки после операции, уровень интерлейкинов (IL-6, IL-10, IL-8) и индекса IL-8/IL-10 — до операции, в 1-е и 5-е сутки после операции. Показатели иммунного статуса были оценены до операции и в 5-е сутки после операции.

Стрессовая гипергликемия (> 7,8 ммоль/л) значительно чаще встречалась у пациентов группы В (50%), чем в группе А (6%), $p = 0,012$. Инсулинорезистентность, измеренная НОМА-IR, в группе В отмечалась у 71% пациентов и у только 25% в группе А, $p = 0,027$. При индивидуальном анализе иммунного статуса зарегистрирована более выраженная тенденция к восстановлению показателей к 5-м суткам

Адрес для переписки:

Тарасова Ирина Александровна
ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский
университет)
119991, Россия, Москва, Абрикосовский пер., 2.
Тел.: 8 (499) 248-13-91.
Факс: 8 (499) 246-89-88.
E-mail: rnchsurgery1@mail.ru

Address for correspondence:

Tarasova Irina A.
I. Sechenov First State Medical University
119991, Russian Federation, Moscow, Abrikosovsky lane, 2.
Phone: 7 (499) 248-13-91.
Fax: 7 (499) 246-89-88.
E-mail: rnchsurgery1@mail.ru

Образец цитирования:

И.А. Тарасова, Е.В. Инвиева, К.А. Бунятян,
А.Т. Цховребов, В.В. Никода, А.Л. Шестаков
«Влияние предоперационной подготовки углеводами
на метаболический, иммунный и цитокиновый
статусы пациентов при проведении реконструктивных
операций на пищеводе» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 6. С. 877-888.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-877-888

© Тарасова И.А. и соавт., 2018

For citation:

I.A. Tarasova, E.V. Inviyaeva, K.A. Bunyatyan,
A.T. Tskhovrebov, V.V. Nikoda, A.L. Shestakov "The
influence of the preoperative preload with carbohydrates upon
metabolic, immune and cytokine statuses after reconstructive
esophageal surgical interventions", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 6,
pp. 877-888. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-877-888

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-877-888

после операции среди пациентов группы А. Послеоперационный уровень IL-6 и IL-10 в 1-е и 5-е послеоперационные сутки также был ниже у пациентов в группе А. Частота послеоперационных осложнений и длительность госпитализации были одинаковыми в обеих группах. При этом частота развития нагноения послеоперационной раны в группе А была ниже, чем в группе В (6 и 43% соответственно), $p = 0,03$.

Выводы: при комплексном изучении хирургического стресс-ответа, как совокупности метаболических, иммунных и воспалительных реакций при проведении обширных реконструктивных вмешательств на пищеводе, применение предоперационной подготовки углеводами способствует снижению частоты развития послеоперационной ИР и стрессовой гипергликемии, сопровождается меньшим выбросом провоспалительных цитокинов и оказывает положительное модулирующее влияние на функцию иммунной системы.

Ключевые слова: торакоабдоминальные вмешательства, пластика пищевода, хирургический стресс, цитокины, иммунный статус, инсулинорезистентность, метаболическая подготовка углеводами

THE INFLUENCE OF THE PREOPERATIVE PRELOAD WITH CARBOHYDRATES UPON METABOLIC, IMMUNE AND CYTOKINE STATUSES AFTER RECONSTRUCTIVE ESOPHAGEAL SURGICAL INTERVENTIONS

Tarasova I.A.^a, Inviyaeva E.V.^b, Bunyatyan K.A.^b, Tskhovrebov A.T.^b, Nikoda V.V.^b, Shestakov A.L.^b

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

^b B. Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim of this prospective randomized clinical study was to investigate the role of preoperative carbohydrate administration in surgery-induced metabolic, immune and inflammatory reactions after thoracoabdominal operations. At the Surgical department I (B.V. Petrovsky National Research Center of Surgery), we investigated a modulatory role of carbohydrate preload upon surgical stress observed after major thoracoabdominal operations (thoracoscopic and open esophagectomy, retrosternal colonic esophagoplasty) followed by the enhanced recovery protocol. The study was performed in 2014-2017, it included 30 patients, divided into 2 groups. Group A patients ($n = 16$) received carbohydrates preload (12.5% maltodextrin solution *per os* or enterally). In patients with dysphagia, the 12.5% dextrose solution was used intravenously in equal volumes. Group B patients didn't receive any additional preload with carbohydrates. The groups were age- and gender-matched, similar for disease and surgery types. Glucose and insulin levels (with HOMA insulin resistance index, HOMA-IR) were measured before surgery and on day +1, interleukin levels (IL-6, IL-10, IL-8) and index IL-8/IL-10 were assessed before surgery, and on days +1 and +5 after surgery. Cell-mediated immunity was investigated before surgery and on day +5.

The stress-induced hyperglycemia (> 7.8 mmol/L) was detected more frequently in group B (50%), than in group A (6%), $p = 0.012$. Insulin resistance measured by HOMA-IR in group B was detected in 71% of patients and in 25% patients of group A only, $p = 0.027$. Individual analysis of immune response demonstrated that a trend for immune recovery was detected by the day +5 post-op in the group A. Postoperative levels of IL-6 and IL-10 were lower on day +1 and +5 in group A. Morbidity rates and the terms of hospitalization were similar in both groups. Local postsurgical infections in group A were developed in 6% of the patients vs 35.6% in group B ($p = 0.072$).

In conclusion, a complex study of surgical stress, i.e., metabolic, immune and inflammatory reactions after esophageal surgery has shown that the carbohydrate preload decreased the incidence of postoperative insulin resistance and stress-induced hyperglycemia, being accompanied by lower release of proinflammatory cytokines and provides positive effects upon the patient's immune system.

Keywords: thoracoabdominal surgery, esophagoplasty, surgical stress, cytokines, immune status, insulin resistance, carbohydrates preload

Введение

Хирургический стресс-ответ в настоящее время определяют как совокупность нейроэндокринных, метаболических, воспалительных и иммунных реакций, возникающих в результате воздействия операционной травмы [1, 19]. В рамках этой концепции одним из интегральных показателей патофизиологических реакций, происходящих в организме, некоторые авторы рассматривают развитие послеоперационной инсулинорезистентности (ИР), приводящей к формированию стрессовой гипергликемии и риска развития инфекционных осложнений [7, 11, 26, 30]. Одним из способов коррекции ИР стало применение предоперационной метаболической подготовки — преднагрузки углеводами (ПУ), позволяющей снизить частоту послеоперационных осложнений, в том числе гипергликемии, и положительно влияющей на выраженность хирургического стресс-ответа [21, 22, 25, 26, 30]. Актуальным представляется изучение влияния ПУ на иммунный и цитокиновый статусы в послеоперационном периоде, недостаточно освещенного в литературе [15, 23]. **Целью** данного рандомизированного сравнительного исследования стало изучение влияния ПУ на выраженность стрессового ответа у пациентов после реконструктивных операций на пищеводе.

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе отделения хирургического I (хирургии пищевода и желудка) ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» совместно с научно-клинической лабораторией с января 2014 г. по апрель 2017 г. В исследование на первом этапе были включены 52 пациента с заболеваниями пищевода (рак пищевода, стриктуры различной этиологии, кардиоспазм и ахалазия кардии, повреждения пищевода), которым были проведены обширные реконструктивные вмешательства на пищеводе (торакоскопические и «открытые» субтотальные резекции пищевода с одномоментной эзофагопластикой, заградительная пластика пищевода толстой кишкой) в сочетании с протоколом программы ускоренного выздоровления [17, 30]. Из исследования были исключены пациенты с выявленным ранее сахарным диабетом 2 типа, дооперационным уровнем гликозилированного гемоглобина более 6,5%, с хроническими заболеваниями печени (цирроз печени, хронический вирусный гепатит В, С). Как следствие, были отобраны 30 пациентов, путем рандомизации (метод «урны», компьютерная модель) разделенные на 2 группы: пациентам группы А (n = 16, основная группа) проводилась метаболическая предоперационная подготовка

с использованием 12,5% раствора мальтодекстрина *per os* или энтерально (800 мл накануне и 400 мл за 2-3 часа до операции), у пациентов с дисфагией — с использованием внутривенного введения 12,5% раствора глюкозы в аналогичных объемах. Пациентам группы В (n = 14, группа сравнения) метаболическая подготовка не проводилась.

Характеристики групп представлены в таблице 1. Статистически достоверной разницы между группами не выявлено, хотя следует отметить преобладание в группе А малоинвазивных резекций пищевода (4,5:1), а в группе В — «открытых» (1:1,2), p = 0,378.

Для изучения клинической эффективности методики использовались оценка длительности послеоперационной госпитализации и наблюдения в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) после операции, частота развития послеоперационных осложнений по классификации Clavien–Dindo [16] с отдельной регистрацией частоты инфекционных осложнений.

Всем пациентам проводилось исследование уровней гликемии и инсулина (с вычислением индекса ИР) в предоперационном периоде и в 1-е сутки после операции, а также динамики гликемии (за 1-2 дня до операции, интраоперационно каждые 1,5-2 часа после индукции в анестезию и в 1-е сутки после операции). Значимым уровнем гипергликемии считали повышение более 7,8 ммоль/л (критерии стрессовой гипергликемии, Американская ассоциация клинических эндокринологов и Американская ассоциация по изучению сахарного диабета) [24].

Уровень инсулина определяли с помощью автоматического иммунофлуоресцентного анализатора ARCHITECT i1000SR (Abbott Laboratories, США). Референсными значениями для инсулина считали 2,7-10,4 мкЕД/мл.

ИР рассчитывали с использованием индекса HОmeostatic Model Assessment (HOMA-IR) [5] по формуле:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{глюкоза натощак (ммоль/л)} \times \text{инсулин натощак (мкЕД/мл)}}{22,5}$$

Референсные значения HOMA-IR принимали как < 2,7 (2,7 — порог, соответствующий 75 перцентилю популяционных значений взрослых людей 20-60 лет, без диабета) [4].

Измерялись концентрации про- и противовоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, IL-10), а также их соотношение (IL-6/IL-10) в предоперационном периоде, в 1-е и 5-е сутки после операции с использованием набора CBA Human Inflammatory cytokine (TNFα, IL-10, IL-6, IL-8) на проточном цитометре BD FACSCanto II.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ В ГРУППАХ С ПРЕДНАГРУЗКОЙ УГЛЕВОДАМИ И БЕЗ

TABLE 1. DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS AND TYPE OF SURGERY FOR PATIENTS WITH OR WITHOUT CARBOHYDRATES PRELOAD

Показатель Parameter	Группы Groups		p
	A	B	
Общая характеристика General characteristics			
Всего (n) Total (n)	16	14	–
Мужчины : Женщины (n) Male : Female (n)	1:1	1,3:1	0,730
Возраст (годы) Age (years)	55,4±15,5	53,1±14,1	0,593*
Диагноз Diagnosis			
Кардиоспазм (ахалазия кардии) Cardiospasm (achalasia)	1	2	0,586
Стриктуры пищевода Esophageal strictures	11	6	0,268
Рак пищевода Esophageal cancer	3	4	0,674
Повреждения пищевода Esophageal ruptures	1	2	0,586
ASA и ИМТ ASA and BMI			
ASA II	1	4	0,157
ASA III-IV	15	10	0,157
ИМТ (кг/м²) BMI (kg/m²)	19,7±3,1	22,8±4,8	0,157*
Характер оперативного вмешательства Surgery procedure			
ТСРП Thoracoscopic ER	9	5	0,298
СРП тх Transhiatal ER	1	3	0,315
СРП 3д Transthoracic ER	1	3	0,315
Соотношение малоинвазивных и открытых СРП в группах Thoracoscopic and Open procedures	4,5:1	1:1,2	0,378
ЗППТК Retrosternal colon interposition	5	3	0,688
Пластика желудочной трубкой Gastric tube esophagoplasty	9	8	1
Пластика толстой кишкой Colon esophagoplasty	7	6	1

Примечание. p – рассчитан с применением критерия Фишера; * – p рассчитан с применением критерия Стьюдента; ASA – классификация Американской ассоциации анестезиологов; ИМТ – индекс массы тела; ТСРП – торакоскопическая субтотальная резекция пищевода; СРП тх – трансхиатальная субтотальная резекция пищевода; СРП 3д – субтотальная резекция пищевода «из 3-х доступов»; ЗППТК – заградническая пластика пищевода толстой кишкой.

Note. p, difference by Fisher test; *, p, difference was calculated by Student t-test; ASA, American Society of Anaesthesiologists classification; BMI, body mass index; ER, esophageal resection.

Референсными значениями для интерлейкинов в сыворотке крови считали: IL-6 – $2,9 \pm 0,3$ пг/мл, IL-8 – $15,7 \pm 1,1$ пг/мл, IL-10 – $2,9 \pm 0,5$ пг/мл.

Мониторинг клеточного звена иммунитета осуществлялся до и на 5-е сутки после операции. Иммунологические исследования проводились с помощью цитометра BD FACSCanto II с использованием планинга Multitest (CD3/CD16⁺CD56/CD45/CD4/CD19/CD8 с подсчетом абсолютного числа клеток в пробирках TruCount). Изучали относительное и абсолютное количество основных популяций лимфоцитов: Т-клетки (CD3⁺), В-клетки (CD19⁺), NK-клетки (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), субпопуляции Т-лимфоцитов (Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺), цитотоксические (CD3⁺CD8⁺ с расчетом соотношения CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺, определяли фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН). Для определения на проточном цитометре количества активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺) и оценки содержания суммарного количества активированных В-лимфоцитов и NK-клеток (CD3⁺HLA-DR⁺) использовали реагент Simultest. Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли на проточном цитометре с использованием *E. coli*, меченной ФИТЦ.

Всем пациентам был проведен индивидуальный анализ иммунограммы в сравнении с условно здоровыми донорами по принятой методике [2, 6].

Математическую и статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программы Excel из пакета Microsoft Office и программы IBM SPSS Statistics 24.0 (24.0.0.0.). Достоверность различий сравниваемых количественных величин с вычислением медиан значений и указанием 25 и 75 процентиля: Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$) и использованием критерия Манна–Уитни (U) для непараметрических данных и с использованием критерия Стьюдента с указанием квадратичного отклонения ($M \pm \sigma$) для параметрических. Вычисление значимости качественных различий получали с помощью точного критерия Фишера. Для выборок парных измерений различия оценивали с использованием критерия Вилкоксона (для непараметрических данных). Корреляционный анализ проводили с применением критерия Пирсона (r). Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Метаболический статус

Динамика уровня гликемии до, во время и после операции представлена на рисунке 1. Во время операции гликемия достоверно увеличилась до 9,9 в группе А и 11,8 ммоль/л в группе В ($p < 0,001$), при этом исходный уровень гликемии при первом

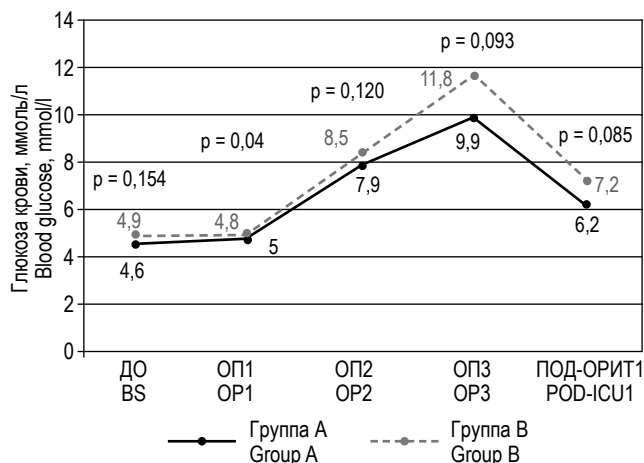


Рисунок 1. Динамика послеоперационной гликемии в группах А и В

Примечание. р рассчитан с применением критерия Манна–Уитни; ДО – до операции; ОП – измерение гликемии в операционной через каждые 1,5-2 часа от индукции в анестезию; ПОД-ОРИТ1 – 1-е сутки в ОРИТ.

Figure 1. Postoperative glucose dynamics in the groups A and B

Note. p was calculated by Mann–Whitney U test; BS, before surgery; OP, intraoperative glucose levels measured every 1,5-2 hours after induction of anaesthesia; POD-ICU1, 1st postoperative day in the intensive care unit.

измерении в операционной в группе А был 4,8 (4,2; 5) ммоль/л, что было достоверно ниже, чем в группе В (5 (4,2; 5,9) ммоль/л), $p = 0,04$.

Медиана инсулинемии исходно в группе А составила 3,9 (3,3; 3,9) мкЕД/мл, в группе В – 5,5 (3,13; 7,6) мкЕД/л, $p = 0,221$. В послеоперационном периоде средний уровень инсулина в группе А достоверно увеличился до 7,8 (3,9; 11,6) мкЕД/л, $p = 0,003$; в группе В – до 12,1 (6,4; 20) мкЕД/л, $p = 0,008$, но статистической разницы между группами получено не было ($p = 0,240$). Индекс ИР (НОМА-IR) в группах до операции не превышал референсных значений (в группе А 0,8 (0,63; 1,4), в группе В – 1,2 (0,75; 1,8), и статистически не отличался, $p = 0,464$. После операции в группе А НОМА-IR увеличился до 2,1 (1,03; 3,5), в то время как в группе В – до 3,2 (1,98; 9), $p = 0,110$.

Получено также статистически значимое снижение частоты стрессовой гипергликемии на фоне применения ПУ (отмечена у 1 (6%) больного в группе А и у 7 (50%) больных в группе В, $p = 0,012$). ИР в послеоперационном периоде (индекс НОМА-IR более 2,7) выявлена у 4 (25%) больных в группе А и у 10 (71%) больных в группе В ($p = 0,027$). При проведении корреляционного анализа получена прямая связь между уровнем НОМА-IR в послеоперационном периоде и развитием инфекционных осложнений ($n = 30$; коэффициент Пирсона $r = 0,389$; $p = 0,033$).

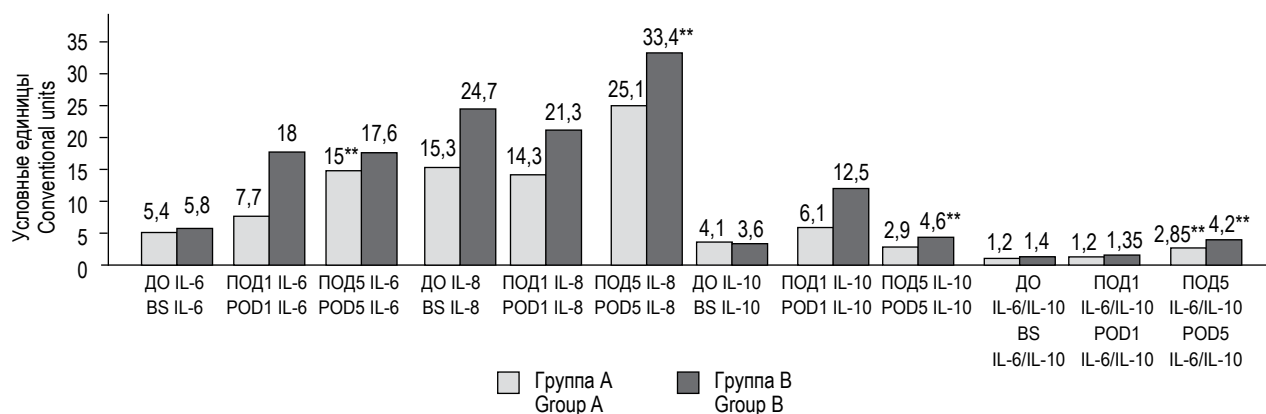


Рисунок 2. Показатели цитокинового статуса в группах до и после операции

Примечание. IL – интерлейкин в пг/мл; ДО – до операции; ПОД1 – 1-е сутки, ПОД5 – 5-е послеоперационные сутки; * – $p < 0,05$ между группами рассчитан с применением критерия Манна–Уитни, ** – $p < 0,05$ внутри групп рассчитана с применением критерия Вилкоксона.

Figure 2. Cytokine status variables in groups before and after surgery

Note. IL, interleukine in pg/mL; BS, before surgery; POD1, 1st postoperative day; POD5, 5th postoperative day; *, $p < 0.05$ by Mann–Whitney (U) test; **, $p < 0.05$ inside group by Wilkoxon signed-rank test.

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА В ГРУППАХ А И В ДО И ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ

TABLE 2. QUANTITATIVE ESTIMATION OF THE MAIN IMMUNE STATUS VARIABLES IN THE GROUPS A AND B BEFORE AND AFTER SURGERY

Показатель Parameter	Группа А Group A		Группа В Group B		Здоровые доноры Healthy donors (D)	p Level of statistical reliability
	A1	A2	B1	B2		
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$ Lymphocytes, $10^9/\text{l}$	2256±237	1791±211	2226±209	1699±174	1932±81	$p_{A1-D} = 0,650$ $p_{B1-D} = 0,077$ $p_{A1-A2} = 0,011$ $p_{B1-B2} = 0,084$
Т-лимфоциты (CD3 ⁺), % T lymphocytes (CD3 ⁺), %	76±1,95	74±1,85	67±2,5	72±2,1	66,9±2,4	$p_{A1-D} = 0,05$ $p_{B1-D} = 0,059$ $p_{A1-A2} = 0,972$ $p_{B1-B2} = 0,721$
Т-лимфоциты (CD3 ⁺), абс. T lymphocytes (CD3 ⁺), abs	1697±165	1398±165	1590±166	1044±103	1168±73	$p_{A1-D} = 0,047$ $p_{B1-D} = 0,032$ $p_{A1-A2} = 0,036$ $p_{B1-B2} = 0,056$
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺), % T helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	39±2,5	43±2,3	39±2,7	41±2,6	38,9±1,5	$p_{A1-D} = 0,910$ $p_{B1-D} = 0,388$ $p_{A1-A2} = 0,023$ $p_{B1-B2} = 0,394$
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺), абс. T helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺), abs	868±104	799±83	859±99	605±64	670±43	$p_{A1-D} = 0,031$ $p_{B1-D} = 0,043$ $p_{A1-A2} = 0,027$ $p_{B1-B2} = 0,767$
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺), % T cytotoxic (CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	33±2,1	28±2,1	25±3	27±3	28±2	$p_{A1-D} = 0,753$ $p_{B1-D} = 0,859$ $p_{A1-A2} = 0,123$ $p_{B1-B2} = 0,683$

Показатель Parameter	Группа А Group A		Группа В Group B		Здоровые доноры Healthy donors (D)	p Level of statistical reliability
	A1	A2	B1	B2		
Т-цитотоксические (CD3⁺CD8⁺), абс. T cytotoxic (CD3 ⁺ CD8 ⁺), abs	748±104	545±97	602±125	509±67	286±36	p _{A1-D} = 0,002 p _{B1-D} = 0,003 p _{A1-A2} = 0,011 p _{B1-B2} = 0,209
Соотношение CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ Ratio CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	1,4±0,2	1,8±0,2	1,9±0,2	1,8±0,2	1,4±0,2	p _{A1-D} = 0,669 p _{B1-D} = 0,357 p _{A1-A2} = 0,078 p _{B1-B2} = 0,721
В-лимфоциты (CD3⁺CD19⁺), % B lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁺), %	8,7±1,4	8,7±0,9	11,6±1,7	12,8±1,7	7,3±1,5	p _{A1-D} = 0,125 p _{B1-D} = 0,582 p _{A1-A2} = 0,592 p _{B1-B2} = 0,061
В-лимфоциты (CD3⁺CD19⁺), абс. B lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁺), abs	223±68	151±16	256±47	213±45	190±30	p _{A1-D} = 0,776 p _{B1-D} = 0,814 p _{A1-A2} = 0,156 p _{B1-B2} = 0,158
НК-клетки (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), % NK cells (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺), %	13,9±2	15±2	20,6±2,3	13,7±1,3	14±2	p _{A1-D} = 0,712 p _{B1-D} = 0,194 p _{A1-A2} = 0,432 p _{B1-B2} = 0,091
НК-клетки (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), абс. NK cells (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺), abs	304±47	293±60	213±36	401±59	270±20	p _{A1-D} = 0,427 p _{B1-D} = 0,084 p _{A1-A2} = 0,173 p _{B1-B2} = 0,209
Т-лимфоциты активированные (CD3⁺HLA-DR⁺), % Activated T lymphocytes (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺), %	8,7±1,7	8,9±1,8	5,9±0,9	7,6±1,1	10,5±2,1	p _{A1-D} = 0,035 p _{B1-D} = 0,008 p _{A1-A2} = 0,750 p _{B1-B2} = 0,677
В-лимфоциты и НК-клетки активированные (CD3⁺HLA-DR⁺), абс. Activated B lymphocytes and NK cells (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺), abs	8,1±0,7	10,1±0,9	15,5±1,6	13,5±1,6	14,5±2	p _{A1-D} = 0,012 p _{B1-D} = 0,212 p _{A1-A2} = 0,833 p _{B1-B2} = 0,553
ФАН, % PAN, %	92,6±1	92±0,8	92±1,2	91±2,2	90±1,4	p _{A1-D} = 0,057 p _{B1-D} = 0,120 p _{A1-A2} = 0,955 p _{B1-B2} = 0,906

Примечание. Достоверность различий по группам в сравнении со здоровыми донорами получена с помощью критерия (U) Манна–Уитни, внутри групп – с помощью критерия знаковых рангов Вилкоксона (p < 0,05). A1 – группа А до операции; A2 – группа А после операции; B1 – группа В до операции; B2 – группа В после операции; D – здоровые доноры. ФАН – фагоцитарная активность нейтрофилов.

Note. The reliability of differences in groups with of the healthy donors was obtained using U test Mann–Whitney, inside the groups – using Wilkoxon test (p < 0.05). A1, group A before surgery; A2, group A after surgery; B1, group B before surgery; B2, group B after surgery; D, healthy donors; PAN, phagocytic activity of neutrophils.

Цитокиновый статус

На рисунке 2 представлена характеристика цитокинового статуса пациентов в группах до операции, в 1-е и 5-е сутки после операции. До операции отмечалось статистически значимое повышение уровня IL-8 у пациентов группы В по сравнению с пациентами группы А. Следует

отметить, что уровень IL-8 у больных группы В превышал референсные значения на всех последующих точках исследования.

При корреляционном анализе в обеих группах (n = 30) отмечена выраженная прямая связь между уровнем IL-6 в 5-е сутки и показателем НОМА-IR в 1-е сутки после операции (r = 0,662;

ТАБЛИЦА 3. ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА В ГРУППАХ А И В ДО И ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ, БОЛЬНЫХ В %

TABLE 3. INDIVIDUAL ANALYSIS OF THE MAIN IMMUNE STATUS VARIABLES IN THE GROUPS A AND B BEFORE AND AFTER SURGERY, PATIENTS IN %

Показатель Parameter	Группа А Group A			Группа В Group B		
	Снижено Decreased	Норма Normal	Повышено Increased	Снижено Decreased	Норма Normal	Повышено Increased
До операции Before surgery						
Лимфоциты Lymphocytes	20	7	73	30	10	60
CD3 ⁺	50	13	37	50	17	33
CD3 ⁺ CD4 ⁺	33	20	47	20	40	40
CD3 ⁺ CD8 ⁺	0	7	93	10	10	80
CD3 ⁺ CD19 ⁺	53	13	34	20	20	60
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	50	6	44	36	7	57
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	56	32	12	80	0	20
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	93	0	7	40	20	40
CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	38	31	31	29	21	50
ФАН PAN	20	7	73	30	10	60
После операции After surgery						
Лимфоциты Lymphocytes	54	0	46	80	0	20
CD3 ⁺	80	0	20	88	0	12
CD3 ⁺ CD4 ⁺	47	0	53	50	20	30
CD3 ⁺ CD8 ⁺	13	20	67	30	20	50
CD3 ⁺ CD19 ⁺	73	20	7	40	30	30
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	63	6	31	50	0	50
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	38	50	12	60	30	10
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	86	7	7	50	20	30
CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	19	25	56	36	14	50
ФАН PAN	14	33	53	30	10	60

Примечание. ФАН – фагоцитарная активность нейтрофилов.

Note. PAN, phagocytic activity of neutrophils.

$p < 0,0001$), а также между уровнем IL-6 в 5-е сутки и уровнем IL-8 в 1-е сутки после операции ($r = 0,560$; $p = 0,007$).

Иммунный статус

При сравнительном анализе иммунного статуса значимой разницы между группами получено не было. При сравнении же со здоровыми донорами до операции в обеих группах отмечено достоверное увеличение абсолютного содержания Т-лимфоцитов и их субпопуляций. Если

в группе А до операции было увеличено количество активированных В + НК-лимфоцитов, то в группе В отмечалось снижение активированных Т-лимфоцитов. На 5-е сутки после операции только в группе А отмечается достоверное снижение абсолютного содержания лимфоцитов, субпопуляции Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (табл. 2).

Далее нами предпринята попытка индивидуального анализа иммунного статуса. До операции

у 20% в группе А и у 30% больных группы В наблюдалось снижение абсолютного содержания лимфоцитов. После операции процент больных со сниженным уровнем лимфоцитов увеличился до 80% в группе В и до 54% в группе А (табл. 3).

Обращает внимание, что общее содержание Т-лимфоцитов ($CD3^+$) до операции было снижено в обеих группах у 50% больных. После операции отмечается дальнейшее увеличение количества пациентов в обеих группах со сниженным содержанием $CD3^+$ (до 80% в группе А и до 88% в группе В). Аналогичная ситуация отмечалась и по субпопуляции Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$).

У больных группы А после операции в 2 раза снизилось количество больных с низким соотношением $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$, чего не отмечали в группе В. Увеличенное содержание В-лимфоцитов ($CD3^+CD19^+$) до операции выявили у 34% больных в группе А и у 60% в группе В. При этом после операции процент пациентов с повышенным уровнем В-лимфоцитов в группе А снизился почти в 5 раз, а в группе В — лишь в 2 раза ($p = 0,046$).

Количество активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+HLA-DR^+$) пришло в норму у 50% пациентов первой группы, чего не отмечалось у пациентов группы В.

В обеих группах до операции преобладали больные с повышенным содержанием ФАН, после операции только в группе А отмечено снижение числа пациентов с повышенным показателем.

Клинические показатели

При оценке клинических показателей получены данные о заметной прямой корреляции уровня ИЛ-6 на 5-е сутки после операции с частотой инфекционных осложнений ($n = 30$; $r = 0,451$; $p = 0,024$), а также об обратной корреляции между частотой инфекционных осложнений и применением ПУ ($n = 30$; $r = -0,472$; $p = 0,008$). В послеоперационном периоде у пациентов в группе А практически в 2 раза реже регистрировались инфекционные осложнения, но статистически значимой разницы между группами не получено ($p = 0,121$). Нагноение же послеоперационной раны значимо чаще отмечалось у пациентов в группе В (43%) в отличие от пациентов группы А (6%), $p = 0,03$. 5 пациентам из группы В потребовались повторные инвазивные манипуляции/операции (IIIa/b степени по классификации Clavien—Dindo). Летальность в обеих группах составила 0%.

Помимо снижения частоты инфекционных осложнений, мы отметили сокращение сроков наблюдения в ОРИТ среди пациентов в группе А по сравнению с пациентами группы В ($p = 0,05$). Длительность общего послеоперационного койко-дня в группах существенно не от-

личалась (16 [8,7; 20] суток в группе А и 18 [11; 44] суток в группе В, $p = 0,518$).

Обсуждение

Послеоперационная ИР, проявляющаяся в снижении чувствительности периферических тканей, в первую очередь скелетной мускулатуры, к действию инсулина [10], в настоящее время рассматривается как один из главных маркеров степени хирургического стресса [14, 18, 19, 22, 25, 26, 27, 30]. В условиях хирургической агрессии ИР обусловлена возрастающей необходимостью в энергетических и пластических веществах для обеспечения функционирования в условиях стресса, а также физиологической стрессовой реакцией, сопровождающейся выбросом катехоламинов, кортизола, глюкагона, гормона роста, способствующих развитию гипергликемии и ИР [13, 17]. ИР как адаптационная реакция, регулирующая направленность синтетических и катаболических реакций, может считаться интегральным показателем выраженности хирургического стресса, особенно при торакоабдоминальных операциях, сопровождающихся максимальными изменениями метаболического и иммунного статуса [3, 7, 15, 17, 22].

В конце 1990-х гг. группа авторов под руководством Ljungqvist O. продемонстрировала снижение послеоперационной ИР при введении раствора глюкозы накануне операции при сравнении со «стандартным» голоданием [18, 19, 25]. По мнению авторов, применение ПУ позволяет уменьшить выраженность послеоперационной ИР и снизить частоту развития стрессовой гипергликемии [18, 19].

Среди доступных изучению публикаций нам не встретились результаты комплексной оценки хирургического стресс-ответа при реконструктивных вмешательствах на пищеводе на фоне предоперационной ПУ. Основной гипотезой данного исследования стало предположение о возможном положительном влиянии ПУ не только на выраженность послеоперационной ИР, но и на цитокиновый и иммунный статусы при проведении обширных реконструктивных вмешательств на пищеводе.

Изменение уровня цитокинов является основой системной воспалительной реакции в ответ на повреждение органов и тканей [2, 6, 9, 21]. Существуют данные, подтверждающие, что продукция провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-2) может способствовать формированию ИР после операции [12, 20, 35]. В нашем исследовании уровень ИЛ-6, как основного медиатора острой фазы повреждения [9], достоверно повышался в обеих группах после операции, достигая своего максимума на 5-е сутки. В группе В также значимо вырос уровень ИЛ-8 ($p = 0,0018$). Существенное повышение уровня цитокинов после

операции, вероятно, обусловлено развитием осложнений у больных в обеих группах и прогрессированием синдрома системного воспалительного ответа. В группе А мы отметили тенденцию к меньшей вариабельности и «пикам» среди показателей цитокинов, хотя и не достоверно. Корреляционный анализ между индексом НОМА-IR, уровнем инсулина и гликемии после операции и IL-6 в нашем исследовании показал значимую прямую связь ($n = 30$; $r = 0,662$; $p < 0,0001$ для НОМА-IR, $r = 0,558$; $p = 0,004$ для гликемии; $r = 0,590$; $p = 0,002$ для инсулина), что подтверждает результаты Thorell A. и соавт. и Makino T. и соавт. [20, 28, 29].

Оценка иммунного статуса необходима для понимания иммунопатологических механизмов, лежащих в основе различных заболеваний и состояний, в том числе и после хирургической операции, а также прогноза развития заболевания, риска возникновения осложнений и оценки полноты выздоровления [2, 8, 9, 15, 21]. В нашем исследовании большинство пациентов с заболеваниями пищевода исходно имели отклонения в иммунном статусе, усугубившиеся при проведении хирургического лечения. В группе А, в отличие от группы В, после операции практически в 2 раза снизилось количество больных с низким соотношением $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$, что свидетельствует о восстановлении баланса субпопуляций Т-клеточного звена иммунитета. После операции у 50% пациентов группы А количество активированных Т-лимфоцитов пришло в норму, чего не отмечалось у пациентов группы В. В обеих группах до операции преобладали больные с повышенным содержанием ФАН, после операции только в группе А отмечено снижение числа таких пациентов. Таким образом, применение ПУ не только снижало выраженность послеоперационной ИР, но и оказывало положительное влияние на иммунный статус, что подтверждают Melis C.G. и соавт., показавшие, что применение углеводов до операции сопровождалось менее выраженной иммуносупрессией в отличие от пациентов, голодающих накануне операции [23]. По данным Chen L. и соавт., влияние протоколов ускоренного восстановления на иммунный статус пациентов после эзофагэктомии при раке пищевода характеризовалось менее выраженными нарушениями при сравнении с «традиционным» ведением и способствовало сокращению послеоперационной госпитализации [15].

Sato H. и соавт. показали, что развитие послеоперационной ИР напрямую связано с риском развития послеоперационных осложнений, в том числе нагноения послеоперационной раны и системной инфекции, а также летального исхода [26]. В нашем исследовании в группе А также отмечалось меньшее количество инфекционных осложнений и частоты нагноения раны (6% в группе А и 43% в группе В, $p = 0,003$, с обратной корреляцией между ПУ и частотой инфекционных осложнений, $r = -0,472$, $p = 0,008$).

Данные последних клинических исследований применения ПУ свидетельствуют о ее положительном влиянии не только на выраженность послеоперационной ИР, но и на сроки госпитализации после обширных хирургических вмешательств [22, 25]. Так, Smith M.D. и соавт. в Кохрейновском обзоре пришли к выводу, что ПУ позволяет сократить послеоперационный койко-день (-1,66 дня, 95% доверительный интервал от -2,97 до -0,34) при сравнении с плацебо и «стандартным» голоданием, но только при проведении обширных хирургических вмешательств [30]. В нашем исследовании достоверных различий по длительности общей послеоперационной госпитализации между группами не получено, однако отмечено достоверное снижение длительности наблюдения в ОРИТ у пациентов группы А ($p = 0,005$). Таким образом, мы считаем, что ПУ оказывает положительное влияние на иммунную систему, цитокиновый и метаболический статусы пациентов при проведении обширных хирургических вмешательств, а клиническое значение данной методики требует дальнейшего изучения, в частности с определением послеоперационной ИР более точными количественными методами [5, 17, 26].

Заключение

При комплексном изучении хирургического стресс-ответа, как совокупности метаболических, иммунных и воспалительных реакций при проведении обширных реконструктивных вмешательств на пищеводе, применение предоперационной подготовки углеводами способствует снижению частоты развития послеоперационной ИР и стрессовой гипергликемии, сопровождается меньшим выбросом провоспалительных цитокинов и оказывает положительное модулирующее влияние на функцию иммунной системы.

Список литературы / References

1. Бунятян А.А., Мизиков В.М. Анестезиология : национальное руководство / под ред. А.А. Бунятяна, В.М. Мизикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. С. 102-129. [Bunyatyanyan A.A., Mizikov V.M. Anaesthesiology: national guidelines. Ed. by A.A. Bunyatyan, V.M. Mizikov]. Moscow: GEOTAR-Media, 2013, pp. 102-129.
2. Волошин А.Г., Никола В.В., Бунятян К.А., Инвиева Е.В., Винницкий Л.И., Бондаренко А.В., Царьков П.В. Иммунитет и цитокиновый статус после операций на толстой кишке // Анестезиология и ре-

- ниматология, 2011. № 2. С. 38-42. [Voloshin A.G., Nikoda V.V., Bunatyan K.A., Inviyayeva E.V., Vinnitsky L.I., Bondarenko A.V., Tsarkov P.V. Immune system and cytokine status after surgeries on large intestine. *Anesteziologiya i reanimatologiya = Anaesthesiology and Reanimatology*, 2011, no. 2, pp. 38-42. (In Russ.)].
3. Гордюнина С.В. Инсулинорезистентность и регуляция метаболизма // Проблемы эндокринологии, 2012. Т. 58, №. 3. С. 58-67. [Gordyunina S.V. Insulin resistance in regulation of metabolism. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2012, Vol. 58, no. 3, pp. 58-67. (In Russ.)]
4. Долгов В.В., Селиванова А.В., Ройтман А.П., Щетникович К.А., Аметов А.С., Демидова Т.Ю., Ильин А.В. Лабораторная диагностика нарушений обмена углеводов. Метаболический синдром, сахарный диабет. М.: Триада, 2006. 128 с. [Dolgov V.V., Selivanova A.V., Roytman A.P., Schetnikovich K.A., Ametov A.S., Demidova T.Yu., Ilyin A.V. Laboratory diagnostic of carbohydrates metabolism disorders. Metabolic syndrome, diabetes mellitus]. Moscow: Triada, 2006. 128 p.
5. Майоров А.Ю., Урбанова К.А., Галстян Г.Р. Методы количественной оценки инсулинорезистентности // Ожирение и метаболизм, 2009. Т. 6, № 2. С. 19-23. [Mayorov A.Yu., Urbanova K.A., Galstyan G.R. Methods for quantitative assessment of insulin resistance. *Ozhirenie i metabolism = Obesity and Metabolism*, 2009, Vol. 6, no. 2, pp. 19-23. (In Russ.)]
6. Матвеев Д.А., Ананьев Д.П., Бунятян К.А., Инви́яева Е.В., Винницкий Л.И., Митрохин С.Д., Калюжин О.В. Коррекция иммунных расстройств и профилактика инфекционных осложнений у больных, оперированных по поводу колоректального рака // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2014. №. 3. С. 55-59. [Matveev D.A., Ananiev D.P., Bunyatyan K.A., Inviyayeva E.V., Vinnitsky L.I., Mitrokhin S.D., Kalyuzhin O.V. Correction of immune disorders and prevention of infectious complications in patients operated on for colorectal cancer. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i ego zdorovye" = Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and his Health"*, 2014, no. 3, pp. 55-59. (In Russ.)]
7. Тарасова И.А., Никода В.В., Шестаков А.Л. Инсулинорезистентность после хирургических вмешательств // Сахарный диабет, 2017. Т. 20, № 2. С. 119-125. [Tarasova I.A., Shestakov A.L., Nikoda V.V. Postoperative insulin resistance. *Sakharnyy diabet = Diabetes Mellitus*, 2017, Vol. 20, no. 2, pp. 119-125. (In Russ.)]
8. Тотолян А.А. Современные подходы к диагностике иммунопатологических состояний // Медицинская иммунология, 1999. Т. 1, № 1-2. С. 75-108. [Totolian A.A. Modern approaches to the diagnosis of immunopathological conditions. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 1999, Vol. 1, no. 1-2, pp. 75-108. (In Russ.)]
9. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы: Учебное пособие. Т. III-V. СПб.: Наука, 2001. 390 с. [Freidlin I.S., Totolian A.A. Cells of the immune system. Vol. III-V. The training manual]. St. Petersburg: Science, 2001. 390 p.
10. Шестакова М.В., Брескина О.Ю. Инсулинорезистентность: патофизиология, клинические проявления, подходы к лечению // Consilium medicum, 2002. № 10. С. 523-527. [Shestakova M.V., Breskina O.Yu. Insulin resistance: pathophysiology, clinical manifestations, treatment approaches. *Consilium medicum*, 2002, no. 10, pp. 523-527. (In Russ.)]
11. Ata A., Lee J., Bestle S.L., Desemone J., Stain S.C. Postoperative hyperglycemia and surgical site infection in general surgery patients. *Arch. Surg.*, 2010, Vol. 145, no. 9, pp. 858-864.
12. Baigrie R.J., Lamont P.M., Kwiatkowski D., Dallman M.J., Morris P.J. Systemic cytokine response after major surgery. *Br. J. Surg.*, 1992, Vol. 79, no. 8, pp. 757-760.
13. Barth E., Albuszies G., Baumgart K., Matejovic M., Wachter U., Vogt J., Calzia E. Glucose metabolism and catecholamines. *Crit. Care Med.*, 2007, Vol. 35, no. 9 (Suppl.), pp. S508-518.
14. Brandi L.S., Santoro D., Natali A., Altomonte F., Baldi S., Frascerra S., Ferrannini E. Insulin resistance of stress: sites and mechanisms. *Clin. Sci. (Lond.)*, 1993, Vol. 85, no. 5, pp. 525-535.
15. Chen L., Sun L., Lang Y., Wu J., Yao L., Ning J., Xu S. Fast-track surgery improves postoperative clinical recovery and cellular and humoral immunity after esophagectomy for esophageal cancer. *BMC Cancer*, 2016, Vol. 16, no. 1, pp. 449-460.
16. Dindo D., Demartines N., Clavien P.A. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg.*, 2004, Vol. 240, no. 2, pp. 205-213.
17. Feldman L.S. The SAGES/ERAS Society manual of enhanced recovery programs for gastrointestinal surgery. Ed. Feldman L.S., Delaney C.P., Ljungqvist O., Carli F. Springer, 2015. 371 p.
18. Ljungqvist O., Nygren J., Thorell A. Modulation of post-operative insulin resistance by pre-operative carbohydrate loading. *Proc. Nutr. Soc.*, 2002, Vol. 61, no. 3, pp. 329-336.
19. Ljungqvist O., Thorell A., Gutniak M., Haggmark T., Efendic S. Glucose infusion instead of preoperative fasting reduces postoperative insulin resistance. *J. Am. Coll. Surg.*, 1994, Vol. 178, no. 4, pp. 329-336.
20. Makino T., Noguchi Y., Yoshikawa T., Nomura K. Circulating interleukin 6 concentrations and insulin resistance in patients with cancer. *Br. J. Surg.*, 1998, Vol. 85, no. 12, pp. 1658-1662.
21. Mannick J.A., Rodrick M.L., Lederer J.A. The immunologic response to injury. *J. Am. Coll. Surg.*, 2001, Vol. 193, pp. 237-244.
22. Mathur S., Plank L.D., McCall J.L., Shapkov P., McIlroy K., Gillanders L.K., Bissett I.P. Randomized controlled trial of preoperative oral carbohydrate treatment in major abdominal surgery. *Br. J. Surg.*, 2010, Vol. 97, pp. 485-494.
23. Melis G.C., van Leeuwen P.A., von Blomberg-van der Flier B.M.E., Goedhart-Hiddinga A.C., Uitdehaag B.M., van Schijndel R.J.S., van Bokhorst-de van der Schueren M.A. A carbohydrate-rich beverage prior

to surgery prevents surgery-induced immunodepression: a randomized, controlled, clinical trial. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.*, 2006, Vol. 30, no. 1, pp. 21-26.

24. Moghissi E.S., Korytkowski M.T., DiNardo M., Einhorn D., Hellman R., Hirsch I.B., Umpierrez G.E. American Association of Clinical Endocrinologists and American Diabetes Association consensus statement on inpatient glycemic control. *Diabetes Care*, 2009, Vol. 32, no. 6, pp. 1119-1131.

25. Nygren J., Soop M., Thorell A., Nair K.S., Ljungqvist O. Preoperative oral carbohydrates and postoperative insulin resistance. *Clin. Nutr.*, 1999, Vol. 18, no. 2, pp. 117-120.

26. Sato H., Carvalho G., Sato T., Lattermann R., Matsukawa T., Schricker T. The association of preoperative glycemic control, intraoperative insulin sensitivity, and outcomes after cardiac surgery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2010, Vol. 95, no. 9, pp. 4338-4344.

27. Smith M.D., McCall J., Plank L., Herbison G.P., Soop M., Nygren J. Preoperative carbohydrate treatment for enhancing recovery after elective surgery. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2014, no. 8, CD009161. doi: 10.1002/14651858.CD009161.pub2.

28. Thorell A., Alston-Smith J., Ljungqvist O. The effect of preoperative carbohydrate loading on hormonal changes, hepatic glycogen, and glucoregulatory enzymes during abdominal surgery. *Nutrition*, 1996, Vol. 12, no. 10, pp. 690-695.

29. Thorell A., Loftenius A., Andersson B., Ljungqvist O. Postoperative insulin resistance and circulating concentrations of stress hormones and cytokines. *Clin. Nutr.*, 1996, Vol. 15, no. 2, pp. 75-79.

30. Zhao G., Cao S., Cui J. Fast-track surgery improves postoperative clinical recovery and reduces postoperative insulin resistance after esophagectomy for esophageal cancer. *Support Care Cancer*, 2014, Vol. 22, no. 2, pp. 351-358.

Авторы:

Тарасова И.А. — врач-хирург, ассистент кафедры госпитальной хирургии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Ивняева Е.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник научно-клинической лаборатории ФГБНУ «Российский центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Бунятян К.А. — д.м.н., главный научный сотрудник научно-клинической лаборатории ФГБНУ «Российский центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Цховребов А.Т. — научный сотрудник отделения хирургического I (хирургии пищевода и желудка) ФГБНУ «Российский центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Никода В.В. — д.м.н., профессор, заведующий отделением общей реанимации и интенсивной терапии I ФГБНУ «Российский центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Шестаков А.Л. — д.м.н., профессор, заведующий отделением хирургическим I (хирургии пищевода и желудка) ФГБНУ «Российский центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Authors:

Tarasova I.A., Surgeon, Assistant Professor, Department of Hospital Surgery, Medical Faculty, I. Sechenov First State Medical University, Moscow, Russian Federation

Inviyaeva E.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Clinical Research Laboratory, B. Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

Bunyatyan K.A., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Clinical Research Laboratory, B. Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

Tskhovrebov A.T., Research Associate, Surgery Department No. 1, B. Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

Nikoda V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Intensive Care Department No. 1, B. Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

Shestakov A.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Surgery Department No. 1, B. Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

Поступила 06.02.2018

Отправлена на доработку 07.03.2018

Принята к печати 16.03.2018

Received 06.02.2018

Revision received 07.03.2018

Accepted 16.03.2018

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-4-589C>T И ЭКСПРЕССИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 У ПАЦИЕНТОВ С РАЗВИТИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ТРАВМАТИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА

Мироманов А.М., Миронова О.Б., Мироманова Н.А.

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ,
г. Чита, Россия

Резюме. Цель исследования — изучение влияния полиморфизма гена *IL4-589C>T* на экспрессию IL-4 у пациентов с развитием хронического травматического остеомиелита при переломах длинных костей конечностей в Забайкальском крае.

В исследование включено 132 пациента с переломами длинных костей конечностей в возрасте от 20 до 40 лет. Первую группу составили 83 пациента с неосложненным течением переломов длинных костей конечностей. Вторую группу ($n = 49$) — больные с хроническим травматическим остеомиелитом (в данной группе отмечалось заживление ран первичным натяжением, однако в позднем послеоперационном периоде зарегистрировано развитие хронического травматического остеомиелита). Контрольную группу составили 100 практически здоровых мужчин и женщин аналогичной возрастной группы. Сформированные группы являлись однородными по возрасту, полу, характеру и локализации переломов. Критерием исключения из групп являлось наличие острых или хронических сопутствующих заболеваний. В работе использованы следующие методы исследования: клинические; лабораторные (микробиологический; иммунологический — определение интерлейкина-4; генетический [с помощью полимеразной цепной реакции; для исследования выбрана точечная мутация гена *IL4* в позиции 589 (C>T); материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из периферической крови больных]; инструментальные (рентгенография). Генетические исследования осуществляли при поступлении пациентов в стационар, тогда как содержание IL-4, клинические и инструментальные показатели выявляли в 1, 2, 10 и 90 сутки после перелома.

Частота C-аллели и гомозиготного генотипа гена *IL4-589C>T* у пациентов группы осложненного течения снижалась в 1,7 и 3,6 раза по сравнению с группой клинического сравнения, соответственно, тогда как T-аллель, напротив, увеличивалась в 3,7 раза, а гетерозиготный и мутантный генотипы — в 2,5 и 15 раз. В группе контроля при носительстве генотипа -589C/C гена *IL4* отмечается увеличение концентрации IL-4 в 1,4 и 2,5 раза, в сравнении с носителями генотипов -589C/T и -589T/T, соответственно, а генотипа -589C/T в 1,7 раза по сопоставлению с генотипом -589T/T. Аналогичная тенденция экспрессии IL-4 в зависимости от носительства генотипа гена *IL4* зафиксирована и в группе с неосложненным и осложненным течением переломов.

У больных с развитием травматического остеомиелита частота аллели -589T гена *IL4* повышена в 3,7 раза по сравнению с группой неосложненного течения, одновременно с этим регистрируется более высокое носительство генотипа -589C/T и генотипа -589T/T гена *IL4*. Наличие генотипа -589T/T гена *IL4* способствует более низкой экспрессии IL-4.

Ключевые слова: полиморфизм, гены, экспрессия, IL-4, переломы, хронический травматический остеомиелит

Адрес для переписки:

Мироманов Александр Михайлович
ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ
672000, Россия, Забайкальский край, г. Чита,
ул. Горького, 39а.
Тел.: 8 (924) 386-18-16.
Факс: 8 (3022) 32-30-58.
E-mail: miromanov_a@mail.ru

Address for correspondence:

Miromanov Alexander M.
Chita State Medical Academy
672000, Russian Federation, Trans-Baikal Region, Chita,
Gorky str., 39a.
Phone: 7 (924) 386-18-16.
Fax: 7 (3022) 32-30-58.
E-mail: miromanov_a@mail.ru

Образец цитирования:

А.М. Мироманов, О.Б. Миронова, Н.А. Мироманова
«Полиморфизм гена интерлейкина-4-589C>T и экспрессия интерлейкина-4 у пациентов с развитием хронического травматического остеомиелита» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 889-894.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-889-894

For citation:

A.M. Miromanov, O.B. Mironova, N.A. Miromanova
“IL4-589C>T gene polymorphism and expression of interleukin-4 in patients with developing chronic traumatic osteomyelitis”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2018, Vol. 20, no. 6, pp. 889-894.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-889-894

IL4-589C>T GENE POLYMORPHISM AND EXPRESSION OF INTERLEUKIN-4 IN PATIENTS WITH DEVELOPING CHRONIC TRAUMATIC OSTEOMYELITIS

Miromanov A.M., Mironova O.B., Miromanova N.A.

Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Abstract. Our aim was to study the influence of *IL4-589C>T* gene polymorphism on IL-4 expression in patients, living in Zabaikalsky Region with a diagnosis of chronic traumatic osteomyelitis developing after fractures of long bones of extremities.

The study included 132 patients with fractures of long bones at the age of 20 to 40 years old. The first group consisted of 83 patients with uncomplicated course of fractures; the second group (n = 49) included patients with chronic traumatic osteomyelitis healed by primary wound closure, however, developing chronic traumatic osteomyelitis over late postoperative period. The control group consisted of 100 practically healthy men and women of the same age group. These groups were homogeneous and similar by age, sex, origin and localization of fractures. Presence of acute or chronic comorbidities was the exclusion criterion. We applied clinical examination, instrumental tests (X-ray studies), laboratory methods (microbiological, immunological, ELISA for IL-4 measurement). IL-4 point mutation at position 589 (C>T) was tested by PCR; the DNA for this analysis was extracted from peripheral blood. The genetic studies were performed when patients entered the hospital. IL-4 contents, clinical and instrumental indicators were detected on 1, 2, 10 and 90 days after fracture.

Results of the study were as follows: the frequency of the C allele and the homozygous genotype of the *IL4-589C>T* gene in the patients with complicated clinical course was decreased 1.7- and 3.6-fold compared with the comparison clinical group, respectively. Frequency of T allele, by contrast, increased 3.7-fold, whereas heterozygous and mutant genotypes were changed 2.5 and 15 times against the comparison group. The persons from control group with *IL4-589C/C* genotype, showed a 1.4- and 2.5-fold increased IL-4 concentration as compared with the carriers of the *-589C/T* and *-589T/T* genotypes, respectively, and in *-589C C/T* genotype, 1.7-fold compared to *-589T/T* genotype. A similar trend of IL-4 expression, depending on the *IL4* genotype, was recorded in the group with both uncomplicated and complicated course of fractures. In conclusion, the patients with developing traumatic osteomyelitis showed increased frequency of the *IL4-589T* allele (3.7-fold as compared with uncomplicated group). Meanwhile, higher frequency of the *-589C/T* - *-589T/T* genotypes of the *IL4* gene were registered. Genotype *-589T/T* of the *IL4* gene is associated with lower IL-4 expression.

Keywords: polymorphism, genes, expression, IL-4, fractures, chronic traumatic osteomyelitis

Введение

Проблема хронического травматического остеомиелита остается одной из наиболее трудных задач современного здравоохранения. Из-за своей распространенности, тяжести медицинских и экономических последствий, а также высокого процента неудовлетворительных результатов хронический травматический остеомиелит имеет огромное социальное значение [4, 13]. Доказано, что важную роль в определении исхода репаративных процессов при переломах длинных костей играет взаимодействие различных систем гомеостаза [7], а цитокины не только являются медиаторами межклеточных коммуникаций при иммунном ответе, гемопоэзе и развитии воспаления, но и служат связующим звеном между иммунной и другими системами организма [3].

В последние годы при изучении патогенеза различных патологических состояний большое внимание уделяется механизмам, происходящим на клеточном и молекулярно-генетическом уровнях. Исследование генов, контролирующих активность цитокинов, являющихся медиаторами воспаления, — одна из важных задач в раскрытии

патогенетических звеньев инициации и течения воспалительных заболеваний и осложнений. Знание их роли в патогенезе многих заболеваний позволяет не только предвидеть риск их развития, но и предоставляет возможность осуществлять персонализированную профилактику [8].

Одним из наиболее изученных полиморфизмов генов цитокинов является *IL4-589C>T*. В ряде исследований показана ассоциация данного полиморфизма с развитием таких заболеваний, как бронхиальная астма, муковисцидоз, инфаркт миокарда, эндометриоз, болезнь Крона и другие [2, 9, 12], однако изучение влияния данного полиморфизма у пациентов с патологией опорно-двигательной системы, в частности при хроническом остеомиелите, недостаточно отражено в отечественных и зарубежных научных изданиях.

Цель исследования — изучить влияние полиморфизма гена *IL4-589C>T* на экспрессию интерлейкина-4 (IL-4) у пациентов с развитием хронического травматического остеомиелита при переломах длинных костей конечностей в Забайкальском крае.

Материалы и методы

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2011 – поправки) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Проведено обследование 132 пациентов в возрасте от 20 до 40 лет с переломами длинных костей конечностей, проживающих в г. Чита.

Объектом исследования являлись образцы периферической крови 132 неродственных пациентов в возрасте от 20 до 40 лет с переломами длинных костей конечностей, русской национальности, проживающих на территории Забайкальского края и получивших специализированную медицинскую помощь (функциональный остеосинтез) в травматологических стационарах. Первую группу составили 83 пациента с неосложненным течением переломов. Вторую группу – 49 пациентов с развитием хронического травматического остеомиелита через 90 дней с момента получения травмы. Контрольная группа была представлена 100 пациентами аналогичного возраста, национальности и ареала проживания. Критерии исключения – наличие острых или хронических

сопутствующих заболеваний. Сформированные группы являлись однородными как по возрасту, полу, характеру и локализации переломов, так и по проводимому лечению.

Для молекулярно-генетического исследования выбрана точечная мутация гена *IL4* в позиции 589 (C>T). Амплификацию фрагмента исследуемого гена проводили в термоцикле (модель Ре «Бис» – M111 (ООО «Бис-Н», г. Новосибирск). В работе использовались стандартные наборы праймеров научно-производственной фирмы «Литех»-SNP (Москва). Визуализация продуктов амплификации выполнена с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в проходящем ультрафиолетовом свете [5]. Определение концентрации цитокина IL-4 осуществляли с помощью набора реагентов АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Генетические исследования осуществляли при поступлении пациентов в стационар, тогда как содержание IL-4 выявляли при поступлении в стационар (1 сутки после травмы), 2, 10 и 90 суток после фрактуры.

Полученные данные обработаны с помощью пакета программ Microsoft Office Excel 2010 for Windows 10, «БИОСТАТ». Для описания характера распределения количественных признаков определялись средние величины (М), стандарт-

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ГЕНОТИПОВ ГЕНА *IL4-589C>T* И ЕГО АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ СРЕДИ РЕЗИДЕНТОВ ГРУППЫ КОНТРОЛЯ И У ПАЦИЕНТОВ ПЕРВОЙ И ВТОРОЙ ГРУПП (χ^2 , df = 1)

TABLE 1. THE FREQUENCY OF GENOTYPES AND ALLELIC VARIANTS OF THE GENE *IL4-589C>T* AMONG THE RESIDENTS OF THE CONTROL GROUP AND IN PATIENTS OF THE FIRST AND SECOND GROUPS (χ^2 , df = 1)

	Контроль Control (n = 100)	Неосложненное течение Uncomplicated course (n = 83)	Хронический остеомиелит Chronic osteomyelitis (n = 49)
Алель С Allele C	0,855	0,867	0,51
OR [95% CI]		1,11 (0,61-2,02)	0,18 (0,1-0,31)
Алель Т Allele T	0,145	0,133	0,49
OR [95% CI]		0,9 (0,5-1,64)	5,66 (3,24-9,89)
χ^2 *		0,12 0,73	40,81 0,0001
Генотип С/С Genotype C/C	0,73	0,747	0,204
OR [95% CI]		1,09 (0,56-2,12)	0,09 (0,04-0,22)
Генотип С/Т Genotype C/T	0,25	0,241	0,612
OR [95%CI]		0,95 (0,48-1,87)	4,74 (2,28-9,84)
Генотип Т/Т Genotype T/T	0,02	0,012	0,184
OR [95% CI]		0,6 (0,05-6,71)	11,03 (2,28-53,3)
χ^2 *		0,21 0,9	39,95 0,0001

Примечание. * – статистическая значимость различий с контролем.

Note. *, statistical significance of differences with the control.

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *IL4-589C>T* И ЕГО ГЕНОТИПОВ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С НЕОСЛОЖНЕННЫМ ТЕЧЕНИЕМ ПЕРЕЛОМОВ И РАЗВИТИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ТРАВМАТИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА (χ^2 , df = 1)

TABLE 2. FREQUENCY OF ALLELIC VARIANTS OF THE GENE *IL4-589C>T* AND ITS GENOTYPES AMONG PATIENTS WITH UNCOMPLICATED FRACTURES AND THE DEVELOPMENT OF CHRONIC TRAUMATIC OSTEOMYELITIS (χ^2 , df = 1)

	Неосложненное течение Uncomplicated course (n = 83)	Хронический остеомиелит Chronic osteomyelitis (n = 49)	χ^2	*	OR [95% CI]
Алель С Allele C	0,867	0,51	40,37	0,0001	0,09-0,29
Алель Т Allele T	0,133	0,49			3,45-11,43
Генотип С/С Genotype C/C	0,747	0,204	39,84	0,0001	0,04-0,2
Генотип С/Т Genotype C/T	0,241	0,612			2,32-10,67
Генотип Т/Т Genotype T/T	0,012	0,184			2,26-150,71

Примечание. * – статистическая значимость различий между группами.

Note. *, statistical significance of differences between groups.

ные отклонения (SD). Для сравнения показателей пациентов с осложненным и неосложненным течением переломов длинных костей конечностей использовали критерий Манна–Уитни. Для анализа групп по качественному бинарному признаку применялся критерий χ^2 . Степень риска развития событий оценивали по величине отношения шансов (odd ratio [OR]) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Частота распределения генотипов и аллелей полиморфизма гена *IL4-589C>T*, выявленных первым этапом исследования, представлена в таблицах 1 и 2.

Анализируя полученные результаты, отмечается значимое различие по частоте носительства как аллелей, так и генотипов между группой с развитием хронического остеомиелита и пациентами групп контроля и клинического сравнения. Так, частота С-аллели и гомозиготного генотипа гена *IL4-589C>T* у пациентов группы осложненного течения снижалась в 1,7 и 3,6 раза соответственно, тогда как Т-аллель, напротив, увеличивалась в 3,4 и 3,7 раза соответственно, а гетерозиготный и мутантный генотипы – в 2,5 и 15 раз соответственно (табл. 1, 2). Данный факт позволяет судить о положительной ассоциации (высоком риске) носительства аллели -589Т-гена *IL4* и генотипа -589Т/Т гена *IL4* с развитием хронического остеомиелита [6].

Следующим этапом работы определено содержание ИЛ-4 в исследуемых группах и уровень его продукции в зависимости от носительства рассматриваемых генотипов в разные сроки посттравматического периода (табл. 3).

В группе контроля при носительстве генотипа -589С/С гена *IL4* отмечается увеличение концентрации ИЛ-4 в 1,4 и 2,5 раза, в сравнении с носителями генотипов -589С/Т и -589Т/Т соответственно, а генотипа -589С/Т в 1,7 раза по сопоставлению с генотипом -589Т/Т. Аналогичная тенденция экспрессии ИЛ-4 в зависимости от носительства генотипа гена *IL4* зафиксирована и в группе с неосложненным и осложненным течением переломов длинных костей (табл. 3). Зарегистрировано, что клиническая картина у пациентов-носителей генотипа -589Т/Т гена *IL4* с развитием травматического остеомиелита отмечалась более тяжелым и длительным течением раневой инфекции, что свидетельствует о возможной ассоциативной связи между повышенной частотой аллели -589Т и тяжелым течением травматического остеомиелита при переломах. Данный факт указывает на важный вклад аллельного полиморфизма генов цитокинов в индивидуальные различия больных по характеру течения инфекционного процесса [1].

Кроме того, наличие гомозиготного генотипа -589Т/Т гена *IL4* сопровождается сниженной продукцией ИЛ-4, что в свою очередь способствует длительному сохранению повышенного содержания провоспалительных цитокинов, тем самым содействуя не только прогрессированию деструктивных процессов в зоне перелома, но и хронизации воспалительного процесса [6]. Данный факт подтверждается тем, что ген *IL4* участвует в формировании иммунного ответа. Он играет большую роль во взаимодействии клеточных и гуморальных факторов иммунных и воспалительных реакций. Некоторые из аллелей данного гена определяют низкую экспрессию этого

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ IL-4 В КРОВИ БОЛЬНЫХ С ПЕРЕЛОМАМИ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *IL4-589C>T*, пг/мл (M±SD)

TABLE 3. CONTENT OF IL-4 IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH FRACTURES OF LONG LIMB BONES, DEPENDING ON THE GENOTYPE OF POLYMORPHISM OF THE GENE *IL4-589C>T*, pg/ml (M±SD)

Группы Groups	Дни наблюдения Observation days			
	при поступлении on admission	2 сутки после операции 2 days after operation	10 сутки после операции 10 days after operation	90 сутки после операции 90 days after operation
Генотип C/C Genotype C/C				
Контроль Control (n = 73)	41,7±6,6			
Неосложненное течение Uncomplicated course (n = 62)	106,7±27,4 *	110,9±28,4 *	64,9±19,3 **/**/	36±1,3 **/**/****
Хронический остеомиелит Chronic osteomyelitis (n = 10)	109,8±29,6 *	113,3±24,8 *	60,7±17,5 **/**/	138,9±14,5 **/**/****
Генотип C/T Genotype C/T				
Контроль Control (n = 25)	28,8±8,6*****			
Неосложненное течение Uncomplicated course (n = 20)	54,9±17,7 */*****	63,1±19,9 */*****	30, 3±9,9 **/**/****	18,9±11 **/**/****/****
Хронический остеомиелит Chronic osteomyelitis (n = 30)	58,8±14,3 */*****	61,1±14,7 */*****	26,9±10,6 **/**/****	82,8±15,6 **/**/****/****
Генотип T/T Genotype T/T				
Контроль Control (n = 2)	16,5			
Неосложненное течение Uncomplicated course (n = 1)	29,9	31,7	7,1	13
Хронический остеомиелит Chronic osteomyelitis (n = 9)	28,6±5,3 */*****	30,4±4,4 **/**/****	6,6±3,7 **/**/****/****	42,8±6,5 **/**/****/****

Примечание. * – статистическая значимость различий с контролем; ** – статистическая значимость различий с 1 сутками; *** – статистическая значимость различий со 2 сутками; **** – статистическая значимость различий с 10 сутками; ***** – статистическая значимость различий с генотипом C/C; ***** – статистическая значимость различий с генотипом C/T.

Note. *, statistical significance of differences with the control; **, statistical significance of differences with 1 day; ***, statistical significance of differences with 2 days; ****, statistical significance of the differences with 10 days; *****, statistical significance of differences with the C/C genotype; *****, statistical significance of differences with the C/T genotype.

цитокина, что влечет за собой образование иммунопатологии [10, 11, 12].

Таким образом, определение генотипов и их воздействие на синтез шифруемых биологически активных веществ содействует пониманию патогенетических аспектов развития воспалительного процесса при переломах, что может способствовать осуществлению персонализированного прогноза и профилактики данного осложнения.

Выводы

У больных с развитием травматического остеомиелита частота аллели -589T гена *IL4* повышена в 3,7 раза по сравнению с группой неосложненного течения, одновременно с этим регистрируется более высокое носительство генотипа -589C/T и генотипа -589T/T гена *IL4*. 2. Наличие генотипа -589T/T гена *IL4* способствует более низкой экспрессии IL-4.

Список литературы / References

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines]. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.
2. Костина Е.М., Молотилова Б.А., Левашова О.А., Осипова М.В. Изучение полиморфизма генов цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-17А и TNF-α у больных с инфекционно-зависимой бронхиальной астмой // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2013. № 1. С. 53-58. [Kostina E.M., Molotilova B.A., Levashova O.A., Osipova M.V. Study of polymorphism of cytokine genes IL-4, IL-10, IL-17A and TNF-α in patients with infectious-dependent bronchial asthma. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya* = *International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2013, no. 1, pp. 53-58. (In Russ.)]
3. Кузник Б.И., Цыбиков Н.Н., Витковский Ю.А. Единая клеточно-гуморальная система защиты организма // Тромбоз, гемостаз и реология, 2005. № 2. С. 3-16. [Kuznik B.I., Tsybikov N.N., Vitkovsky Yu.A. Unified cellular-humoral system of body protection. *Tromboz, gemostaz i reologiya* = *Thrombosis, Hemostasis and Rheology*, 2005, no. 2, pp. 3-16. (In Russ.)]
4. Леончук Д.С., Сазонова Н.В., Ширяева Е.В., Ключин Н.М. Хронический посттравматический остеомиелит плеча: экономические аспекты лечения методом чрекостного остеосинтеза аппаратом Илизарова // Гений ортопедии, 2017. Т. 23, № 1. С. 74-79. [Leonchuk D.S., Sazonova N.V., Shiryayeva E.V., Klyushin N.M. Chronic posttraumatic osteomyelitis of the humerus: economic aspects of treatment with the method of transosseous osteosynthesis method using the Ilizarov fixator. *Geniy ortopedii* = *Orthopedic Genius*, 2017, Vol. 23, no. 1, pp. 74-79. (In Russ.)]
5. Мироманов А.М., Миронова О.Б., Трубицын М.В., Витковский Ю.А. Полиморфизм гена TNF-α (G-308A) у больных с гнойно-воспалительными осложнениями при переломах длинных костей конечностей в Забайкальском крае [Электронный ресурс] // Забайкальский медицинский вестник, 2013. № 1. С. 41-45. Режим доступа: <http://chitgma.ru/zmv2> (дата обращения: 12.01.2018). [Miromanov A.M., Mironova O.B., Trubitsyn M.V., Vitkovsky Yu.A. Polimorfizm of a gene of TNF-α (G-308A) at patients with pyoinflammatory complications at fractures of long bones of extremities in Zabayskalsky edge [the Electron resource]. *Zabaykalskiy meditsinskiy vestnik* = *Transbaikalsky Medical Bulletin*, 2013, no. 1, pp. 41-45. An access regimen: <http://chitgma.ru/zmv2> (reference date: 12.01.2018). (In Russ.)]
6. Мироманов А.М., Миронова О.Б., Усков С.А., Трубицын М.В., Гусев К.А. Полиморфизм гена интерлейкина-4 у больных с осложненным течением переломов длинных костей конечностей // Врач-аспирант, 2013. Т. 60, № 5.3. С. 434-440. [Miromanov A.M., Mironova O.B., Uskov S.A., Trubitsyn M.V., Gusev K.A. Polimorfizm of a gene interleykina-4 at patients with the complicated course of fractures of long bones of extremities. *Vrach-aspirant* = *Postgraduate Doctor Journal*, 2013, Vol. 60, no 5.3, pp. 434-440. (In Russ.)]
7. Мироманов А.М., Намоконов Е.В. Прогностические критерии развития осложнений при переломах костей конечностей. Чита: РИЦ ЧГМА, 2014. 175 с. [Miromanov A.M., Namokonov E.V. Prognostic criteria of development of complications at fractures of bones of extremities]. Chita: Chita State Medical Academy Publishing House, 2014. 175 p.
8. Пузырева Л.В., Сафонов А.Д. Генетический полиморфизм: прошлое и будущее // Инфекция и иммунитет, 2016. Т. 6, № 2. С. 103-108. [Puzyryova L.V., Safonov A.D. Cytokines genetic polymorphism: the past and the future. *Infektsiya i immunitet* = *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, Vol. 6, no. 2, pp. 103-108. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-2016-2-103-108.
9. Davenport P., Tipping P.G. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Pathol.*, 2003, Vol. 163, pp. 1117-1125.
10. Mout R., Willemze R., Landegent J.E. Repeat polymorphisms in the interleukin-4 gene (IL4). *Nucleic. Acids. Res.*, 1991, Vol. 19, no. 13, p. 3763.
11. Nakashima H., Miyake K., Inoue Y., Shimizu S., Akahoshi M., Tanaka Y., Otsuka T., Narada M. Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. *Genes Immun.*, 2002, Vol. 3, pp. 107-109.
12. Nakayama E.E., Hoshino Y., Xin X., Liu H., Goto M., Watanabe N., Taguchi H., Hitani A., Kawana-Tachikawa A., Fukushima M., Yamada K., Sugiura W., Oka S.I., Ajiwawa A., Sato H., Takebe Y., Nakamura T., Nagai Y., Iwamoto A., Shioda T. Polymorphism in the interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type syncytium-inducing phenotype. *J. Virol.*, 2000, Vol. 74, no. 12, pp. 5452-5459.
13. Peng J., Ren Y., He W., Li Z., Yang J., Liu Y., Zheng Z., Kates S.L., Schwarz E.M., Xie C., Xu Y. Epidemiological, clinical and microbiological characteristics of patients with post-traumatic osteomyelitis of limb fractures in Southwest China: A hospital-based study. *J. Bone Jt. Infect.*, 2017, Vol. 2, no. 3, pp. 149-153.

Авторы:

Мироманов А.М. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой травматологии и ортопедии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

Миронова О.Б. — к.м.н., ассистент кафедры травматологии и ортопедии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

Мироманова Н.А. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой детских инфекций ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

Authors:

Miromanov A.M., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Traumatology and Orthopedics, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Mironova O.B., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Traumatology and Orthopedics, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Miromanova N.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pediatric Infections, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Поступила 07.02.2018

Принята к печати 15.02.2018

Received 07.02.2018

Accepted 15.02.2018

ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВ И БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА ПРИ ВИБРАЦИОННОЙ БОЛЕЗНИ

Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И.

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Россия

Резюме. Длительное воздействие производственной вибрации на рабочих приводит к развитию вибрационной болезни (ВБ), которая занимает лидирующие позиции в структуре профессиональной патологии. ВБ от воздействия локальной вибрации представляет собой хроническое профессиональное заболевание с преимущественным поражением нервной, сосудистой системы и опорно-двигательного аппарата верхних и нижних конечностей. Одним из реальных путей снижения заболеваемости является раннее выявление негативного воздействия вибрации на организм работников. В связи с этим цитокины и белки теплового шока (БТШ) могут быть ранними и чувствительными показателями, отражающими степень выраженности нарушений здоровья от воздействия вибрации. Целью исследования явилось изучение изменений в содержании про- и противовоспалительных цитокинов, внеклеточного БТШ70 и их взаимосвязь у пациентов с ВБ. В иммунологическое исследование включено 43 пациента мужского пола с диагнозом ВБ. Критериями включения в данную группу были: верифицированный диагноз, письменное информированное согласие на участие в исследовании, вредное воздействие локальной вибрации на производстве. По данным гигиенического контроля, условия труда рабочих виброопасных профессий относятся к 4 (опасному) классу за счет интенсивной локальной вибрации. Содержание цитокинов IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF α и БТШ70 в сыворотке крови пациентов определяли иммуноферментным анализом. Забор крови для исследования у пациентов брали однократно при поступлении в стационар до проведения лечения. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica for Windows 6.0 и Microsoft Excel. Установлено, что развитие заболевания ВБ сопровождается дисбалансом цитокинового профиля, характеризующимся снижением уровней IL-1 β , IL-10 и повышением IL-8. Угнетение продукции IL-1 β и IL-10 является следствием сформировавшегося хронического процесса в организме обследованных пациентов. А выявленное снижение внеклеточной концентрации БТШ70 по сравнению с практически здоровыми людьми может быть обусловлено накоплением его внутри клетки или на ее поверхности. Корреляционный анализ позволил выявить зависимость между снижением содержания БТШ70 и возрастом уровня IL-1 β , и снижением уровня IL-10. Синтез БТШ является внутриклеточным защитным механизмом, предотвращающим повреждение клеток, путем активации синтеза и секреции провоспалительных цитокинов. Полученные взаимоотношения между цитокинами и БТШ70 свидетельствуют о вовлеченности БТШ70 в иммунновоспалительные процессы при ВБ. Выявленные изменения способствуют хронизации воспалительного процесса и обосновывают прогрессивное течение ВБ.

Ключевые слова: цитокины, белок теплового шока 70, пациенты с ВБ, иммунореактивность

EVALUATION OF CYTOKINES AND HEAT SHOCK PROTEIN IN VIBRATION DISEASE

Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I.

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Russian Federation

Abstract. The prolonged impact of industrial vibration on workers leads to the development of a vibrational disease (VB), which occupies a leading position in the structure of occupational pathology. VB from the impact of local vibration is a chronic occupational disease characterized by a predominant lesion of the nervous,

Адрес для переписки:

Бодиенкова Галина Михайловна
ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-
экологических исследований»
665827, Россия, Иркутская область, г. Ангарск, 12а
микрорайон, 3.
Тел.: 8 (3955) 55-75-66.
E-mail: immun11@yandex.ru

Address for correspondence:

Bodienkova Galina M.
East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research
665827, Russian Federation, Irkutsk Region, Angarsk,
Quarter 12a, 3.
Phone: 7 (3955) 55-75-66.
E-mail: immun11@yandex.ru

Образец цитирования:

Г.М. Бодиенкова, С.И. Курчевенко «Оценка цитокинов
и белка теплового шока при вибрационной болезни»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6.
С. 895–898.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-895-898
© Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И., 2018

For citation:

G.M. Bodienkova, S.I. Kurchevenko "Evaluation of cytokines
and heat shock protein in vibration disease", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,
Vol. 20, no. 6, pp. 895–898.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-895-898
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-895-898

vascular system and musculoskeletal system of the upper and lower extremities. One of the real ways to reduce the incidence is the early detection of the negative impact of vibration on the body of workers. In this regard, cytokines and heat shock proteins (HSP70) can be early and sensitive indicators that reflect the severity of health disorders from exposure to vibration. The aim of the study was to study changes in the content of pro- and antiinflammatory cytokines, extracellular HSP70 and their relationship in patients with VB. In the immunological study included 43 male patients with a diagnosis of VB. The criteria for inclusion in this group were: a verified diagnosis, written informed consent to participate in the study, the harmful effects of local vibration in the workplace. According to the data of hygienic control, the working conditions of workers in dangerous occupations by vibration belong to the 4 (dangerous) class due to intensive local vibration. The content of cytokines: IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF α and HSP70 in the serum of patients was determined by enzyme immunoassay. The blood sampling for the study was taken from patients only once on admission to the hospital before the treatment. Statistical processing of data was carried out with the help of packages of application programs Statistica for Windows 6.0 and Microsoft Excel. It was established that the development of VB disease is accompanied by imbalance of the cytokine profile, characterized by a decrease in the levels of IL-1 β , IL-10 and an increase in IL-8. The inhibition of production of IL-1 β and IL-10 is a consequence of the chronic process that has developed in the body of the patients examined. And the revealed decrease in extracellular concentration of HSP70 in comparison with practically healthy people can be caused by the accumulation of it inside the cell or on its surface. Correlation analysis revealed the relationship between a decrease in HSP70 and an increase in IL-1 β , and a decrease in IL-10 levels. Synthesis of HSP is an intracellular defense mechanism that prevents cell damage by activating the synthesis and secretion of pro-inflammatory cytokines. The obtained relationships between cytokines and HSP70 testify to the involvement of HSP70 in immunoinflammatory processes in VB. The revealed changes contribute to the chronic inflammatory process and justify the progressive course of the VB.

Keywords: cytokines, heat shock protein 70, vibration disease, immune response

Введение

Комплекс физических факторов обуславливает развитие ряда профессиональных заболеваний, в том числе вибрационную болезнь (ВБ), которая занимает лидирующие позиции в структуре профессиональной патологии. Одним из реальных путей снижения заболеваемости является раннее выявление негативного воздействия вибрации на организм работников [2]. Известно, что уже у практически здоровых рабочих при воздействии вибрации отмечаются изменения на молекулярном, клеточном и субклеточном уровнях [4]. В связи с этим цитокины и БТШ могут быть ранними и чувствительными показателями, отражающими степень выраженности нарушений здоровья от воздействия вибрации [1, 7].

Открытие цитокинов и изучение их роли в патогенезе широкого круга заболеваний определили приоритеты их исследования при различной патологии, в том числе при профессиональных заболеваниях. Известно, что многие органы в норме находятся в состоянии «контролируемого воспаления», которое регулируется балансом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [10]. При нарушении цитокинового баланса развивается состояние хронического воспаления. В последние годы экспериментальными и клиническими исследованиями установлено, что один из механизмов выживания клетки в экстремальных условиях связан с БТШ, которые играют важную роль в регуляции внутриклеточной сигнализации, организации межклеточных взаимодействий при воспалении, развитии патофизиологических феноменов окислительного стресса при действии различных ксенобиотиков и др. [6, 9]. Повышение экспрессии БТШ внутри клетки обеспечивает стабилизацию и восстановление поврежденных белковых молекул,

оптимальный баланс между синтезом и деградацией белков. Это приводит к повышению резистентности клеток к стрессу. Вместе с тем БТШ могут высвобождаться во внеклеточную среду или экспрессироваться на поверхности клеток, и в этом случае их особая протективная роль заключается в контроле воспалительного иммунного ответа [11]. Появление в организме внеклеточных БТШ рассматривается многими авторами как сигнал тревоги для иммунной системы [13].

Цель работы — оценить изменения в содержании про- и противовоспалительных цитокинов, внеклеточного БТШ70 и их взаимосвязь у пациентов с вибрационной болезнью.

Материалы и методы

В иммунологическое исследование включено 43 пациента мужского пола с диагнозом ВБ. Клиническая верификация диагнозов осуществлялась врачами клиники института в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Стаж работы обследованных пациентов в условиях воздействия локальной вибрации составил $29,1 \pm 0,21$ года, средний возраст — $51,9 \pm 1,6$ года. Контрольную группу составили 19 условно здоровых мужчин, сопоставимых по возрасту ($50,0 \pm 1,83$ лет) и общему трудовому стажу ($26,06 \pm 0,8$ лет), не имеющих в профессиональном маршруте контакта с производственной вибрацией.

Кровь для исследования у пациентов брали однократно при поступлении в стационар, натощак до проведения лечения, используя пробирки Vacutainer, которые центрифугировали при 1500 оборотов в минуту в течение 15 минут для получения сыворотки. Сыворотку отбирали в отдельные пробирки Эппендорф (Eppendorf). Содержание цитокинов (IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF α) определяли на высокоскоростном автоматиче-

ском иммуноферментном анализаторе третьего поколения Alisei Q.S. (SEAC, Италия) с использованием стандартных тест-систем производства АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Концентрацию БТШ70 в сыворотке крови определяли методом ИФА с использованием ELISA kits HSP70 Assay Design (Enzo LifeScience, США) в соответствии с прилагаемой к набору методикой.

Статистический анализ данных проведен с помощью Statistica 6.0. Проверку на нормальность распределения фактических данных проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Оценка значимости различий между группами проводили с помощью непараметрических критериев (Манна–Уитни). Данные представлены в виде $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$, где Me – медиана, $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ – интерквартильный интервал 25 и 75. Для определения взаимного влияния показателей использовали корреляционный анализ Спирмена r . Рассчитывали показатель достоверности (p), который определяли как статистически значимый при значениях $p < 0,05$.

Работа не ущемляет права и не подвергает опасности благополучия обследованных пациентов в соответствии с требованиями биомедицинской этики, утвержденными Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Протокол исследований согласован с этическим комитетом (протокол № 6 от 15.11.2012 г.). Исследования выполнены с согласия пациентов в клинике института.

Результаты и обсуждение

Результаты изменений в содержании цитокинов представлены в таблице 1.

В результате анализа исследуемых показателей установлено, что содержание провоспалительного ИЛ-1 β в сыворотке крови у пациентов с ВБ снижалось в 162 раза по сравнению с контрольной группой ($p = 0,04$). Вместе с тем наблюдалось повышение (в 4,45 раза) другого провоспалительного ИЛ-8 относительно контроля ($p = 0,02$). Исследователями показано [8], что быстрый выброс ИЛ-8 нейтрофильными гранулоцитами может вести к запуску нового синтеза ИЛ-8, замыкая петлю положительной обратной связи в регуляции синтеза ИЛ-8, активации его функциональных свойств и блокирования апоптоза гранулоцитов. Этот механизм может иметь значение в поддержании хронического воспаления в тканях при целом ряде заболеваний у человека, в том числе и при ВБ.

При анализе изменения сывороточной концентрации ИЛ-10, имеющего противовоспалительную направленность, у пациентов с ВБ выявлено достоверное снижение его в 645 раз относительно контроля ($p = 0,001$). Следует отметить, что противовоспалительный ИЛ-10 одним из первых выделяется регуляторными клетками в очаге воспаления и является основным стрессорным цитокином, опосредующим многие иммунорегуляторные эффекты БТШ [3].

Что касается БТШ70, то в наших исследованиях у пациентов с ВБ установлено достоверное снижение внеклеточной концентрации его до 0,07 (0,04-0,07) нг/мл против 0,12 (0,09-0,13) нг/мл в контроле ($p = 0,001$).

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ВБ ($Me, Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

TABLE 1. CONTENTS CYTOKINES IN THE BLOOD IN PATIENTS WITH VB ($Me, Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Пациенты с ВБ Patients with VB n = 43	Контрольная группа Control group n = 18
ИЛ-1 β , нг/мл IL-1 β , pg/ml	0,01 (0,01-3,35)*	1,62 (0,65-3,8)
ИЛ-8, нг/мл IL-8, pg/ml	7,04 (1,34-13,25)*	1,58 (0,68-2,9)
ИЛ-10, нг/мл IL-10, pg/ml	0,01 (0,01-3,18)*	6,40 (0,39-13,7)
ТНФа, нг/мл TNF α , pg/ml	0,01 (0,01-1,39)	0,01 (0,01-0,11)

Примечание. * – различия по сравнению с контрольной группой статистически значимы при $p < 0,05$.

Note. *, differences compared to the control group are statistically significant at $p < 0.05$.

В связи с этим представляло определенный интерес на следующем этапе исследований выявить взаимосвязь между содержанием БТШ70 и уровнем цитокинов у пациентов с ВБ. Корреляционный анализ позволил выявить зависимость между снижением внеклеточной концентрации БТШ70 и возрастанием уровня ИЛ-1 β ($r = -0,44$; $p = 0,008$), снижением уровня ИЛ-10 ($r = 0,39$; $p = 0,017$). Синтез БТШ в ответ на различные повреждающие факторы, в т. ч. воспалительные, является внутриклеточным защитным механизмом, предотвращающим повреждение клеток [9], путем активации синтеза и секреции провоспалительных цитокинов [14].

Анализ изменений цитокинового профиля у пациентов с ВБ позволил выявить его дисбаланс, характеризующийся снижением уровней ИЛ-1 β , ИЛ-10 и повышением ИЛ-8. Угнетение продукции ИЛ-1 β и ИЛ-10, возможно, является следствием сформировавшегося хронического процесса в организме обследованных пациентов. В то же время у пациентов выявлено снижение внеклеточного БТШ70, которое может быть обусловлено накоплением его внутри клетки или на ее поверхности [5]. Выявленные взаимоотношения между цитокинами и БТШ70 свидетельствуют о вовлеченности БТШ70 в иммунорегуляторные процессы при ВБ. Установленный факт подтверждается Евдониным А.Л. [5], который отмечал, что увеличение концентраций БТШ70 внутри клетки воздействует на продукцию цитокинов, которые в свою очередь вызывают неспецифическую активацию системы врожденного иммунитета.

При этом под воздействием БТШ увеличивается продукция противовоспалительных цитокинов не только в Т-лимфоцитах, но и в мононуклеарных клетках-моноцитах и дендритных клетках [12].

Выявленные изменения способствуют хронизации воспалительного процесса и обосновывают прогрессивное течение ВБ.

Список литературы / References

1. Антошина Л.И., Сааркоппель Л.М., Павловская Н.А. Действие вибрации на биохимические показатели, характеризующие окислительный метаболизм, иммунитет, обмен мышечной и соединительной ткани (Обзор литературы) // Медицина труда и промышленная экология, 2009. № 2. С. 33-37. [Antoshina L.I., Saarkoppel L.M., Pavlovskaya N.A. Influence of vibration on biochemical values characterizing oxidative metabolism, immunity, metabolism in muscular and connective tissues (Review of literature). *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya = Occupational Medicine and Industrial Ecology*, 2009, no. 2, pp. 33-37. (In Russ.)]
2. Антошина Л.И., Павловская Н.А., Яцына И.В. Информативные лабораторные биомаркеры для выявления негативного воздействия вибрации на организм рабочих // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. № 1. С. 19-23. [Antoshina L.I., Pavlovskaya N.A., Yatsina I.V. The informative laboratory biomarkers for detection of negative impact of vibration on organism of workers. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, no. 1, pp. 19-23. (In Russ.)]
3. Бобкова И.Н., Чеботарева Н.В., Козловская Л.В., Непринцева Н.В. Защитное действие белков теплового шока при заболеваниях почек // Клиническая нефрология, 2011. № 6. С. 59-66. [Bobkova I.N., Chebotareva N.V., Kozlovskaya L.V., Nieprintseva N.V. Protective effect of heat shock proteins in kidney diseases. *Klinicheskaya nefrologiya = Clinic of Nephrology*, 2011, no. 6, pp. 59-66. (In Russ.)]
4. Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И., Русанова Д.В. Роль цитокинов в развитии нарушений периферической нервной системы при вибрационной болезни // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 1. С. 58-63. [Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I., Rusanova D.V. Role of cytokines in developmental disorders peripheral nervous system in vibration induced diseases. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Immunological Journal*, 2017, Vol. 11, no. 1, pp. 58-63. (In Russ.)]
5. Евдонин А.Л., Медведева Н.Д. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции // Цитология, 2009. Т. 51, № 2. С. 130-137. [Evdonin A.L., Medvedeva N.D. The extracellular heat shock protein 70 and its functions. *Tsitologiya = Cytology*, 2009, Vol. 51, no. 2, pp. 130-137. (In Russ.)]
6. Кабалык М.А., Гельцер Б.И., Осипов А.Л., Фадеев М.Ф. Белки теплового шока – участники патогенеза остеоартроза // Казанский медицинский журнал, 2016. № 5. С. 624-630. [Kabalyk M.A., Geltser B.I., Osipov A.L., Fadeev M.F. Heat shock proteins – participants in osteoarthritis pathogenesis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2016, no. 5, pp. 624-630. (In Russ.)]
7. Курчевенко С.И., Бодиенкова Г.М. Донозологическая диагностика вибрационной болезни // Клиническая лабораторная диагностика, 2017. Т. 62, № 8. С. 482-485. [Kurchevenko S.I., Bodienkova G.M. The pre-nosologic diagnostic of vibration disease. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, Vol. 62, no. 8, pp. 482-485. (In Russ.)]
8. Миниакметова Р.Р., Симбирцев А.С., Аникин И.А., Котов А.Ю., Тырнова Е.В. Интерлейкин 1 и интерлейкин 8 при хроническом среднем отите с тимпаносклерозом // Цитокины и воспаление, 2010. Т. 9, № 4. С. 35-40. [Miniakhmetova R.R., Simbirtsev A.S., Anikin I.A., Kotov A.Yu., Tyrnova E.V. Interleukin 1 and interleukin 8 in chronic otitis media with tympanosclerosis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2010, Vol. 9, no. 4, pp. 35-40. (In Russ.)]
9. Михайлова Н.Н., Сазонтова Т.Г., Алехина Д.А., Казицкая А.С., Жданова Н.Н., Прокопьев Ю.А., Жукова А.Г. Особенности внутриклеточных защитных механизмов при действии на организм различных ксенобиотиков // Цитокины и воспаление, 2013. Т. 12, № 4. С. 71-75. [Mikhaylova N.N., Sazonova T.G., Alekhina D.A., Kazitskaya A.S., Zhdanova N.N., Prokopyev Yu.A., Zhukova A.G. Features of intracellular protective mechanisms under the action of various xenobiotics on the body. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, Vol. 12, no. 4, pp. 71-75. (In Russ.)]
10. Секачева М.И., Буеверов А.О. Терапевтические возможности влияния на баланс цитокинов при заболеваниях кишечника и печени // Русский медицинский журнал, 2010. № 5. С. 40. [Sekacheva M.I., Bueverov A.O. Therapeutic possibilities of influencing the balance of cytokines in diseases of the intestine and liver. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*, 2010, no. 5, p. 40. (In Russ.)]
11. Basu S., Binder R., Suto R., Anderson K.M., Srivastava P.K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, with deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NFκB pathway. *Int. Immunol.*, 2000, Vol. 12, no 7, pp. 1539-1546.
12. Detanico T., Rodrigues L., Sabritto A.C., Keisermann M., Bauer M.E., Zwickey H., Bonorino C. Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, Vol. 135, no. 6, pp. 336-342.
13. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 2002, Vol. 296, no. 4, pp. 301-305.
14. Wang Y., Kelly C.C., Singh M., McGowan E.A., Carrara A.S., Bergmeier L.A., Lehner T. Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 5, pp. 2422-2429.

Авторы:

Бодиенкова Г.М. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Россия

Курчевенко С.И. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Россия

Authors:

Bodienkova G.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunobiochemical and Molecular Genetic Studies in Hygiene, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Russian Federation

Kurchevenko S.I., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Immunobiochemical and Molecular Genetic Studies in Hygiene, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Russian Federation

Поступила 09.02.2018
Принята к печати 16.02.2018

Received 09.02.2018
Accepted 16.02.2018

ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ДЕТЕЙ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ СТРОНЦИЕМ

Отавина Е.А., Долгих О.В., Старкова К.Г., Казакова О.А.,
Мазунина А.А.

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Резюме. Состояние иммунной системы может служить приоритетным индикаторным показателем адаптационных возможностей организма в условиях повышенной внешнесредовой химической нагрузки, в том числе и связанной с экспозицией металлами, которые в зависимости от условий воздействия способны оказывать как активирующее, так и угнетающее воздействие на параметры иммунной регуляции. Цель работы — анализ иммунорегуляторных маркеров у детского населения при употреблении питьевой воды с повышенным содержанием стронция (на примере Пермского края). Проведено иммунологическое обследование детей в возрасте от 7 до 12 лет, которые постоянно проживают на территории с повышенным содержанием стронция в воде хозяйственно-бытового водоснабжения. Группу сравнения составили дети из «условно чистого» района. Исследовали особенности изменения клеточного звена иммунитета (фагоцитоз), гуморальные факторы иммунной защиты (иммуноглобулины), формирование специфической сенсибилизации к стронцию, а также процессы запуска и регуляции апоптоза. Показано, что при повышенном в 3,68 раза уровне стронция в водопроводной воде на территории наблюдения среднее содержание стронция в крови детей группы наблюдения было в 1,55 раза выше, чем у детей в группе сравнения. При этом выявлено возрастание фагоцитарной активности по критериям фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса, в среднем в 1,2 раза относительно группы сравнения. У 80,0% обследованных отмечено снижение содержания сывороточных иммуноглобулинов по критерию IgG по сравнению с показателями физиологической нормы, а также достоверное снижение продукции IgG и повышение IgM относительно уровней в группе сравнения. Показано возрастание общей сенсибилизации у 55,0% детей группы наблюдения по содержанию IgE общего по сравнению с возрастной нормой и превышение референтного уровня специфической сенсибилизации к стронцию по критерию IgG в среднем в 2,49 раза. Выявлено нарушение процесса запуска апоптоза, связанное с уменьшением количества CD95⁺ лимфоцитов и TNFRI⁺ клеток (кратность снижения в 2,78 раза относительно нормы), смещение баланса апоптогенных белков при снижении экспрессии Bcl-2 в среднем в 2,57 раза, а также уменьшение экспрессии транскрипционного фактора p53 в 2,83 раза относительно референтного интервала. Таким образом, показана способность стронция влиять на важнейшие показатели иммунной регуляции у детского населения при повышенном содержании металла в источниках питьевого водоснабжения. Указанные изменения могут служить в качестве индикаторных параметров состояния здоровья населения в условиях внешнесредовой экспозиции стронцием.

Ключевые слова: иммунная регуляция, фагоцитоз, иммуноглобулины, маркеры гиперчувствительности, апоптоз, стронций

Адрес для переписки:

Долгих Олег Владимирович
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
614045, Россия, г. Пермь, ул. Монастырская, 82.
Тел.: 8 (342) 236-39-30.
Факс: 8 (342) 237-25-34.
E-mail: oleg@fcrisk.ru

Address for correspondence:

Dolgikh Oleg V.
Federal Research Center for Medical and Preventive Health
Risk Management Technologies
614045, Russian Federation, Perm, Monastyrskaya str., 82.
Phone: 7 (342) 236-39-30.
Fax: 7 (342) 237-25-34.
E-mail: oleg@fcrisk.ru

Образец цитирования:

Е.А. Отавина, О.В. Долгих, К.Г. Старкова, О.А. Казакова, А.А. Мазунина «Изменение иммунорегуляторных показателей у детей, экспонированных стронцием» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 899-904.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-899-904

© Отавина Е.А. и соавт., 2018

For citation:

E.A. Otavina, O.V. Dolgikh, K.G. Starkova, O.A. Kazakova, A.A. Mazunina "Changes of immunoregulatory indexes in children exposed to strontium", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 899-904. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-899-904

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-899-904

CHANGES OF IMMUNOREGULATORY INDEXES IN CHILDREN EXPOSED TO STRONTIUM

Otavina E.A., Dolgikh O.V., Starkova K.G., Kazakova O.A.,
Mazunina A.A.

Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Abstract. Evaluation of the immune system parameters can be used in order to assess capacity to adapt under conditions of increased external chemical load, including exposure to metals, which can exert either activating and inhibitory effects upon immune regulation parameters. The aim of this work was the analysis of immunoregulatory markers in a children's population who consumed water with high strontium content (a sample from the Perm region). We carried out immunological evaluation of the children aged 7 to 12 years, living at a territory with a high strontium content in the drinking water. The comparison group included children from the conventionally clean region. We studied differential changes in cellular immunity (phagocytosis rates), humoral factors of immune defense (serum immunoglobulins), development of specific sensitization for strontium, as well as the processes of apoptosis triggering and regulation. A 3.68-fold increase in strontium levels was shown in fresh water within observation area, and the average blood strontium content in the children of appropriate observation group was 1.55-fold higher than in children of the comparison group. At the same time, 1.2-fold increase in phagocytic activity determined as phagocytic number and phagocytic index was found, as compared to the control group. In 80% of the subjects, a reduction in serum IgG level was observed when compared to physiological norm, as well as a significant decrease in IgG and enhance in IgM production against the levels found in the comparison group. We have also shown an enhanced total sensitization in 55.0% of the observation group as shown by the total IgE test compared with normal age ranges, as well as excessive specific sensitization to strontium by 2.49 times, according to the IgG criterion. Disturbance in apoptosis triggering was associated with decreased number of CD95⁺ lymphocytes and TNFR1⁺ cells (2.8-fold compared to reference values), shifted balance in apoptogenic proteins, an average of 2.6-fold decrease in Bcl-2 expression, a 2.8-fold reduction of the p53 transcription factor expression relative to the reference interval. Thus, we have shown an ability of strontium excess in drinking water to influence the most important indices of immune regulation in pediatric population. These changes may serve as indices of populational health status under of external strontium exposure.

Keywords: immune regulation, phagocytosis, immunoglobulins, hypersensitivity markers, apoptosis, strontium

Введение

Изменение активности иммунной системы, важнейшей составляющей поддержания гомеостаза, участвующей в контроле многих физиологических процессов, в том числе гиперчувствительности, может служить приоритетным индикаторным показателем адаптационных возможностей организма в условиях повышенной внешнесредовой химической нагрузки, особенно у детского населения [2, 3, 7, 11]. Использование современных диагностических иммунологических технологий позволяет провести объективную и достоверную оценку иммунного ответа у населения в условиях повышенной нагрузки

химическими факторами, в том числе природного происхождения.

Проблема повышенного содержания металлов в среде обитания как за счет источников естественного происхождения, так и в условиях техногенного загрязнения, в том числе и стронция, определяет необходимость проведения научно-исследовательских работ по выявлению особенностей адаптации населения к измененным условиям среды, особенно учитывая их способность воздействовать на функциональную активность иммунной системы [1, 4, 8, 9].

Цель работы — анализ иммунорегуляторных маркеров у детского населения при употреблении питьевой воды с повышенным содержанием стронция (на примере Пермского края).

Материалы и методы

Проведено иммунологическое обследование детей в возрасте от 7 до 12 лет (средний возраст $9,2 \pm 0,20$ лет), которые постоянно проживают на территории с повышенным содержанием стронция в воде хозяйственно-бытового водоснабжения. Группу сравнения составили дети (средний возраст $8,6 \pm 0,20$ лет) из «условно чистого» района. Группы были сопоставимы по возрасту, полу и соматической заболеваемости.

Популяции и субпопуляции лимфоцитов изучали на проточном цитометре FACSCalibur фирмы Becton Dickinson (США) с использованием универсальной программы CellQuestPro, а также определяли маркеры апоптоза – рецептор к фактору некроза опухоли $\text{TNF}\alpha$ (TNFR1^+), белки p53, Вах, Bcl-2, используя панели меченых моноклональных антител, при этом суммарно регистрировали не менее 10000 событий. Исследование гиперчувствительности по критерию IgG, специфического к стронцию, осуществля-

ли методом аллергосорбентного тестирования, оценку фагоцитарной активности лейкоцитов с помощью формализированных эритроцитов барана; сывороточные иммуноглобулины IgG, IgA, IgM методом радиальной иммунодиффузии по Манчини; IgE общий, интерлейкины IL-10, IL-17 с использованием тест-систем для иммуноферментного анализа на анализаторе “E1x808IU” (BioTek, США). Измерение содержания стронция в пробах крови выполняли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на масс-спектрометре Agilent 7500cx (Agilent Technologies Inc., США). Анализ химических соединений в водопроводной воде проводили в соответствии с НСАМ № 480-Х «Определение элементного состава природных и питьевых вод методом ICP-MS» (2006).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью описательной статистики в программе Statistica 6.0 (StatSoft, США) с расчетом среднего арифметического (М) и стандартной ошибки среднего (m), а также двухвыборочного

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОЙ РЕГУЛЯЦИИ У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТРОНЦИЕМ (n = 40)

TABLE 1. THE CHANGE OF IMMUNE REGULATION PARAMETERS IN CHILDREN UNDER STRONTIUM EXPOSURE (n = 40)

Показатель Index	Группа наблюдения Observation group	Группа сравнения Comparison group
Абсолютный фагоцитоз, $10^9/\text{л}$ Absolute phagocytosis, $10^9/\text{l}$	$1,86 \pm 0,119$	$1,752 \pm 0,099$
Фагоцитарное число, у. е. Phagocytic number, с. u.	$0,90 \pm 0,044^*$	$0,765 \pm 0,039$
Фагоцитарный индекс, у. е. Phagocytic index, с. u.	$1,86 \pm 0,039^*$	$1,589 \pm 0,041$
IgG, г/л IgG, g/l	$10,29 \pm 0,229^* \text{ **}$	$11,0 \pm 0,274$
IgM, г/л IgM, g/l	$1,54 \pm 0,055^*$	$1,35 \pm 0,039$
IgA, г/л IgA, g/l	$1,35 \pm 0,051$	$1,37 \pm 0,061$
IgE общий, МЕ/мл IgE total, IU/ml	$272,2 \pm 56,52^{**}$	$499,0 \pm 95,22$
IgG специфический к стронцию, у. е. IgG specific to strontium, с. u.	$0,249 \pm 0,040^{**}$	$0,14 \pm 0,052$
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	$1,399 \pm 0,171^*$	$3,574 \pm 0,491$
IL-17, пг/мл IL-17, pg/ml	$0,965 \pm 0,122^*$	$2,78 \pm 0,727$

Примечание. * – различие достоверно относительно группы сравнения ($p < 0,05$); ** – различие достоверно относительно референтного интервала ($p < 0,05$).

Note. *, the difference is reliable relative to the comparison group ($p < 0.05$); **, the difference is reliable relative to the reference interval ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 2. ИЗМЕНЕНИЕ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТРОНЦИЕМ (n = 15)

TABLE 2. THE CHANGE OF APOPTOSIS MARKERS IN CHILDREN UNDER STRONTIUM EXPOSURE (n = 15)

Показатель Index	Референтный интервал Reference interval	Группа наблюдения Observation group
CD3 ⁺ CD95 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD95 ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /l	0,4-0,7	0,159±0,025* **
CD3 ⁺ CD95 ⁺ лимфоциты, % CD3 ⁺ CD95 ⁺ lymphocytes, %	15,0-25,0	7,2±1,15* **
Bax, %	5,0-9,0	6,753±1,224
Bcl-2, %	1,0-1,5	0,389±0,065*
TNFR1 ⁺ , %	1,0-1,5	0,36±0,077*
p53, %	1,2-1,8	0,424±0,201*

Примечание. * – различие достоверно относительно референтного интервала ($p < 0,05$); ** – различие достоверно относительно группы сравнения ($p < 0,05$).

Note. *, the difference is reliable relative to the reference interval ($p < 0.05$); **, the difference is reliable relative to the comparison group ($p < 0.05$).

t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Сравнительная оценка содержания химических веществ в водопроводной воде на исследуемых территориях установила достоверное повышение содержания стронция на территории наблюдения в 3,68 раза по средним значениям полугодовых наблюдений (территория наблюдения $0,604 \pm 0,041$ мг/л, территория сравнения $0,164 \pm 0,063$ мг/л, $p < 0,05$). В то же время химико-аналитическое исследование выявило, что среднее содержание стронция в крови детей группы наблюдения было в 1,55 раза выше, чем у детей в группе сравнения (группа наблюдения $0,059 \pm 0,022$ мкг/мл, группа сравнения $0,038 \pm 0,004$ мкг/мл).

Проведенное клинико-лабораторное исследование показало, что в основной группе обследованных детей повышена активность со стороны врожденного клеточного иммунитета (табл. 1). В частности, у 55,0% детей наблюдается стимуляция фагоцитарного звена по критерию фагоцитарного числа и у 77,5% — по критерию фагоцитарного индекса, в среднем в 1,2 раза относительно группы сравнения ($p < 0,05$).

Одновременно у 80,0% обследованных отмечено снижение содержания сывороточных иммуноглобулинов по критерию IgG по сравнению с показателями физиологической нормы

($p < 0,05$). Кроме того, выявлено достоверное снижение продукции IgG и повышение IgM относительно уровней в группе сравнения. В то же время показано возрастание общей сенсибилизации у 55,0% детей группы наблюдения по содержанию IgE общего по сравнению с возрастной нормой ($p < 0,05$). Наблюдалось превышение референтного уровня специфической сенсибилизации к стронцию по критерию IgG в среднем в 2,49 раза ($p < 0,05$), причем содержание специфических антител к стронцию у детского контингента основной группы превышало данный показатель в контрольной группе в 1,78 раза.

При исследовании особенностей межклеточной иммунной регуляции отмечено смещение баланса цитокиновых медиаторов с про- и противовоспалительным действием, в частности достоверное снижение продукции IL-10 и IL-17 относительно уровней в группе сравнения в 2,55 и 2,88 раза соответственно ($p < 0,05$).

Большинство параметров CD-иммунограммы соответствовало референтному диапазону, за исключением выявленного достоверного снижения активационного маркера CD95 (табл. 2) по абсолютному и относительному показателю ($p < 0,05$). Причем значение данного маркера в основной группе было ниже значения группы сравнения в 1,57 раза ($p < 0,05$). В то же время отмечены негативные тенденции в регуляции клеточного гомеостаза по маркерам апоптоза, когда, наряду с нарушением процесса запуска апоптоза

при уменьшении количества CD95⁺ лимфоцитов и TNFRI⁺ клеток (кратность снижения в 2,78 раза относительно нормы), наблюдалось нарушение баланса апоптогенных белков Вах и Bcl-2, связанное со снижением экспрессии Bcl-2 в среднем в 2,57 раза, а также уменьшение экспрессии транскрипционного фактора p53 в 2,83 раза относительно референтного интервала ($p < 0,05$).

Заключение

Результаты исследований иммунной регуляции у детского населения, проживающего в условиях внешнесредового воздействия стронция, выявили изменения иммунной реактивности, гиперчувствительности и апоптоза, которые проявились:

- 1) повышением активности фагоцитарного звена иммунитета по критерию фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса;
- 2) снижением продукции сывороточных иммуноглобулинов IgG и повышением IgM, возрас-

танием уровня специфических антител к стронцию по критерию IgG;

3) угнетением содержания активационного маркера CD95, TNFRI, а также регуляторных белков апоптоза Bcl-2 и p53.

Таким образом, показана способность стронция влиять на важнейшие показатели иммунной регуляции у детского населения при повышенном содержании металла в источниках питьевого водоснабжения. Данные литературы также подтверждают возможность функциональных изменений иммунной реактивности под воздействием стронция [5, 6, 10]. В нашем исследовании у обследованной группы детского населения выявлены существенные сдвиги параметров как гуморального, так и клеточного звена иммунитета на фоне повышения специфической сенсibilизации к металлу, а также нарушение процесса запуска и регуляции апоптоза. Указанные изменения могут служить в качестве индикаторных параметров состояния здоровья населения в условиях внешнесредовой экспозиции стронцием.

Список литературы / References

1. Дианова Д.Г., Вдовина Н.А., Пирогова Е.А., Рочев В.П. Количественная оценка биомаркеров апоптоза и клеточной регуляции у детей с повышенным содержанием стронция в организме // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 2 (1). С. 129-131. [Dianova D.G., Vdovina N.A., Pirogova E.A., Rochev V.P. Quantitative evaluation of biomarkers of the apoptosis and cell regulation in children having high concentration of strontium in a body. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 2 (1), pp. 129-131. (In Russ.)]
2. Засорин Б.В., Курмангалиев О.М., Ермуханова Л.С. Особенности иммунного статуса у населения урбанизированных территорий с повышенным содержанием тяжелых металлов // Гигиена и санитария, 2012. № 3. С. 17-19. [Zasorin B.V., Kurmangaliev O.M., Ermukhanova L.S. Features of the immune status in the population of urban areas with a high content of heavy metals. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2012, no. 3, pp. 17-19. (In Russ.)]
3. Ланин Д.В., Зайцева Н.В., Землянова М.А., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Характеристика регуляторных систем у детей при воздействии химических факторов среды обитания // Гигиена и санитария, 2014. Т. 93, № 2. С. 23-26. [Lanin D.V., Zaytseva N.V., Zemlyanova M.A., Dolgikh O.V., Dianova D.G. Characteristics of regulatory system in children exposed to the environmental chemical factors. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2014, Vol. 93, no. 2, pp. 23-26. (In Russ.)]
4. Старкова К.Г., Долгих О.В., Вдовина Н.А., Отавина Е.А. Особенности иммунных и эндокринных регуляторных показателей у детей в условиях хронической экспозиции стронцием // Здоровье населения и среда обитания, 2015. № 12. С. 41-44. [Starkova K.G., Dolgikh O.V., Vdovina N.A., Otavina E.A. Features of changes in immune and endocrine regulatory indicators at chronic exposure to strontium in children. *Zdorovye naseleniya i sreda obitaniya = Public Health and Environment*, 2015, no. 12, pp. 41-44. (In Russ.)]
5. Berksoy Hayta S., Durmuş K., Altuntaş E.E., Yildiz E., Hisarciklio M., Akyol M. The reduction in inflammation and impairment in wound healing by using strontium chloride hexahydrate. *Cutan. Ocul. Toxicol.*, 2018, Vol. 37, no. 1, pp. 24-28.
6. Buache E., Velard F., Bauden E., Guillaume C., Jallot E., Nedelec J.M., Laurent-Maquin D., Laquerriere P. Effect of strontium-substituted biphasic calcium phosphate on inflammatory mediators production by human monocytes. *Acta Biomater.*, 2012, Vol. 8, no. 8, pp. 3113-3119.

7. Duramad P, Holland N.T. Biomarkers of immunotoxicity for environmental and public health research. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 2011, Vol. 8, no. 5, pp. 1388-1401.
8. Lehmann I., Sack U., Lehmann J. Metal ions affecting the immune system. *Met. Ions Life Sci.*, 2011, Vol. 8, pp. 157-185.
9. McKee A.S., Fontenot A.P. Interplay of innate and adaptive immunity in metal-induced hypersensitivity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2016, Vol. 42, pp. 25-30.
10. Topal F, Yonem O., Tuzcu N., Tuzcu M. Ataseven H., Akyol M. Strontium chloride: can it be a new treatment option for ulcerative colitis? *Biomed. Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 530687. doi: 10.1155/2014/530687.
11. Yang S.N., Hsieh C.C., Kuo H.F., Lee M.S., Huang M.Y., Kuo C.H., Hung C.H. The effects of environmental toxins on allergic inflammation. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2014, Vol. 6, no. 6, pp. 478-484.

Авторы:

Отавина Е.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Долгих О.В. — д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Старкова К.Г. — к.б.н., заведующая лабораторией иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Казакова О.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Мазунина А.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Authors:

Otavina E.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology and Allergology, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Dolgikh O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunobiological Diagnostic Methods, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Starkova K.G., PhD (Biology), Head, Laboratory of Immunology and Allergology, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Kazakova O.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunogenetics, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Mazinina A.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunogenetics, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Поступила 14.02.2018
Принята к печати 06.03.2018

Received 14.02.2018
Accepted 06.03.2018

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ С КЛИНИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

Лебеденко А.А.¹, Шкурят Т.П.², Машкина Е.В.², Семерник О.Е.¹,
Дрейзина Т.К.², Тюрина Е.Б.¹

¹ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия

² ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. В рамках данного исследования проведено изучение ассоциации различных полиморфных вариантов генов металлопротеиназ с клиническими проявлениями бронхиальной астмы у детей.

Были обследованы 103 пациента, среди которых 42 ребенка с установленным диагнозом «бронхиальная астма» и 61 человек контрольной группы. Всем пациентам проведено генетическое исследование методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции. Анализировали полиморфные локусы генов *MMP20 320A>C*, *MMP20 Val275Ala* и *-8202A>G* гена *MMP9*.

Установлено, что среди больных 30 (71,43%) человек имели бронхиальную астму легкой степени тяжести, 9 (21,43%) детей со среднетяжелым течением и 3 (7,14%) человека с тяжелым течением заболевания. Установлено, что среди детей, страдающих бронхиальной астмой, наиболее часто регистрируется гомозиготный вариант *C/C* полиморфизма гена *MMP20 320A>C*, гетерозиготный вариант полиморфизма *Val275Ala* гена *MMP20* и гетерозиготный вариант полиморфного локуса *-8202A>G* гена *MMP9*. При этом в целом отмечено, что частоты исследуемых аллелей и генотипов среди больных детей не имеют статистически значимых отличий от контрольной группы ($p > 0,05$). Однако у пациентов с генотипом *GG* по полиморфизму *-8202A>G* гена *MMP9* и являющихся гомозиготами по *C*-аллелю полиморфизма *320A>C* гена *MMP20* наблюдается более тяжелое течение заболевания, сопряженное с поливалентной сенсибилизацией и повышенным уровнем общего IgE в сыворотке крови.

Частоты аллелей и генотипов среди больных бронхиальной астмой не имеют статистически значимых отличий от группы здоровых пациентов. При этом к более тяжелому клиническому течению заболевания предрасположены пациенты, являющиеся гомозиготами по *G*-аллелю полиморфизма *-8202A>G* гена *MMP9* и гомозиготами по *C*-аллелю гена *MMP20 (320A>C)*.

Ключевые слова: бронхиальная астма, генетика, дети, диагностика, металлопротеиназы, полиморфизм гена

Адрес для переписки:

Семерник Ольга Евгеньевна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Пушкинская,
176-18.
Тел.: 8 (918) 569-26-81.
E-mail: semernick@mail.ru

Address for correspondence:

Semernik Olga E.
Rostov State Medical University
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don,
Pushkinskaya str., 176, apt 18.
Phone: 7 (918) 569-26-81.
E-mail: semernick@mail.ru

Образец цитирования:

А.А. Лебеденко, Т.П. Шкурят, Е.В. Машкина,
О.Е. Семерник, Т.К. Дрейзина, Е.Б. Тюрина
«Ассоциация полиморфных вариантов генов
матриксных металлопротеиназ с клиническими
проявлениями бронхиальной астмы у детей»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6.
С. 905–912. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-905-912
© Лебеденко А.А. и соавт., 2018

For citation:

A.A. Lebedenko, T.P. Shkurat, E.V. Mashkina,
O.E. Semernik, T.K. Dreyzina, E.B. Tyurina "Association
of matrix metalloproteinases gene polymorphism with clinical
manifestations of bronchial asthma in children", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,
Vol. 20, no. 6, pp. 905–912.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-905-912
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-905-912

ASSOCIATION OF MATRIX METALLOPROTEINASES GENE POLYMORPHISM WITH CLINICAL MANIFESTATIONS OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN

Lebedenko A.A.^a, Shkurat T.P.^b, Mashkina E.V.^b, Semernik O.E.^a, Dreyzina T.K.^b, Tyurina E.B.^a

^a Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

^b Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. In the present study, we have examined association between different polymorphic variants of metalloproteinases genes and clinical manifestations of bronchial asthma in children.

We observed 103 patients including 42 children with an established diagnosis of asthma. Moreover, 61 persons were examined in the control group. All patients underwent genetic testing by allele-specific polymerase chain reaction. In particular, *320A>C* polymorphic locus of *MMP20* gene; *Val275Ala* *MMP20*, and *-820A>G* gene *MMP9* were analyzed.

We have found that 30 patients (71.4% of total) had bronchial asthma of mild severity, 9 children (21.4%) exhibited moderate degree, and 3 patients (7%) had severe-grade disease. Homozygous *C/C* variant of the polymorphic *MMP20* gene, *320A>C* heterozygous variant of the *MMP20 Val275Ala* polymorphism, and heterozygous locus of *-820A>G* *MMP9* gene were found to be most frequent among the children with asthma. Generally, we have observed that the frequencies of the studied alleles and genotypes did not significantly differ between the asthma patients and children from the control group ($p < 0.05$). However, in patients with *GG*-genotype of *-820A>G* *MMP9* polymorphism combined with homozygosity for the *C* allele of *MMP20 320A>C*, a more severe disease was observed, being combined with polyvalent sensitization and high total IgE levels in blood serum.

In conclusion, frequencies of alleles and genotypes among patients with asthma did not show any statistically significant differences from the group of healthy children. The patients homozygous for *G* allele of *MMP9 -820A>G* polymorphism gene and for the *C* allele *MMP20* gene (*320A>C*) seem to be predisposed for a more severe clinical course of the disease.

Keywords: asthma, genetics, children, diagnostics, metalloproteinase, gene polymorphism

Введение

Бронхиальная астма (БА) является одной из социально значимых проблем современной педиатрии [1]. Значительная распространенность заболевания и тяжесть его клинических проявлений диктует необходимость всестороннего изучения патогенетических механизмов, лежащих в его основе [2, 3]. Известно, что нарушения проходимости дыхательных путей, возникающие при обострении заболевания, создают препятствие для движения воздуха, а следовательно, требуют не только дополнительных усилий при дыхательном маневре, но и через какой-то промежуток времени запускают механизмы ремоделирования в бронхолегочной системе. Важную роль в данном процессе играют матриксные металлопротеиназы (ММП), основная функция которых связана с обменом белков межклеточного матрикса. Являясь цитокиновыми протеиназами, они

оказывают влияние на морфогенез, резорбцию, миграцию, адгезию и пролиферацию различных клеток и тканей. В настоящее время выделено 5 основных подсемейств ММП: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины и мембранно-связанные протеиназы [4]. Наибольший клинический интерес представляет изучение ММП-9 и ММП-20 у детей, страдающих БА.

ММП-9, или желатиназа В, относится ко второму подсемейству матриксинов и представляет собой коллагеназу IV типа. Впервые она была обнаружена в нейтрофилах и макрофагах, но также определяется в фибробластах и Т-лимфоцитах на фоне их стимуляции цитокинами. Особенностью данного фермента является то, что он интенсивно гидролизует желатины (из различных типов коллагенов), ряд белков соединительнотканного матрикса (в том числе энтактин, коллаген VI, V и XI типов, активирующий пептид соединительной ткани III, эластин, а также IL-8,

пластиночный фактор-4, субстанцию Р, амилоидный пептид Р), способствуя тем самым ремоделированию тканей [5]. В зависимости от места расщепления этих молекул ММП-9 может понижать или повышать их биологическую активность [6]. Так как коллаген IV формирует базальную пластину, а коллаген V — интерстициальную ткань, активация ММП-9 в периоде обострения заболевания приводит к деструкции тканей бронхов. При этом исследованиями Протасова М.В. и соавт. (2008) показано, что дезорганизации тканей также способствует избыточная активация нейтрофилов, секретирующих ММП-9 [4]. Помимо этого, ММП-9 оказывает цитостатическое влияние на фибробласты, способствуя тем самым антагонизму между процессами острого воспаления и репаративного гистогенеза. ММП-20 (энамелизин) также задействована в процессах ремоделирования тканей и относится к секретируемым матриксным металлопротеиназам, однако ее функции до конца не изучены. Важно отметить, что в обычных условиях данные ферменты содержатся в тканях в незначительных количествах и их продукция контролируется на уровне транскрипции и посттранскелюлярном уровне [7, 8, 9]. В связи с этим можно предположить, что в процессах регуляции ремоделирования бронхолегочной системы, инициированных данными ферментами, и проявлениях заболевания немаловажную роль играют генетические факторы. Поэтому изучение ассоциации различных полиморфных вариантов генов ММП с клиническими проявлениями у детей, страдающих БА, представляет большой практический интерес.

Материалы и методы

В рамках данного исследования на базе педиатрического отделения клиники Ростовского государственного медицинского университета были обследованы 103 пациента, среди которых 42 ребенка с установленным диагнозом БА и 61 человек контрольной группы I и IIа групп здоровья соответствующего пола и возраста. Средний возраст обследованных пациентов составил $11,0 \pm 0,73$ лет. Диагноз БА был верифицирован согласно Национальной программе «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактики», 2017 [10]. Для изучения клинических особенностей БА больные были разделены на 3 группы: 1 группа — 30 (71,43%) человек, имеющих БА легкой степени тяжести, 2 группа — 9 (21,43%) детей со среднетяжелым течением и 3 (7,14%) больных с тяжелым течением заболевания.

Критерии включения: наличие подтвержденного диагноза БА, поставленного не ранее чем за 6 месяцев до обследования пациентов; отсутствие сопутствующей хронической патологии со стороны других органов и систем.

Критерии исключения: больные с неуточненным диагнозом БА; больные БА с другими хроническими и острыми заболеваниями легких (туберкулез, острый трахеобронхит, пневмония и др.); возраст пациентов старше 18 лет.

Всем пациентам проведено комплексное клинико-лабораторное исследование, включающее сбор анамнестических данных, физикальный осмотр, определение общего и аллергенспецифических IgE, а также исследование функции внешнего дыхания с применением пикфлоуметрии, спирографии и бодиплетизмографии. Все исследования выполнены по стандартным методикам.

Для генетического исследования использовали образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови детей термокоагуляционным методом с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (Литех, Россия). Определение полиморфных вариантов исследуемых генов проводили методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с использованием наборов реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия). Анализировались полиморфные локусы генов *MMP20 320A>C*, *MMP20Val275AlaC* и *-8202A>G* гена *MMP9*.

Этическая экспертиза

Исследование проводили с соблюдением всех этических норм. От всех родителей детей и подростков старше 15 лет было получено информированное письменное согласие на участие в исследовании, одобренное Локальным этическим комитетом Ростовского государственного медицинского университета.

Математическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2003, Statistica 6.0 for Windows. Частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов, соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга (χ^2) определяли по стандартным формулам [11]. Достоверность различий в распределении частот аллелей и генотипов между группами больных и здоровых лиц оценивали в соответствии с критерием χ^2 . Ассоциацию определенных генотипов изученных генов с развитием БА выявляли, сравнивая выборки больных и здоровых индивидов по частоте одного признака, с использованием критерия χ^2 . Статистически значимыми считали

различия при $p < 0,05$. Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов (OR).

Результаты

Анализ результатов проведенного исследования установил, что у всех обследованных пациентов была atopическая форма БА. Средняя продолжительность заболевания составила $5,50 \pm 0,83$ года. Подавляющее большинство детей получали базисную терапию (88,09%). При этом среднее количество обострений заболевания, перенесенных больными за год, составило $2,68 \pm 0,25$. Однако необходимо отметить, что многие пациенты имели сопутствующую аллергопатологию: аллергический ринит (95,24%), atopический дерматит (42,86%), крапивницу (11,90%), пищевую (14,29%) и лекарственную (9,52%) аллергию. Поливалентная сенсибилизация играла значимую роль во всех группах обследованных пациентов, но у детей дошкольного возраста превалировала аллергическая реакция на пищевые продукты, тогда как у пациентов старшего возраста лидировали пылевые и бытовые аллергены. Аллергены, которые провоцировали астматические эпизоды по данным аллергического анамнеза во всех группах обследованных пациентов, мало отличались друг от друга. Однако у больных второй и третьей групп достоверно чаще встречалась лекарственная аллергия ($p = 0,02$), при этом она наблюдалась на различные группы лекарств. В то время как в первой группе только у одного пациента была зарегистрирована аллергическая реакция на антибактериальные препараты пенициллинового ряда. Следует отметить, что при опросе большинство пациентов (85,71%) связывали клинические проявления БА с неспецифическими триггерами (физическая нагрузка, изменение влажности, холодный воздух, аэрополлютанты).

Исследование сезонности обострения в группе больных БА показало, что в основном наблюдалась тенденция более частого обострения заболевания в летне-осенний период, что характерно для пылевой аллергии на сорные травы. Также у трети пациентов частота обострений не зависела от сезона, что связано с сенсибилизацией к бытовым аллергенам.

Средние величины функциональных показателей внешнего дыхания во всех группах обследованных пациентов демонстрировали смешанный тип вентиляционных нарушений с преобладанием бронхиальной обструкции. Петля «поток—объем» у всех больных была типичной обструктивной формы.

Наследственная предрасположенность к развитию atopических заболеваний установлена у 83,3% больных и встречалась с одинаковой частотой во всех группах. Среди atopических заболеваний у родственников больных по частоте на первом месте преобладал аллергический ринит (45,24%), затем atopический дерматит (16,67%) и БА (14,29%).

Проведенное генетическое исследование позволило изучить ассоциацию различных полиморфных вариантов генов ММП с риском развития БА у детей и сопоставить различные генотипы с клиническими проявлениями заболевания (табл. 1).

Установлено, что распределение генотипов в контрольной группе детей по всем исследуемым полиморфизмам соответствовало теоретически ожидаемому равновесию Харди—Вайнберга. В группе детей с БА равновесие Харди—Вайнберга для генотипов по *SNP 320A>C* гена *MMP20* не соблюдается ($\chi^2 = 3,99$). При этом среди обследованных детей 23,8% являлись гомозиготами по *A*-аллелю, 42,9% — гомозиготами по *C*-аллелю и 33,3% гетерозиготами по полиморфизму *320A>C* гена *MMP20*, тогда как в контрольной группе более половины (50,8%) являлись гетерозиготами, и процент гомозигот по *C*-аллелю составил всего 32,8% от всех обследованных пациентов. В то время как по полиморфизму *Val275Ala* гена *MMP20* и *-8202A>G* полиморфизму гена *MMP9* столь значимых отличий установлено не было ($p = 0,67$, $p = 0,53$). В целом отмечено, что частоты исследуемых аллелей и генотипов среди пациентов, страдающих БА, не имеют статистически значимых отличий от группы здоровых детей ($p > 0,05$).

Несмотря на то что проведенный сравнительный анализ генетического материала не выявил статистически значимых отличий, у пациентов с наличием *320C* аллеля гена *MMP20* гораздо чаще регистрировалось среднетяжелое и тяжелое течение заболевания. А также установлено, что гомозиготы по *G*-аллелю полиморфизма *-8202A>G* гена *MMP9* более предрасположены к тяжелым проявлениям заболевания и большинство из них относится ко второй и третьей группам обследованных пациентов. Важно отметить, что клинические проявления бронхообструктивного синдрома у носителей различных аллелей также имели достоверно значимые отличия. Так, у детей с наличием *G*-аллеля гена *MMP9* средние значения величины пиковой скорости выдоха составили $46 \pm 16,49$ л/мин, в отличие от носителей *AA*-генотипа — $75,24 \pm 18,75$ л/мин.

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНОТИПОВ ПО ПОЛИМОРФИЗМУ ГЕНОВ *MMP* СРЕДИ ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ЗДОРОВЫХ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. FREQUENCY OF GENOTYPES FOR THE *MMP* POLYMORPHISMS AMONG CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA AND HEALTHY PATIENTS

Генотип, аллель Genotype, allele	Больные Children with asthma (n = 42)	Здоровые Healthy children (n = 61)	χ^2	p	OR	
					Знач.	95% CI
MMP20 320A>C						
Аллель 320A Allele 320A	0,405	0,418	0,04	0,85	0,95	0,54-1,67
Аллель 320C Allele 320C	0,595	0,582			1,06	0,60-1,86
A/A	0,238	0,164	3,13	0,21	1,59	0,60-4,25
A/C	0,333	0,508			0,48	0,21-1,09
C/C	0,429	0,328			1,54	0,68-3,46
MMP20 Val275Ala						
Аллель Val275 Allele Val275	0,583	0,525	0,69	0,41	1,27	0,72-2,22
Аллель 275Ala Allele 275Ala	0,417	0,475			0,79	0,45-1,38
Val/Val	0,310	0,246	0,79	0,67	1,37	0,57-3,30
Val/Ala	0,548	0,557			0,96	0,44-2,12
Ala/Ala	0,143	0,197			0,68	0,23-1,98
MMP9 820A>G						
Аллель 820A Allele 820A	0,452	0,508	0,62	0,43	0,80	0,46-1,4
Аллель 820G Allele 820G	0,548	0,492			1,25	0,7-2,18
A/A	0,214	0,230	1,25	0,53	0,92	0,3-2,36
A/G	0,476	0,557			0,72	0,3-1,59
G/G	0,310	0,213			1,66	0,68-4,1

Лабораторные исследования сыворотки крови больных показали, что у носителей А-аллеля гена *MMP20* величина общего IgE значительно больше ($746,24 \pm 213,41$ МЕ/л) по сравнению с С-аллелем ($413,44 \pm 200,22$ МЕ/л, $p > 0,05$). Значения общего IgE также имеют достоверно значимые отличия у детей, являющихся гомозиготами по Val275 – аллелю гена *MMP20* ($708,39 \pm 187,23$ МЕ/мл)

и 275Ala аллелю ($735,0 \pm 218,57$ МЕ/мл) по сравнению с гетерозиготами по данному (Val275Ala) полиморфизму ($325,32 \pm 107,49$ МЕ/мл, $p > 0,05$).

Сопоставление анамнестических данных и результатов генетического исследования позволило выявить, что наличие мутантного G-аллеля гена *MMP9* у больных БА также ассоциировано с наличием поливалентной

сенсibilизации и менее значимым ответом на базисную терапию. В то время как у носителей 275A1a аллеля гена *MMP20* наиболее часто регистрировалась аллергическая реакция на пыльцевые и бытовые аллергены.

Обсуждение

Известно, что ММП играют центральную роль в обмене белков соединительной ткани, в процессах нормального развития и ремоделирования клеточного матрикса, поэтому в настоящее время активно изучается их роль при хронических заболеваниях, в том числе и бронхолегочных путей [12, 13, 14]. Установлено, что базальные уровни ММП обычно низки и их экспрессия может индуцироваться различными провоцирующими факторами (цитокинами, хемокинами, воздействием различных факторов внешней среды и др.) [15]. При этом ММП сами принимают активное участие в процессах воспаления и могут обладать как про-, так и противовоспалительной активностью (особенно это касается ММП-9). Чрезмерная экспрессия ММП отмечается при различных патологических состояниях, характеризующихся избыточным фиброзом, включая идиопатический легочный склероз, БА, экспериментальный билиарный фиброз, хронический панкреатит [7, 15]. Установлено их повышенное содержание в культурной среде альвеолярных макрофагов у пациентов с идиопатическим легочным фиброзом или БА [7]. Проведенные нами исследования также выявили определенную закономерность наследования, сопряженную с тяжестью течения и клиническими проявлениями заболевания. Нами установлено, что у пациентов гомозигот *GG* по полиморфизму -8202A>G гена *MMP9* отмечаются более тяжелые клинические проявления заболевания, сопряженные с поливалентной сенсibilизацией и повышенным уровнем общего IgE в сыворотке крови. В то вре-

мя как у гетерозиготных носителей данных аллелей преимущественно зарегистрировано легкое течение БА и более высокие показатели функции внешнего дыхания. Можно предположить, что у детей с *GG*-генотипом процессы ремоделирования бронхов могут протекать более активно, приводя к деградации внеклеточного матрикса и, следовательно, развитию осложнений. Также нами отмечено, что у детей, являющихся гомозиготами по *C*-аллелю полиморфизма 320A>C гена *MMP20*, отмечается более тяжелое течение заболевания и минимальный ответ на противовоспалительную терапию. Несмотря на неоднородность и фрагментарность, полученные нами результаты могут позволить приблизиться к раскрытию патогенетических механизмов БА, лежащих в основе данного заболевания. Дальнейшее проведение генетических исследований в этом научном направлении представляет не только клинический, но и практический интерес.

Заключение

Проведенные нами исследования позволили установить, что среди детей, страдающих БА, наиболее часто регистрируется гомозиготный вариант *C/C* полиморфизма 320A>C гена *MMP20*, гетерозиготный вариант *Val275Ala* гена *MMP20* и гетерозиготный вариант полиморфного локуса -8202A>G гена *MMP9*. Однако частоты аллелей и генотипов у больных детей не имеют статистически значимых отличий от группы здоровых пациентов. Отмечено, что у пациентов с генотипом *GG* по полиморфизму -8202A>G гена *MMP9* и являющихся гомозиготами по *C*-аллелю полиморфизма 320A>C гена *MMP20* наблюдается более тяжелое течение заболевания, сопряженное с поливалентной сенсibilизацией и повышенным уровнем общего IgE в сыворотке крови.

Список литературы / References

1. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». 5-е изд., испр. и доп. М.: Атмосфера, 2017. 160 с. [The national program "Bronchial asthma in children. The strategy of treatment and prevention". 5th ed., rev. and extra.] Moscow: Atmosphere. 2017. 160 p.
2. Протасов М.В., Смагина Л.В., Галибин О.В., Пинаев Г.П., Воронкина И.В. Зависимость активности ММП в раневом экссудате крыс от состояния тканей раны на начальных этапах раневого процесса // Цитология, 2008. Т. 50, № 10. С. 882-886. [Protasov M.V., Smagina L.V., Galibin O.V., Pinaev G.P., Voronkina I.V. The dependence of MMP-activity in the wound exudate of rats from a state of wound tissues in the initial stages of wound healing. *Tsitologiya = Cytology*, 2008, Vol. 50, no. 10, pp. 882-886. (In Russ.)]
3. Рогова Л.Н., Шестернина Н.В., Замечник Т.В., Фастова И.А. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор) // Вестник новых медицинских технологий, 2011. Т. XVIII, № 2. С. 87-92. [Rogova L.N., Shesternina N.V., Zamechnik T.V., Fastova I.A. Matrix metalloproteinases and

their role in physiological and pathological processes (review). *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*, 2011, Vol XVIII, no. 2. pp. 87-92. (In Russ.)]

4. Семерник О.Е., Лебеденко А.А. Особенности вегетативного реагирования у детей с бронхиальной астмой в периоде обострения заболевания // Вестник Российской академии медицинских наук, 2015. Т. 70, № 2. С. 222-226. [Semernik O.E., Lebedenko A.A. The peculiarities of autonomic response in children with bronchial asthma in the period of exacerbation of the disease. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, Vol. 70, no. 2, pp. 222-226. (In Russ.)]

5. Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции (обзорная статья) // Биоорганическая химия, 1998. Т. 24, № 4. С. 245-255. [Solovyova N.I. Matrix metalloproteinases and their biological functions (review article). *Bioorganicheskaya khimiya = Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 1998, Vol. 24, no. 4, pp. 245-255. (In Russ.)]

6. Чучалин А.Г. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению бронхиальной астмы. Пересмотр 2016. Пер. с англ. М.: Атмосфера, 2017. 108 с. [Chuchalin A.G. Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of bronchial asthma. Revision 2016. Transl. from English.] Moscow: Atmosphere, 2017. 108 p.

7. Ярмолинская М.И., Молотков А.С., Денисова В.М. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия // Акушерство и женские болезни, 2012. Т. LXI, № 1. С. 113-125. [Yarmolinskaya M.I., Molotkov A.C., Denisova, V.M. Matrix metalloproteinases and inhibitors: classification, mechanism of action. *Akusherstvo i zhenskie bolezni = Journal of Obstetrics and Woman Diseases*, 2012, Vol. LXI, no. 1, pp. 113-125. (In Russ.)]

8. Grzela K., Zagorska W., Crejner A., Litwiniuk M., Zawadzka-Krajewska A., Kulus M., Grzela T. Polymorphic variants 279R and 668Q augment activity of matrix metalloproteinase-9 in breath condensates of children with asthma. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2017, Vol. 65, no. 2, pp. 183-187.

9. Jimenez-Morales S., Martmez-Aguilar N., Gamboa-Becerra R., Jimenez-Ruiz J.L., Lopez- Ley D., Lou Hetal. Polymorphisms in metalloproteinase-9 are associated with the risk for asthma in Mexican pediatric patients. *Hum. Immunol.*, 2013, Vol. 74, no. 8, pp. 998-1002.

10. Kim W.-U. Elevated matrix metalloproteinase-9 in patient with systemic Sclerosis. *Arthritis Res. Ther.*, 2005, Vol. 7, pp. 71-79.

11. Naik S.P., Madhunapantula S.V., Jaliromi S.R., Yadav M.K. Evaluation of inflammatory markers interleukin-6 (IL-6) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in asthma. *J. Asthma*, 2017, Vol. 54, no. 6, pp. 584-593.

12. Rodriguez S., Gaunt T., Day I. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am. J. Epid. Adv. Acc.*, 2009, Vol. 169, no. 4, pp. 505-514.

13. Shkurat T.P., Lebedenko A.A., Mashkina E.V., Sememik O.E., Dreyzina T.K. Vascular endothelial growth factor: genetic aspects in children with asthma in the Rostov region. *Online Journal of Health and Allied Sciences*, 2016, Vol. 15, no. 4.

14. van den Steen Ph. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical. Reviews in Biochem. and Molec. Biology*, 2002, Vol. 37, no. 6, pp. 375-536.

15. Xue M. Differential regulation of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 by activated protein c relevance to inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatism*, 2007, Vol. 56, no. 9, pp. 2864-2874.

Авторы:

Лебеденко А.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой детских болезней № 2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Шкурят Т.П. — д.б.н., профессор, заведующая кафедрой генетики ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Россия

Машкина Е.В. — д.б.н., доцент, доцент кафедры генетики ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Lebedenko A.A., PhD, MD (Medicine), Profesor, Head, Department of Children's Diseases No. 2, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Shkurat T.P., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Genetics, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Mashkina E.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Department of Genetics, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Семерник О.Е. — к.м.н., ассистент кафедры детских болезней № 2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Дрейзина Т.К. — магистрант кафедры генетики ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Россия

Тюрина Е.Б. — врач-педиатр педиатрического отделения клиники ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Semernik O.E., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Children's Diseases No. 2, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Dreyzina T.K., Student, Department of Genetics, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Tyurina E.B., Clinical Pediatrician, Pediatric Clinic, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 20.02.2018
Принята к печати 06.03.2018

Received 20.02.2018
Accepted 06.03.2018

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В СОЧЕТАНИИ С ОЖИРЕНИЕМ

Антонюк М.В.^{1,2}, Гвозденко Т.А.¹, Новгородцева Т.П.¹, Виткина Т.И.¹,
Гельцер Б.И.², Юренко А.В.¹, Минеева Е.Е.¹, Кнышова В.В.¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения –
Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»,
г. Владивосток, Россия

² ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Резюме. Сочетание бронхиальной астмы (БА) и ожирения является трудно контролируемым фенотипом. В понимании механизмов влияния ожирения на БА актуально изучение характера воспалительного процесса с учетом тяжести заболевания. Цель исследования – установление особенностей цитокинового профиля у больных бронхиальной астмой (БА) легкой степени тяжести в сочетании с ожирением. В исследовании на условиях добровольного информированного согласия участвовали 53 пациента с БА легкой степени тяжести, частично контролируемого течения. 1-ю группу наблюдения составили 27 пациентов с БА, имеющих нормальную массу тела, 2-ю группу – 26 пациентов с БА в сочетании с ожирением. Группу контроля – 25 практически здоровых добровольцев. Всем пациентам проводилось клинико-лабораторное обследование в соответствии со стандартом обследования для БА и ожирения. В сыворотке крови методом проточной цитометрии определяли TNF α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10. Рассчитывали индексы соотношения провоспалительных и противовоспалительных цитокинов – TNF α /IL-4, TNF α /IL-10, IL-6/IL-4, IL-6/IL-10. У больных БА с ожирением (2-я группа) выявлено повышение уровня IL-2 по сравнению с контролем и 1-ой группой, соответственно, на 38% и 44% ($p < 0,05$). У пациентов в обеих группах статистически значимо была увеличена концентрация провоспалительных цитокинов TNF α и IL-6. В 1-й группе по сравнению с контролем уровень TNF α был увеличен в 2,5 раза ($p < 0,05$), IL-6 – на 30% ($p < 0,05$). Во 2-ой группе содержание TNF α и IL-6 превышало контрольные значения в 3 раза ($p < 0,05$). Уровень противовоспалительного цитокина IL-4 оказался повышенным у пациентов с БА независимо от массы тела. При этом у больных с ожирением концентрация этого цитокина на 29% превышала показатели пациентов, имеющих нормальную массу тела. Уровень цитокина IL-10 у пациентов 2-й группы был снижен относительно пациентов 1-ой группы более чем в 2 раза. У пациентов 1-ой группы выявлено снижение индекса IL-6/IL-10 в сравнении с контрольными показателями, что свидетельствует о дисбалансе за счет активации противовоспалительного цитокина IL-10. При БА с ожирением (2-я группа) индексы TNF α /IL-10 и IL-6/IL-10 превышали показатели как группы контроля (в 2,3 и 5,5 раза соответственно), так и 1-ой группы (в 2,6 и 2,5 раза соответственно). Динамика этих индексов подтверждает системный характер воспаления и преобладание неатопического типа воспаления у больных БА с ожирением. Таким образом, особенностями цитокинового профиля при БА с ожирением явилось значительное увеличение провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6, TNF α и относительное снижение противовоспа-

Адрес для переписки:

Кнышова Вера Васильевна
Научно-исследовательский институт медицинской
климатологии и восстановительного лечения
690105, Россия, г. Владивосток, ул. Русская, 73г.
Тел./факс: 8 (423) 278-82-01.
E-mail: v.knyshova@mail.ru

Address for correspondence:

Knyshova Vera V.
Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation
Treatment
690105, Russian Federation, Vladivostok, Russkaya str., 73g.
Phone/Fax: 7 (423) 278-82-01.
E-mail: v.knyshova@mail.ru

Образец цитирования:

М.В. Антонюк, Т.А. Гвозденко, Т.П. Новгородцева,
Т.И. Виткина, Б.И. Гельцер, А.В. Юренко,
Е.Е. Минеева, В.В. Кнышова «Особенности
цитокинового профиля у больных бронхиальной
астмой в сочетании с ожирением» // Медицинская
иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 913–920.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-913-920

© Антонюк М.В. и соавт., 2018

For citation:

M.V. Antonyuk, T.A. Gvozdenko, T.P. Novgorodtseva,
T.I. Vitkina, B.I. Geltser, A.V. Yurenko, E.E. Mineeva,
V.V. Knyshova "Features of cytokine profile in patients
with bronchial asthma combined with obesity", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,
Vol. 20, no. 6, pp. 913–920.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-913-920

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-913-920

лительного цитокина IL-10. Формирование БА на фоне ожирения, даже при легкой степени тяжести БА, сопровождается развитием цитокинового дисбаланса, характерного для смешанного типа воспаления с преобладанием нейтрофильного.

Ключевые слова: фенотип, бронхиальная астма, ожирение, воспаление, цитокиновый профиль, тип иммунного ответа

FEATURES OF CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA COMBINED WITH OBESITY

Antonyuk M.V.^{a, b}, Gvozdenko T.A.^a, Novgorodtseva T.P.^a, Vitkina T.I.^a, Geltser B.I.^b, Yurenko A.V.^a, Mineeva E.E.^a, Knysheva V.V.^a

^a Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

^b Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Combination of bronchial asthma (BA) and obesity is a difficult-to-control phenotype. Studies of inflammatory process with respect to severity of the disease are important for understanding the potential influence of obesity on the BA clinical course. The objective of this study was to determine cytokine profile in patients with mild BA combined with obesity. The study involved fifty-three patients with partially controlled mild BA. The patients were recruited as volunteers and signed an informed consent. The first observation group consisted of 27 asthma patients with normal body weight, the second observation group consisted of 26 patients with BA combined with obesity. A control group included 25 healthy volunteers. All the patients underwent clinical and laboratory examination in accordance with clinical standards for BA and obesity. The levels of TNF α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 were evaluated in blood serum by means of flow cytometry. The ratios of pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF α /IL-4, TNF α /IL-10, IL-6/IL-4, IL-6/IL-10) were calculated.

Asthma patients with obesity (the 2nd group) had elevated levels of IL-2 over control group and group 1, by 38% and 44% respectively ($p < 0.05$). The concentration of proinflammatory cytokines TNF α and IL-6 was significantly increased in the both patient groups. Mean TNF α level was increased 2.5 times ($p < 0.05$), and IL-6 levels were increased by 30% ($p < 0.05$) in the 1st group as compared to the controls. TNF α and IL-6 concentrations showed a 3-fold increase over control values ($p < 0.05$) in the 2nd group. The level of anti-inflammatory cytokine IL-4 was increased in patients with BA, independently of body mass. It should be noted that the concentration of this cytokine in obese patients was higher by 29% than in patients with normal body weight. IL-10 levels in patients from the 2nd group were reduced more than 2 times than in the 1st group. The patients of the 1st group showed a decrease in the IL-6/IL-10 index, in comparison with control parameters, thus indicative of an imbalance due to the elevation of the anti-inflammatory IL-10 cytokine. Among BA patients with obesity (group 2) the TNF α /IL-10 and IL-6/IL-10 indexes were higher than those of the control group (2.3- and 5.5-fold, respectively) and the group 1 (2.6- and 2.5-fold, respectively). Dynamics of these indexes confirms the systemic nature of inflammation and a predominance of non-atopic inflammation in asthma patients with obesity. Thus, features of the cytokine profile in BA with obesity consist of a significant increase in pro-inflammatory IL-2, IL-6, TNF α cytokines, and a relative decrease in anti-inflammatory IL-10 cytokine. The development of BA with obesity, even in mild-severity BA, is accompanied by development of a cytokine disbalance, which is typical for a mixed-type inflammation, with a prevalence of neutrophil inflammation.

Keywords: phenotype, bronchial asthma, obesity, inflammation, cytokine profile, type of immune response

Введение

Современный взгляд на проблему бронхиальной астмы (БА) характеризуется попытками выделить отдельные клинические фенотипы и развитием персонализированного подхода к профилактике и лечению болезни (Global Initiative for Asthma (GINA) 2016) [11]. В последнее десятилетие внимание исследователей привлекает фенотип БА, ассоциирован-

ный с ожирением. Доказано, что при ожирении повышается риск развития бронхиальной астмы и ухудшается контроль над ней, при этом формируется трудноконтролируемый фенотип с проявлениями дозозависимости или резистентности к ингаляционным глюкокортикостероидам [2, 7].

Обзор литературных источников по вопросам патогенеза ассоциации бронхиальной астмы и ожирения свидетельствуют о неоднозначных

и порой противоречивых результатах исследования. В литературе обсуждаются различные механизмы патогенетического воздействия ожирения на течение БА: механические, иммунологические, генетические, гормональные. Высказанные гипотезы отвечают не на все вопросы о механизмах взаимного влияния БА и ожирения [1, 2, 3, 5, 8, 14].

В настоящее время наибольший вес приобрела иммунологическая гипотеза, рассматривающая воспаление как ключевой фактор взаимосвязи БА и ожирения. Способствовали этому результаты изучения жировой ткани как метаболически активного органа. Исследования в этом направлении привели к формированию концепции ожирения как хронического системного воспалительного процесса [8, 15]. В ряде исследований был продемонстрирован специфический характер воспалительного процесса при наличии ожирения. Особенность данного воспаления заключается в том, что оно не вполне соответствует общепринятому патофизиологическому представлению об этом процессе. Для его описания были предложены специальные термины – метавоспаление или паравоспаление. Молекулярно-клеточные механизмы, участвующие в патогенезе как ожирения, так и БА во многом совпадают, и, следовательно, существует большая вероятность того, что они могут иметь определенное взаимное влияние. Очевидно, что повышение при ожирении некоторых провоспалительных цитокинов, которые играют роль в отдельных звеньях патогенеза бронхиальной астмы, усиливает воспалительные явления в стенке бронхов [13, 14].

Несмотря на определенные успехи, вопросы патогенетической взаимосвязи и фенотипических особенностей БА с ожирением остаются открытыми. Важным в понимании механизмов взаимного влияния БА представляется детализация вопроса о характере воспалительного процесса с учетом тяжести заболеваний, периодов обострения и ремиссий.

Целью настоящего исследования явилось установление особенностей цитокинового профиля у больных бронхиальной астмой легкой степени тяжести в сочетании с ожирением.

Материалы и методы

В исследовании на условиях добровольного информированного согласия участвовали 53 пациента с БА легкой степени тяжести, частично контролируемого течения. Среди обследованных 18 мужчин и 35 женщин в возрасте 20–65 лет (средний возраст $48,7 \pm 2,7$ лет). В 1-ю группу наблюдения были включены 27 пациентов с БА, имеющих нормальную массу тела (НМТ), во 2-ю группу – 26 пациентов с БА в сочетании

с алиментарно-конституциональным ожирением 1–2 степени. Группу контроля составили 25 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными.

Диагноз БА устанавливался в соответствии с классификацией и критериями международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (GINA, 2016). Для диагностики алиментарно-конституционального ожирения и определения его степени рассчитывали индекс массы тела (ИМТ), индекс отношения окружности талии (ОТ) и обхвата бедер (ОБ). Согласно рекомендациям ВОЗ, алиментарно-конституциональное ожирение диагностировали при $\text{ИМТ} \geq 30$, абдоминальный тип ожирения – при индексе $\text{ОТ}/\text{ОБ}$ у мужчин более 0,9, у женщин – более 0,8.

Критерии включения в исследование: БА легкой степени тяжести, частично контролируемого течения, наличие нормальной массы тела или алиментарно-конституционального ожирения I–II степени, возраст от 18 до 65 лет. Критерии исключения из исследования: БА средней и тяжелой степени тяжести, неконтролируемого течения, хроническая обструктивная болезнь легких, профессиональные заболевания бронхолегочной системы, эндокринные заболевания, алиментарно-конституциональное ожирение 3–4 степени, заболевания внутренних органов в стадии декомпенсации.

Всем пациентам, включенным в исследование, после ознакомления и подписания ими информированного согласия проводилось общепринятое клинико-лабораторное обследование в соответствии со стандартом обследования для БА и ожирения. Исследование функции внешнего дыхания (ФВД) проводили на аппарате Master Screen Body (Care Fusion, Германия). Оценивали жизненную емкость легких (ЖЕЛ), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1) и соотношение этих параметров $\text{ОФВ1}/\text{ФЖЕЛ}$. Для исследования обратимости обструкции использовали пробу с сальбутамолом (400 мкг). Для определения уровня контроля над заболеванием использовали тест ACQ-5 (Asthma Control Questionnaire), количество баллов от 0,75 до 1,5 свидетельствовало о частично контролируемой БА. Определяли пиковую скорость выдоха (ПСВ).

Цитокиновый профиль оценивали по содержанию в сыворотке крови туморнекротизирующего фактора (TNF α), интерлейкинов (IL) IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, определяемых методом проточной цитометрии (тест-системы фирмы BD, США) на цитометре BD FACS Canto II, США). Для обработки данных использована программа FCAP 3 (BD, США). Для определения цитоки-

нового баланса рассчитывали индексы, показывающие соотношения провоспалительных и противовоспалительных процессов — $TNF\alpha/IL-4$, $TNF\alpha/IL-10$, $IL-6/IL-4$, $IL-6/IL-10$.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета статистических программ Statistica 6.1 для Windows. Количественные показатели описывали в терминах среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Для решения проблемы множественных сравнений использовали поправку Бонферрони. Показатели оценивали с помощью t-критерия для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При исследовании цитокинового профиля (табл. 1) в группе пациентов с БА в сочетании с алиментарно-конституциональным ожирением (2-я группа) выявлен повышенный уровень IL-2: относительно контрольной группы — на 38% ($p < 0,05$), относительно пациентов с БА и НМТ (1-я группа) — на 44% ($p < 0,05$). В 1-ой группе уровень IL-2 статистически достоверно не отличался от показателей контрольной группы.

У пациентов в обеих группах выявлено статистически значимое увеличение провоспалительных цитокинов $TNF\alpha$ и IL-6 по сравнению с контролем. В 1-й группе отмечено повышение уровня $TNF\alpha$ в 2,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В то время как показатели IL-6 превышали показатели контрольной группы на 30% ($p < 0,05$). При этом во 2-ой группе содержание $TNF\alpha$ и IL-6 превышало контрольные значения в 3 раза ($p < 0,05$).

Уровень противовоспалительного цитокина IL-4 оказался повышенным у пациентов с БА независимо от массы тела. Так, содержание IL-4 в 1-й группе превышало контрольные значения в 2 раза ($p < 0,05$), во 2-й второй группе — в 2,7 раза ($p < 0,05$). У пациентов 2-ой группы уровень этого цитокина по сравнению с 1-ой группой был выше на 29% ($p < 0,05$).

Показатели противовоспалительного цитокина IL-10 у пациентов 2-ой группы статистически значимо не отличались от значений группы контроля. Тогда как у пациентов с БА и НМТ (1-я группа) установлено повышение уровня IL-10 в 2,9 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и 2,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению со 2-й группой.

Оценка цитокинового баланса по результатам соотношения про- и противовоспалительных цитокинов выявила значимые отличия в исследуемых группах. У пациентов 1-ой группы индексы соотношения цитокинов $IL-6/IL-4$, $TNF\alpha/IL-10$, $TNF\alpha/IL-4$ не отличались статистически достоверно от показателей контрольной группы. В то

время как индекс $IL-6/IL-10$ ($0,52 \pm 0,04$ усл. ед.) статистически достоверно был ниже показателей контрольной группы ($1,14 \pm 0,06$ усл. ед., $p < 0,05$). Во 2-й группе индексы $TNF\alpha/IL-10$ и $IL-6/IL-10$ превышали показатели группы контроля в 2,3 и 5,5 раза соответственно ($p < 0,05$) и были выше, чем в 1-й группе в 2,6 и 2,5 раза соответственно ($p < 0,05$).

Обсуждение

Преимущественная связь БА с ожирением становится более очевидной, если ее подробнее рассмотреть с позиции воспаления. И астма, и ожирение представляют собой заболевания, формирующие в организме устойчивый воспалительный процесс. Известно, что при БА воспаление сосредоточено преимущественно в дыхательных путях. На сегодняшний день доказано, что жировая ткань является метаболически высокоактивным органом и участвует в депонировании жиров, их мобилизации и в регуляции метаболических процессов. Активность адипоцитов не ограничивается влиянием на метаболические процессы. Предполагается, что в условиях ожирения большие объемы жировой ткани становятся постоянным источником значительных количеств провоспалительных цитокинов, синтезируемых как самими адипоцитами, так и мигрировавшими в жировую ткань макрофагами, что приводит к формированию и поддержанию в организме хронического вялотекущего воспалительного процесса [12, 13].

Известно, что цитокины, являясь регуляторными посредниками системного воспаления, контролируют процессы иммунной и воспалительной реактивности за счет поддержания баланса между провоспалительными (IL-1, IL-6, IL-8, $TNF\alpha$ и др.) и их эндогенными антагонистами, противовоспалительными цитокинами (IL-4, IL-10, IL-13 и др.). В случае неспособности регулирующих систем к поддержанию гомеостаза деструктивные эффекты цитокинов ($TNF\alpha$, IL-1, IL-6, IL-10, $IFN\gamma$) и других медиаторов воспаления начинают доминировать, что приводит к тотальному развитию системного воспаления [9]. Таким образом, исследование цитокинового статуса позволяет определить характер течения воспалительного процесса, прогнозировать исход заболевания и оценить эффективность терапии.

Выявленное у всех пациентов повышение цитокина $TNF\alpha$ свидетельствует о напряженности иммунитета. При межгрупповом сравнении уровень этого цитокина у пациентов с БА и ожирением на 14% превышал показатели пациентов 1-ой группы. При БА цитокин $TNF\alpha$ является сильным индуктором воспаления и определяет тяжесть бронхиальной гиперреактивности.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ (M±m)

TABLE 1. INDICATORS OF CYTOKINE PROFILE IN SURVEYED PATIENTS (M±m)

Исследуемый показатель (пг/мл) Parameter studied (pg/ml)	Группа контроля Control group (n = 25)	1-я группа БА с НМТ 1 group Bronchial asthma with normal body weight (n = 27)	2-я группа БА с ожирением 2 group Bronchial asthma with obesity (n = 26)
IL-2	28,3±1,4	25,0±1,2	45,4±2,5* #
IL-4	75,5±3,8	155,9±6,3*	201,7±9,7* #
IL-6	37,8±1,9	49,0±2,3*	119,8±6,1* #
IL-10	33,1±1,6	95,0±4,2*	41,9±2,8* #
TNFα	46,5±2,3	117,7±5,4*	137,5±6,6*
TNFα/IL-4	0,62±0,04	0,83±0,08	0,75±0,06
TNFα/IL-10	1,42±0,05	1,24±0,08	3,26±0,16* #
IL-6/IL-4	0,50±0,04	0,31±0,09	0,59±0,18
IL-6/IL-10	1,14±0,06	0,52±0,04*	2,86±0,16* #

Примечание. * p – достоверность различий с контрольной группой (p < 0,05); # p – достоверность различий с 1-ой группой (p < 0,05).

Note. * p, significance of differences with the control group (p < 0.05); # p, significance of differences with the 1 group.

Он способен индуцировать не только собственный синтез, но и продукцию лептина, IL-6, IL-1, IL-2 и его рецепторов, IL-3, IL-8, IL-10 и других острофазных реактантов. По литературным данным, при ожирении концентрация TNFα увеличивается преимущественно в адипоцитах висцеральной жировой ткани, провоцируя обострения БА [6, 10, 12].

Важную роль в реализации механизмов иммунного ответа играет IL-2, который принимает участие в дифференцировке и пролиферации Т-лимфоцитов и является одним из ключевых факторов в развитии иммунного ответа. В настоящем исследовании цитокиновый профиль пациентов с БА в сочетании с алиментарно-конституциональным ожирением характеризовался высоким уровнем цитокина IL-2 (относительно контрольной группы – на 38%, относительно 1-ой группы – на 44%), тогда как у пациентов с БА и НМТ уровень IL-2 не отличался от показателей контрольной группы. На синтез данного цитокина влияют не только антигены или митогены, но и ряд других биологически активных соединений. К ним относятся в том числе и цитокины IL-6, TNFα, продуцируемые другими классами клеток. Повышение этих цитокинов и стимулирует в большей степени повышение уровня IL-2 во 2-ой группе [9].

Характерным явилось существенное увеличение уровня цитокина IL-6 в обеих группах. Однако во 2-ой группе при сочетанной патологии уровень IL-6 был почти в 2,5 раза выше, чем в 1-ой группе.

Известно, что IL-6 является одним из наиболее активных цитокинов, участвующих в реализации иммунного ответа и воспалительной реакции, обладает способностью стимулировать реакции, контролируемые Т-хелперами типа Th2. Это дает основание предполагать, что иммунные реакции, опосредованные Th2-хелперами, могут усиливаться или как минимум существенным образом изменяться под воздействием постоянного избыточного синтеза IL-6 у пациентов с ожирением. По литературным данным, около 30% данного цитокина синтезируется в жировой ткани, а также установлена прямая корреляционная связь IL-6 с индексом Кетле [5, 6].

Преобладание уровней провоспалительных цитокинов у больных БА, имеющих ожирение, подтверждает связь ожирения и системного воспаления, на фоне которого может поддерживаться гиперреактивность в бронхах.

В процессах воспаления различного генеза активно участвуют противовоспалительные цитокины, одним из которых является IL-4. Повышение продукции IL-4 является ключевой в развитии аллергопатологии. Следует учесть, что IL-4 принимает участие в ограничении воспалительного ответа, подавляя секрецию провоспалительных цитокинов и регулируя, таким образом, тяжесть повреждения тканей. Вместе с тем повышение уровня противовоспалительного цитокина IL-4 выше референтных значений свидетельствует о присоединении аллергического компонента воспалительной реакции. Отмече-

но статистически значимое превышение уровня этого цитокина у пациентов 2-ой группы на 29% по сравнению с 1-ой группой. Увеличение уровня IL-4, вероятно, сопряжено с аллергическим компонентом и сохраняющейся у наблюдаемых пациентов бронхоконстрикцией. Увеличение уровня цитокинов на фоне системного воспаления создает предпосылки для усиления воспаления в стенке бронхов и при определенных условиях может способствовать моделированию дыхательных путей и отягощать течение БА в сочетании с ожирением [4, 5, 14].

Напротив, уровень противовоспалительного цитокина IL-10 у пациентов с БА в сочетании с ожирением был снижен относительно пациентов 1-ой группы более чем в 2 раза. Это может рассматриваться как один из факторов, увеличивающих степень воспалительной реакции в организме и предрасполагающих к более тяжелому течению астмы у тучных пациентов [3].

О цитокиновом балансе позволяют судить индексы соотношения про- и противовоспалительных процессов. Снижение индекса IL-6/IL-10 у пациентов 1-ой группы в сравнении с контрольными показателями свидетельствует о дисбалансе за счет более выраженной активации противовоспалительного цитокина IL-10. Это указывает на преобладание аллергических реакций и более стабильное течение БА у лиц с нормальной массой тела. При БА с ожирением (2-я группа) о ци-

токиновом дисбалансе свидетельствовали индексы TNF α /IL-10 и IL-6/IL-10, значения которых в несколько раз превышали показатели как группы контроля (в 2,3 и 5,5 раза соответственно), так и 1-ой группы (в 2,6 и 2,5 раза соответственно). Динамика этих индексов подтверждает системный характер воспаления и преобладание не атопического типа воспаления у больных БА с ожирением.

Заключение

Механизм формирования БА на фоне ожирения, даже при легкой степени тяжести БА, сопровождается развитием цитокинового дисбаланса, характерного для смешанного типа воспаления с преобладанием нейтрофильного. Характерными особенностями цитокинового профиля при БА с ожирением является значительное увеличение провоспалительных фракций цитокинов IL-2, IL-6, TNF α и относительное снижение противовоспалительного цитокина IL-10. Большие объемы жировой ткани становятся постоянным источником значительных количеств провоспалительных цитокинов, синтезируемых как самими адипоцитами, так и мигрировавшими в жировую ткань макрофагами. Таким образом, ожирение приводит к формированию и поддержанию в организме системного воспаления и является негативным отягощающим фактором развития и прогрессирования БА

Список литературы / References

1. Антонюк М.В., Царева У.В., Виткина Т.И., Ходосова К.К. Состояние иммунного статуса у больных бронхиальной астмой и ожирением // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2015. № 55. С. 15-20. [Antonyuk M.V., Tsareva U.V., Vitkina T.I., Khodosova K.K. Immune status in patients with bronchial asthma and obesity. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya* = *Bulletin of Physiology and Pathology of Respiration*, 2015, no. 55, pp. 15-20. (In Russ.)]
2. Астафьева Н.Г., Гамова И.В., Удовиченко Е.Н., Перфилова И.А. Ожирение и бронхиальная астма // Лечащий врач, 2014. № 5. С. 100-106. [Astafieva N.G., Gamova I.V., Udovichenko E.N., Perfilova I.A. Obesity and bronchial asthma. *Lechashchiy vrach* = *Attending Physician*, 2014, no. 5, pp. 100-106. (In Russ.)]
3. Игнатова Г.Л., Макарова Е.А. Бронхиальная астма и ожирение: клинико-патогенетические аспекты выделения нового фенотипа заболевания // Современные проблемы науки и образования, 2016. № 4. С. 88. [Ignatova G.L., Makarova E.A. Bronchial asthma and obesity: clinical and pathogenetic aspects of the selection of new phenotype. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* = *Modern Problems of Science and Education*, 2016, no. 4, p. 88. (In Russ.)]
4. Лазуткина Е.Л. Патогенетическая значимость цитокинов у больных бронхиальной астмой и ожирением // Амурский медицинский журнал, 2016. Т. 14, № 2. С. 26-29. [Lazutkina E.L. Pathogenetic significance of cytokines in patients with bronchial asthma and obesity. *Amurskiy meditsinskiy zhurnal* = *Amur Medical Journal*, 2016, Vol. 14, no. 2, pp. 26-29. (In Russ.)]
5. Минеев В.Н., Лалаева Т.М., Трофимов В.И. Бронхиальная астма и ожирение: общие механизмы // Клиническая медицина, 2012. № 4. С. 4-10. [Mineev V.N., Lalaeva T.M., Trofimov V.I. Bronchial asthma and obesity: common mechanisms. *Klinicheskaya meditsina* = *Clinical Medicine (Russian Journal)*, 2012, no. 4, pp. 4-10. (In Russ.)]
6. Ненартович И.А., Жерносик В.Ф. Бронхиальная астма и ожирение // Иммунология, аллергология, инфектология, 2014. № 1. С. 27-32. [Nenartovich I.A., Zhernosik V.F. Bronchial asthma and obesity. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya* = *Immunology, Allergology, Infectology*, 2014, no. 1, pp. 27-32. (In Russ.)]

7. Соловьева И.А., Собко Е.А., Демко И.В., Крапошина А.Ю., Гордеева Н.В., Локтионова М.М. Бронхиальная астма и ожирение // Терапевтический архив, 2017. Т. 89, № 3. С. 116-120. [Solovyova I.A., Sobko E.A., Demko I.V., Kraposhina A.Yu., Gordeeva N.V., Loktionova M.M. Bronchial asthma and obesity. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2017, Vol. 89, no. 3, pp. 116-120. (In Russ.)]
8. Цибулькина В.Н., Цибулькин Н.А. Бронхиальная астма и ожирение: совпадение или закономерность? // Практическая медицина, 2011. Т. 54, № 6. С. 36-41. [Tsibulkin V.N., Tsybulkin N.A. Bronchial asthma and obesity: coincidence or pattern? *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2011, Vol. 54, no. 6, pp. 36-41. (In Russ.)]
9. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
10. Bastard J.P., Maachi M., Lagathu C., Kim M.J., Caron M., Vidal H., Capeau J., Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.*, 2006, Vol. 17, no. 1, pp. 4-12.
11. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention (2016).
12. Hotamisligil G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 2006, Vol. 444, no. 7121, pp. 860-867.
13. Lugogo N.L., Kraft M., Dixon A.E. Does obesity produce a distinct asthma phenotype? *J. Appl. Physiol.*, 2010, no. 108, pp. 729-734.
14. Nigro E., Daniele A., Scudiero O., Ludovica M.M., Roviezzo F., D'Agostino B., Mazzeo G., Bianco A. Adiponectin in asthma: implications for phenotyping. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2015, Vol. 16, no. 3, pp. 182-187.
15. Todd D.C., Armstrong S., D'Silva L., Allen C.J., Hargreave F.E., Parameswaran K. Effect of obesity on airway inflammation: a cross-sectional analysis of body mass index and sputum cell counts. *Clin. Exp. Allergy*, 2007, Vol. 37, no. 7, pp. 1049-1054.

Авторы:

Антонюк М.В. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; профессор департамента клинической медицины ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Гвозденко Т.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия

Новгородцева Т.П. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия

Authors:

Antonyuk M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Laboratory, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; Professor, Department of Clinical Medicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Gvozdenko T.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Novgorodtseva T.P., PhD, MD (Biology), Professor, Chief Research Associate, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Виткина Т.И. — д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия

Гельцер Б.И. — д.м.н., член-корреспондент РАН, директор департамента клинической медицины ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Юренко А.В. — к.м.н., младший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия

Минеева Е.Е. — к.м.н., научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия

Кнышова В.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения — Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», г. Владивосток, Россия

Vitkina T.I., PhD, MD (Biology), Professor, Leading Research Associate, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Geltser B.I., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Department of Clinical Medicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Yurenko A.V., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Mineeva E.E., PhD (Medicine), Research Associate, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Knyshova V.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 22.02.2018
Отправлена на доработку 06.03.2018
Принята к печати 13.03.2018

Received 22.02.2018
Revision received 06.03.2018
Accepted 13.03.2018

МЕЖГЕННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ IL1, IL1RA, IL6, IL10 И TNFA У БОЛЬНЫХ СИНДРОМОМ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Сташкевич Д.С., Беляева С.В., Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова А.Л.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. В основе развития мультифакторных заболеваний (неспецифический язвенный колит и синдром раздраженного кишечника) лежат сложные межгенные взаимодействия, которые необходимо учитывать при прогнозировании риска развития неблагоприятного течения патологического процесса. Индивидуальные генетические полиморфизмы являются слабым фактором риска развития болезни и не могут быть использованы в качестве прогностической модели развития мультифакторных патологий, особенно в случаях редких аллелей. Но хорошо известно, что опасным является сочетание неблагоприятных аллелей нескольких генов с аддитивным эффектом, поэтому идентификации таких полиморфизмов придается большое значение.

Ранее нами был проведен комплекс исследований по оценке ассоциации аллелей и генотипов генов цитокинов *IL1β*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6* с предрасположенностью/устойчивостью к неспецифическому язвенному колиту и синдрому раздраженного кишечника у русских Челябинской области, в ходе которого установлены особенности распределения аллелей и генотипов данных генов при НЯК и СРК. В исследовании использовались следующие методы: выделение образцов ДНК из цельной крови, проведение генотипирования исследуемых полиморфизмов генов с помощью ПЦР, ПДРФ. В продолжение был проведен сравнительный анализ межгенных взаимодействий генов цитокинов *IL1β*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6* с использованием метода сокращения многофакторной размерности у больных синдромом раздраженного кишечника и неспецифическим язвенным колитом. Анализ основан на использовании комбинации полиморфных локусов генов *IL1β*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6*, выбранных для анализа межгенных взаимодействий, в отношении риска развития предрасположенности к СРК и НЯК. В результате исследования для СРК была установлена четырехлокусная модель *IL1β*(+3953)**T/TNFα*(-308)**A/IL10*(-1082)**G/IL6*(-174)**G*, которая характеризовалась 90% воспроизводимостью и точностью предсказания 74,53%. Данная модель генных взаимодействий между генами цитокинов *IL1β*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6* при СРК имела наибольший потенциал предикции ($p < 0,001$), в то время как модель для НЯК не имела статистической значимости.

Адрес для переписки:

Сташкевич Дарья Сергеевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»
454021, Россия, г. Челябинск, ул. Молдавская, 25-15.
Тел.: 8 (351) 799-71-54.
E-mail: Stashkevich_dary@mail.ru

Address for correspondence:

Stashkevich Daria S.
Chelyabinsk State University
454021, Russian Federation, Chelyabinsk, Moldavskaya str.,
25-15.
Phone: 7 (351) 799-71-54.
E-mail: Stashkevich_dary@mail.ru

Образец цитирования:

Д.С. Сташкевич, С.В. Беляева, Ю.Ю. Филиппова, А.Л. Бурмистрова «Межгенные взаимодействия генов цитокинов *IL1*, *IL1RA*, *IL6*, *IL10* и *TNFA* у больных синдромом раздраженного кишечника и неспецифическим язвенным колитом русской популяции Челябинской области» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 921-926.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-921-926

© Сташкевич Д.С. и соавт., 2018

For citation:

D.S. Stashkevich, S.V. Belyaeva, Yu.Yu. Filippova, A.L. Burmistrova "Intergenic interactions of cytokine genes *IL1*, *IL1RA*, *IL6*, *IL10* and *TNFA* in patients with irritable bowel syndrome and ulcerative colitis in Russian population of the Chelyabinsk Region", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 921-926. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-921-926

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-921-926

Установлены следующие виды взаимодействий: синергичное взаимодействие между генами *IL1β*(+3953)**T* и *TNFα*(-308)**A*, в то время как *IL6*(-174)**G* и *IL10*(-1082)**G*, *TNFα*(-308)**A* находятся в антагонистических взаимоотношениях. Проведенное исследование позволило установить, что из полиморфных вариантов генов полиморфизм -174*G/C* *IL-6* может играть центральную роль и формировать межгенные взаимодействия с *SNPs* *IL1β*, *TNFα*, *IL10* в реализации предрасположенности к синдрому раздраженного кишечника у русских Челябинской области.

Ключевые слова: межгенные взаимодействия, цитокины, генетический полиморфизм, СРК, НЯК, метод сокращения многофакторной размерности

INTERGENIC INTERACTIONS OF CYTOKINE GENES *IL1*, *IL1RA*, *IL6*, *IL10* AND *TNFA* IN PATIENTS WITH IRRITABLE BOWEL SYNDROME AND ULCERATIVE COLITIS IN RUSSIAN POPULATION OF THE CHELYABINSK REGION

Stashkevich D.S., Belyaeva S.V., Filippova Yu.Yu., Burmistrova A.L.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Complex intergenic interactions should be taken into account when predicting the risk of adverse course in a pathological process. This presumption is at the heart of evolving multifactorial diseases (ulcerative colitis and irritable bowel syndrome). A single genetic polymorphism seems to be a weak risk factor when predicting the disease evolution and it could not be used as a prognostic model for development of multifactorial pathologies, especially in cases of rare alleles. However, it is well known that the combination of unfavorable alleles of several genes with an additive effect is dangerous. Therefore, identification of such polymorphisms is very important.

Previously we conducted a test panel, in order to evaluate associations of alleles and genotypes of some cytokine genes (*IL1β*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6*) with predisposal, or resistance for ulcerative colitis and irritable bowel syndrome in the Russian Chelyabinsk region. Distribution of alleles and genotypes of these genes have been assessed in irritation bowel disease (IBD) and ulcerative colitis (UC). The following methods were used: isolation of DNA samples from whole blood, genotyping of the studied gene polymorphisms with PCR, RFLP. A comparative analysis of intergenic interactions between the cytokine genes *IL1β*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6* in the IBD and UC patients was carried out by the *Multifactor Dimensionality Reduction* method. The analysis is based on the use of polymorphic loci of *IL1β*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6* combinations chosen for analysis of intergenic interactions, with respect to the risk for IBS and UC predisposition. As a result of this study, a four-locus model *IL1β*(+3953)**T*/*TNFα*(-308)**A*/*IL10*(-1082)**G*/*IL6*(-174)**G* was identified for IBS, which was characterized by 90% repeatability and prediction accuracy of 74.5%. This model of gene interactions between the cytokine *IL1β*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6* genes had the greatest prediction potential ($p < 0.001$) in IBS, whereas the model for UC was not statistically significant.

The following types of genetic interactions were established: synergism between the *IL1β*(+3953)**T* and *TNFα*(-308)**A* loci, whereas *IL6*(-174)**G* и *IL10*(-1082)**G*, *TNFα*(-308)**A* seem to be in antagonistic relationships. The study made it possible to establish that the -174*G/C* *IL-6* polymorphism may play a central role and provide intergenic interactions with *SNPs* of *IL1β*, *TNFα*, *IL10* for predisposal to irritable bowel syndrome in Chelyabinsk Region of Russia.

Keywords: intergenic interaction, cytokines, genetic polymorphism, IBD, UC, multifactor dimensionality reduction

Введение

Все происходящие в организме процессы осуществляются за счет координированной экспрессии различных групп генов, составляющих основу так называемых генных сетей. Поддержание определенного функционального состояния генной сети или ее переход в другой режим функ-

ционирования, в том числе и под влиянием факторов внешней среды, обеспечивает адаптацию организма к изменяющимся условиям среды [2].

Нарушения в локальных генных сетях, обусловленные мутациями в генах или аллельным полиморфизмом, могут нарушить или исказить работу целостной генной сети организма [1],

в результате чего возможен переход к развитию патологических процессов, лежащих в основе мультифакторных заболеваний.

Существующие на сегодня данные позволяют предположить, что полиморфные гены цитокинов, участвуя в формировании межгенных взаимодействий, составляющих основу для локальных генных сетей, обеспечивающих гомеостаз физиологических параметров организма [2], способны принимать активное участие в формировании адаптивных иммунных ответов на патологические состояния человека.

Известно, что анализ ассоциаций отдельных полиморфных вариантов генов не дает достаточно полного представления о механизмах формирования предрасположенности к заболеванию, так как в основе развития мультифакторных заболеваний (таких как воспалительные заболевания кишечника: неспецифический язвенный колит и синдром раздраженного кишечника) лежат сложные межгенные и ген-средовые взаимодействия, которые необходимо учитывать при прогнозировании риска развития неблагоприятного течения процесса [1, 5, 6].

Синдром раздраженного кишечника (СРК) — распространенное мультифакторное заболевание желудочно-кишечного тракта с выраженным изменением баланса в отношении сигналов возбуждения/торможения активности мозга. Сегодняшние представления о патофизиологии СРК позволяют предположить, что в его патогенезе одну из важных ролей играют воспалительные реакции [7]. Распространенность СРК в мире составляет 11,2% (95% ДИ 9,8-12,8), по данным метаанализа 80 исследований с участием 260 960 человек. Обычно СРК встречается в молодом возрасте, чаще — у женщин [3]. Еще одной частой патологией желудочно-кишечного тракта с аутоиммунным компонентом является неспецифический язвенный колит (НЯК), частота которого достигает 8-15 новых случаев на 100 тыс. населения ежегодно в странах Европы, Северной Америки и Австралии, а распространенность — 80-120 человек на 100 тыс. населения [3].

Ключевыми модуляторами иммунного ответа и воспалительных реакций, протекающих в кишечнике при данных заболеваниях, являются цитокины, обладающие свойством формировать цитокиновые сети определенных направленностей [5, 6, 8].

Ранее нами был проведен комплекс исследований по оценке ассоциации аллелей и генотипов генов цитокинов *IL1β*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6* с предрасположенностью/устойчивостью к неспецифическому язвенному колиту и синдрому раздраженного кишечника у русских Челябинской области, в ходе которого установлены

особенности распределения аллелей и генотипов данных генов при НЯК и СРК [4].

В связи с вышеизложенным **цель** — сравнительный анализ межгенных взаимодействий генов цитокинов *IL1β*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6* методом сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction — MDR) у больных синдромом раздраженного кишечника и неспецифическим язвенным колитом.

Материалы и методы

Контингент обследуемых лиц

В качестве контрольной группы (66 человек: мужчин — 39, женщин — 27, средний возраст — $34,6 \pm 0,75$ лет) использовали популяционную выборку, сформированную случайным образом на основе ДНК-банка потенциальных доноров костного мозга ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», проживающих в г. Челябинске и Челябинской области. Популяционная принадлежность определялась по данным генеалогического анамнеза до третьего поколения (согласно рекомендациям 8-го Международного симпозиума в 1980 г., Лос-Анджелес, США).

Выборка больных СРК состояла из 61 человека русской этнической группы с диагнозом СРК (мужчин — 19,6%, женщин — 80,3%, средний возраст — $41,9 \pm 1,3$ лет). Группа больных НЯК состояла из 165 человек русской этнической группы (мужчин — 47,2%, женщин — 52,7%, средний возраст — $43,4 \pm 1,6$ лет).

В качестве биологического материала для исследования использовалась венозная кровь, взятая в пробирки с 0,5% раствором калиевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Выделение ДНК проводили с использованием реагентов PROTRANS DNA Box 500. Определение *SNPs* в полиморфных сайтах *-1082G/A*, *-819C/T* и *-592C/A* гена *IL10*, *-174G/C* *IL6* проводилось аллель-специфической ПЦР (ООО НПФ «Литех», Москва), *VNTR IL1ra* — методом прямой амплификации (ИХБиФМ СО РАН, г. Новосибирск), *SNP IL1β* и *SNPs* в промоторной области *TNFα* — с помощью метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ИХБиФМ СО РАН, г. Новосибирск, праймеры производства Синтол, Москва, рестриктазы: *TaqI*, *BpiI*, *TaiI*, *NcoI*, *BamHI* Fermentas, США) с последующей УФ-детекцией результатов в 3% агарозном геле.

Статистическая обработка

Анализ межгенных взаимодействий проведен методом сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) в среде открытой программы MDR 2.0 beta 8 [7]. Для оценки межгенных взаимодей-

ствий с помощью метода MDR был использован алгоритм всестороннего поиска (Exhaustive search algorithm), который рассматривал все возможные комбинации полиморфных локусов, выбранных для анализа межгенных взаимодействий, в отношении риска развития предрасположенности к СРК и НЯК. Учитывая коэффициенты перекрестной проверки CV (cross-validation) и ошибки предсказания, построены оптимальные модели межгенных взаимодействий. В программе MDR мультилокусные генотипы суммируются в группы повышенного и пониженного риска развития заболевания, что уменьшает размерность числа рассчитываемых параметров. С помощью многократного перекрестного пересчета вводимых первичных данных выбирается оптимальная модель межгенного взаимодействия, позволяющая с наиболее высокой точностью и, соответственно, с наименьшей ошибкой предсказать респонденту наличие или отсутствие предрасположенности к определенным болезням. Математической базой данной программы является непараметрический кластерный анализ.

Результаты и обсуждение

В результате исследования установлено, что модель генных взаимодействий между генами цитокинов *IL1*, *TNFA*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6* для СРК имела наибольший потенциал предсказания ($p < 0,001$), в то время как модель для НЯК не имела статистической значимости. В таблице 1 представлены характеристики полученных моделей для СРК.

Для СРК была установлена четырехлокусная модель *IL1β(+3953)*T/TNFA(-308)*A/IL10(-1082)*G/IL6*G*, которая характеризовалась 90% воспроизводимостью (Cross-validation consistency) и точностью предсказания 74,53% (Testing balanced accuracy). Исходя из максимальных значений коэффициента перекрестной проверки и наименьшей ошибки предсказания, для данного анализа оптимальным межгенным

взаимодействием является трехкомпонентная модель *IL1β(+3953)*T, TNFA(-308)*A, IL6(-174)*G*, которая характеризуется коэффициентом перекрестной проверки 10/10 и точностью предсказания 73,44%. Возможности программы MDR позволяют представить в виде дендрограммы вклад каждого полиморфизма в риск развития СРК (рис. 1).

Длинные линии в дендрограмме описывают слабую взаимосвязь между генами. И, соответственно, чем короче линии, соединяющие два предиктора, тем сильнее взаимодействие. Нами было проанализировано межгенное взаимодействие генотипов в мультилокусных моделях. Информационную ценность отдельного маркера и взаимодействия пары генов мы оценили с помощью схемы Fruchterman–Rheingold (рис. 2).

Согласно схеме Fruchterman–Rheingold, из четырех анализируемых полиморфизмов (*IL1β(+3953)*T, TNFA(-308)*A, IL10(-1082)*G, IL6(-174)*G*) наибольшим предсказательным потенциалом обладает полиморфизм *IL6* – 12,73%. Остальные гены объясняют только 0,51, 2,05 и 1,08% энтропии соответственно. Вероятно, вклад *SNP -174 IL6* в развитие предрасположенности к СРК среди исследуемых генов является максимальным. Интересно, что данный полиморфизм имел наибольший предсказательный потенциал и для модели НЯК (11,37%), и его значение также было значительно выше, чем в контрольной группе (7,76%). На рисунке 2 отражена сила влияния отдельных генов на развитие заболевания с помощью показателя энтропии межфакторных взаимодействий. Наибольшее влияние имеют факторы с максимальным процентом энтропии. Полиморфные локусы *IL6(-174)*G* и *IL10(-1082)*G, TNFA(-308)*A* имеют сильный отрицательный эффект. Вероятно, данные межгенные взаимодействия в модели можно охарактеризовать как антагонистические. Умеренное синергичное взаимодействие наблюдается между генами *IL1β(+3953)*T* и *TNFA(-308)*A*.

ТАБЛИЦА 1. МОДЕЛИ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ СИНДРОМЕ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА

TABLE 1. MODELS OF INTERGENIC INTERACTIONS IN IRRITABLE BOWEL SYNDROME

Модель Model	Точность предсказания в обучающей выборке Training balanced accuracy	Точность предсказания в тестовой выборке Testing balanced accuracy	Воспроиз- водимость тестируемой модели CV consistency
<i>IL6(-174)*G</i>	0,6702	0,6702	10/10
<i>TNFA(-308)*A / IL6(-174)*G</i>	0,7014	0,6307	7/10
<i>IL-1(+3953)*T/TNFA(-308)*A / IL6(-174)*G</i>	0,7344	0,7344	10/10
<i>IL1β(+3953)*T/TNFA(-308)*A / IL10(-1082)*G/IL6(-174)*G</i>	0,7669	0,7453	9/10

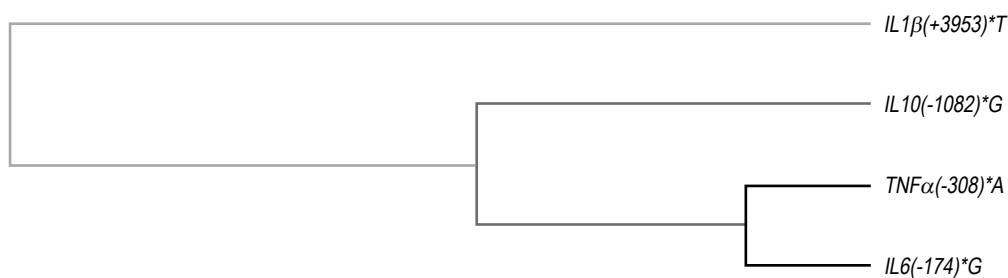


Рисунок 1. Дендрограмма межгенных взаимодействий

Figure 1. Dendrogram of intergenic interactions

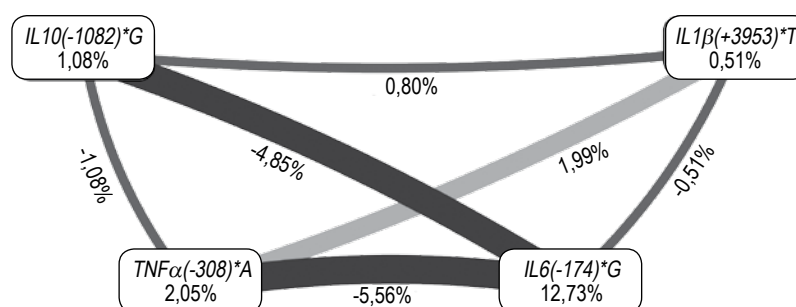


Рисунок 2. График энтропии (Fruchterman–Rheingold), отражающий межгенные взаимодействия в четырехлокусной модели $IL1\beta(+3953)*T/TNF\alpha(-308)*A/IL10(-1082)*G/IL6*G$

Figure 2. The graph of entropy (Fruchterman–Rheingold), reflecting intergenic interactions in the four-locus model $IL1\beta(+3953)*T/TNF\alpha(-308)*A/IL10(-1082)*G/IL6*G$

Установленное в нашем исследовании синергичное взаимодействие между *SNPs* $IL1\beta(+3953)*T$ и $TNF\alpha(-308)*A$ содержит аллели, отвечающие за высокопродуктивные варианты обоих цитокинов. Антагонистические взаимодействия $IL6(-174)*G$ и $TNF\alpha(-308)*A$, включающие аллели высокой продукции, могут быть объяснены тем, что, согласно литературным данным, IL-6 снижает экспрессию $TNF\alpha$. Особенностью данных генов является взаимодействие между их белковыми продуктами [10]. Продукция IL-6 активируется провоспалительными цитокинами (IL-1 и $TNF\alpha$), а подавляется белками-супрессорами опухоли (p53 и RB1) и гормонами-эстрогенами. Сам же IL-6 ингибирует продукцию IL-1 и $TNF\alpha$ и активирует противовоспалительные цитокины IL-1ra и IL-10 [10].

Заключение

Для всех включенных в исследование полиморфных вариантов генов *IL1*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6* существует большое количество противоречивых данных по их ассоциации с неспецифическим язвенным колитом и синдромом раздраженного кишечника [4, 5, 6, 8, 9].

Отдельные исследования показали ассоциацию *SNP* -1082G/A *IL10* с предрасположенностью к СРК у европеоидов, а *SNP* -592C/A *IL10* — у ази-

атов [8]. На роль генетических маркеров предрасположенности к НЯК претендуют *SNPs* в генах *IL1β*, -308 G/A *TNFA* [5, 9].

Следует отметить, что изучению межгенных взаимодействий генов *IL1*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6* в ассоциации с предрасположенностью к неспецифическому язвенному колиту и синдрому раздраженного кишечника посвящено очень мало исследований.

Проведенное исследование позволило установить, что из полиморфных вариантов генов *IL1*, *TNFα*, *IL1ra*, *IL10*, *IL6* полиморфизм -174G/C *IL6* может играть центральную роль и формировать межгенные взаимодействия с *SNPs* *IL1β*, *TNFα*, *IL10* в реализации предрасположенности к синдрому раздраженного кишечника у русских Челябинской области.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ректору ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», доктору психологических наук, профессору Д.А. Циринг, главному врачу ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови» Г.А. Рудаковой, кандидату медицинских наук, доценту кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии, доценту Т.А. Сусловой.

Список литературы / References

1. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В.С. Баранова. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. 528 с. [Genetic passport – the basis of individual and predictive medicine / Ed. V.S. Baranov]. St. Petersburg: Publishing House of N-L, 2009. 528 p.
2. Колчанов Н.А., Игнатьева Е.В., Подколотная О.А., Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г. Генные сети // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013. Т. 17, № 4/2. С. 833-850. [Kolchanov N.A., Ignatieva E.V., Podkolodnaya O.A., Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G. Gene networks. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2013, Vol. 17, no. 4/2, pp. 833-850. (In Russ.)]
3. Силивончик Н.Н., Пиманов С.И. Синдром раздраженного кишечника (по материалам Римского IV консенсуса по функциональным пищеварительным расстройствам) // Лечебное дело: научно-практический терапевтический журнал, 2017. № 3 (55). С. 23-29. [Silivonchik N.N., Pimanov S.I. Irritable bowel syndrome (of the Rome IV consensus for functional gastrointestinal disorders). *Lechebnoe delo: nauchno-prakticheskiy terapevticheskiy zhurnal* = *Medical Case: Scientific and Practical Therapeutic Journal*, 2017, no. 3 (55), pp. 23-29. (In Russ.)]
4. Сташкевич Д.С., Бурмистрова А.Л., Кобеляцкая А.А. Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов IL-1B, IL-6, TNFA у больных неспецифическим язвенным колитом русской популяции Челябинской области // Современные проблемы науки и образования (Электронный журнал), 2016. № 4. [Stashkevich D.S., Burmistrova A.L., Kobelyatskaya A.A. Polymorphism of the genes of the proinflammatory cytokines IL-1B, IL-6, TNFA in patients with ulcerative colitis of the Russian population of the Chelyabinsk region. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya (Elektronnyy zhurnal)* = *Modern Problems of Science and Education*, 2016, no. 4. (In Russ.)]
5. Barkhordari E, Rezaei N, Ansaripour B, Larki P, Alighardashi M, Ahmadi-Ashtiani H.R., Mahmoudi M., Keramati M.-R., Habibollahi P, Bashashati M., Ebrahimi-Daryani N., Amirzargar A.A. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 30, pp. 74-79.
6. Basso P.J., Fonseca M.T.C., Bonfa G., Alves V.B.F., Sales-Campos H., Nardini V., Cardoso C.R.B. Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2014, Vol. 47, pp. 727-737.
7. Hahn L.W., Ritchie M.D., Moore J.H. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics*, 2003, Vol. 19, pp 376-382.
8. Qin S.-Y., Jiang H.-X., Lu D.-H., Zhou Y. Association of interleukin-10 polymorphisms with risk of irritable bowel syndrome: A meta-analysis. *World J. Gastroenterol.*, 2013, Vol. 19, pp. 9472-9480.
9. Stankovic B., Dragasevic S., Popovic D., Zukic B., Kotur N., Sokic-Milutinovic A., Alempijevic T., Lukic S., Milosavljevic T., Nikcevic G., Pavlovic S. Variations in inflammatory genes as molecular markers for prediction of inflammatory bowel disease occurrence. *J. Dig. Dis.*, 2015, Vol. 16, pp. 723-733.
10. Tanaka T., Kishimoto T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. *Int. J. Biol. Sci.*, 2012, Vol. 8, pp. 1227-1236.

Авторы:

Сташкевич Д.С. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Беляева С.В. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Филиппова Ю.Ю. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Бурмистрова А.Л. — д.м.н., профессор, декан биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Stashkevich D.S., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Belyaeva S.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Filippova Yu. Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Burmistrova A.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Dean, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 03.03.2018

Отправлена на доработку 06.03.2018

Принята к печати 16.03.2018

Received 03.03.2018

Revision received 06.03.2018

Accepted 16.03.2018

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСБАЛАНС ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РАКЕ ЛЕГКОГО У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

Глушков А.Н.^{1,3}, Поленок Е.Г.¹, Гордеева Л.А.¹, Мун С.А.¹,
Костянко М.В.^{1,3}, Антонов А.В.², Титов В.А.², Вержбицкая Н.Е.⁴,
Вафин И.А.⁵

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

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

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

⁴ ГБУЗ КО ОТ «Кемеровское областное патологоанатомическое бюро», г. Кемерово, Россия

⁵ ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия

Резюме. Ранее были обнаружены ассоциации антител класса А, специфичных к бензо[а]пирену (IgA-Bp), эстрадиолу (IgA-Es) и прогестерону (IgA-Pg) с раком молочной железы (РМЖ) у женщин и с раком легкого (РЛ) у мужчин. Предположили, что IgA-Bp и IgA-Es стимулируют процессы инициации и промоции, а IgA-Pg ингибируют канцерогенез у человека в естественных условиях.

Цель исследования — выявить предполагаемые ассоциации иммунологического дисбаланса с РМЖ и РЛ у женщин в постменопаузе.

Исследовали сывороточные антитела класса А, специфичные к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону (IgA-Bp, IgA-Es и IgA-Pg) у 335 здоровых женщин, у 824 больных раком молочной железы (РМЖ) и 127 больных раком легкого (РЛ) с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа.

Превышение уровней IgA-Bp и IgA-Es над уровнями IgA-Pg ассоциировано с высоким риском РМЖ (OR = 2,8 и 2,4 соответственно, $p < 0,0001$) и высоким риском РЛ (OR = 2,9 и 2,8 соответственно, $p < 0,0001$). И наоборот, значения OR снижались до 0,3-0,4 для РМЖ и РЛ, если уровни IgA-Pg были больше, чем уровни IgA-Bp и IgA-Es ($p < 0,0001$). Это подтверждает предположение о том, что IgA-Bp и IgA-Es способны стимулировать, а IgA-Pg тормозить возникновение РМЖ и РЛ у женщин в постменопаузе. При этом баланс между IgA-Bp и IgA-Es с одной стороны и IgA-Pg с другой стороны имеет гораздо большее значение, чем содержание указанных антител каждого по отдельности.

Выявлен феномен «иммунологической интерференции» — взаимного усиления эффектов IgA-Bp и IgA-Es, стимулирующих процессы инициации и промоции канцерогенеза, при слабом антипро motorном действии IgA-Pg и ослабление взаимного проканцерогенного эффекта IgA-Bp и IgA-Es при выраженном действии IgA-Pg.

Ключевые слова: рак молочной железы, рак легкого, антитела, бензо[а]пирен, эстрадиол, прогестерон, канцерогенез

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, Л.А. Гордеева,
С.А. Мун, М.В. Костянко, А.В. Антонов, В.А. Титов,
Н.Е. Вержбицкая, И.А. Вафин «Иммунологический
дисбаланс при раке молочной железы и раке легкого
у женщин в постменопаузе» // Медицинская
иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 927-934.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-927-934

© Глушков А.Н. и соавт., 2018

For citation:

A.N. Glushkov, E.G. Polenok, L.A. Gordeeva, S.A. Mun,
M.V. Kostyanko, A.V. Antonov, V.A. Titov,
N.E. Verzhbitskaya, I.A. Vafin "Immunological imbalance
in breast cancer and lung cancer in postmenopausal women",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2018, Vol. 20, no. 6, pp. 927-934.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-927-934

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-927-934

IMMUNOLOGICAL IMBALANCE IN BREAST CANCER AND LUNG CANCER IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

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

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

^b Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^c Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

^d Regional Pathological Bureau, Kemerovo, Russian Federation

^e Regional Blood Transfusion Center, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Previous studies reported some associations between class A antibodies specific for benzo[a]pyrene (IgA-Bp), estradiol (IgA-Es) and progesterone (IgA-Pg) and breast cancer (BC) in women like as with lung cancer (LC) in men. It was suggested that IgA-Bp and IgA-Es may stimulate tumor initiation and promotion, whereas IgA-Pg may inhibit the *in vivo* human carcinogenesis.

The purpose of this study was to identify the suggested associations of such immunological imbalance with BC and LC in postmenopausal women.

The serum A-class antibodies specific to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone (IgA-Bp, IgA-Es, IgA-Pg) were studied in 335 healthy women, 824 breast cancer (BC) patients and 127 cases of lung cancer (LC) by means of non-competitive solid phase immunoassay. The following results were obtained: Increased ratio of IgA-Bp and IgA-Es amounts exceeding the IgA-Pg levels was associated with a higher risk of breast cancer (OR = 2.8 and 2.4 respectively, $p < 0.0001$), and higher risk of LC (OR = 2.9 and 2.8, respectively, $p < 0.0001$). Conversely, the OR values decreased to 0.3-0.4 for BC and LC if IgA-Pg levels were higher than IgA-Bp and IgA-Es levels ($p < 0.0001$). These findings confirm the hypothesis that IgA-Bp and IgA-Es are capable to stimulate, and IgA-Pg, to inhibit the BC and LC occurrence in postmenopausal women. The balance between IgA-Bp and IgA-Es, on the one hand, and IgA-Pg, on the other hand, is much more important than individual contents of these antibodies.

In conclusion, the phenomenon of “immunological interference” is revealed, i.e., the mutual enhancement of IgA-Bp and IgA-Es effects, thus, probably, stimulating the initial and subsequent events of carcinogenesis initiation and promotion, with a weak anticancer effect of IgA-Pg, and by weakening the mutual pro-carcinogenic effects of IgA-Bp and IgA-Es by the marked effect of IgA-Pg.

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

Работа выполнена в рамках проекта VI.59.1.1. Программы фундаментальных научных исследований СО РАН (гос. задание № 0352-2016-0001).

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) и рак легкого (РЛ) — наиболее распространенные в мире онкологические заболевания и причины смерти у женщин в постменопаузе [24]. Показана эффективность превентивного назначения селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов для профилактики РМЖ [18, 20, 23, 27]. Сформулирована стратегия применения антиэстрогенов при лечении РЛ [7]. Снижение смертности от РЛ обнаружено при лечении РМЖ антиэстрогенами [8]. Поэтому использование антиэстрогеновых препаратов и для профилактики РЛ у жен-

щин в постменопаузе представляется весьма перспективным.

В связи с вышеизложенным особое значение придается разработке информативных методов определения индивидуальных рисков возникновения РМЖ и РЛ. Известно, что пусковым механизмом малигнизации клеток (инициация канцерогенеза) является образование аддуктов ДНК с метаболитами химических канцерогенов окружающей среды [21] и эндогенных стероидов [10]. Кроме того, стероидные гормоны оказывают эпигеномное действие на пролиферацию клеток-мишеней в фазе промоции канцерогенеза [7, 19]. Поскольку макромолекулярные аддукты способны индуцировать синтез антител к соответствующим гаптенам, а сами антитела модулируют содержание в сыворотке и биологические эффекты

химических канцерогенов и стероидных гормонов у иммунизированных животных [9, 11, 15, 17, 22, 25], индивидуальные особенности образования специфических антител предположительно отражают индивидуальные особенности процессов инициации и промоции канцерогенеза у человека и, возможно, принимают в них активное участие.

Ранее обнаружили ассоциации антител класса А, специфичных к бензо[а]пирену (IgA-Bp), эстрадиолу (IgA-Es) и прогестерону (IgA-Pg) с РМЖ у женщин и с РЛ у мужчин [5, 6]. Предположили, что IgA-Bp и IgA-Es стимулируют процессы инициации и промоции, а IgA-Pg ингибируют канцерогенез у человека в естественных условиях [14]. Поэтому нарушение баланса между ингибирующими и стимулирующими антителами может быть более информативным показателем индивидуального риска РМЖ и РЛ.

Цель настоящего исследования — выявить предполагаемые ассоциации иммунологического дисбаланса с РМЖ и РЛ у женщин в постменопаузе.

Материалы и методы

В обследовании приняли участие 1286 женщин в постменопаузе. Из них 824 женщины с диагнозом «инвазивная карцинома молочной железы», 127 женщин с диагнозом «немелкоклеточный рак легкого» (НМРЛ), которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз РМЖ и НМРЛ в каждом случае был подтвержден морфологически. Средний возраст больных РМЖ составил $63,3 \pm 8,8$ года, больных НМРЛ — $62,1 \pm 7,0$. В группу сравнения были включены 335 здоровых женщин без патологии молочной железы и органов дыхания (средний возраст — $58,1 \pm 5,6$ лет). Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все женщины, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем.

Иммуноанализ АТ к Bp, Es и Pg класса А (IgA-Bp, IgA-Es, IgA-Pg) проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа, подробная методика описана в работе [2]. В качестве антигенов на полистирольные иммунологические планшеты были иммобилизованы конъюгаты Bp, Es и Pg с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Конъюгат Bp-BSA был синтезирован по методике, описанной в работе [2]. Конъюгат Es-BSA был синтезирован путем присоединения BSA к эстрадиолхинонам, получен-

ным окислением Es солью Фреми. Конъюгат Pg-BSA был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидроксипрогестерона и BSA карбодимидным способом. Иммунологические планшеты сенсibilизировали конъюгатами гаптен-BSA в течение ночи при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови в разведении 1:20 вносили по 100 мкл в лунки планшета в дублях, инкубировали 1 ч при 37 °С на шейкере. Связавшиеся АТ выявляли с помощью козьих АТ против IgA человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США), разведение конъюгата 1:10000. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (ТМБ, США), на фотометре (Пикон, Россия) при длине волны 450 нм. Уровни АТ выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

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

где X = Bp, Es, Pg; $\text{OD}_{\text{X-BSA}}$ — связывание АТ с конъюгатом гаптен-BSA, OD_{BSA} — фоновое связывание с BSA.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Ненормальный характер распределения показателей выявили с помощью критерия Шапиро–Уилка, и в дальнейшем для выявления различий между группами использовали непараметрический критерий χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность вариации. При расчете критерия χ^2 исследуемые признаки группировались в четырехпольную таблицу (d.f. = 1). Для выявления пороговых значений уровней АТ (cut-off) был проведен ROC-анализ [16]. Ассоциации исследуемых АТ с РМЖ и РЛ оценивали на основании величины отношения шансов (OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости. Для оценки влияния факторов курения и возраста на риски возникновения РМЖ или РЛ использовали лог-регрессию.

Результаты и обсуждение

Особый интерес к исследованию сывороточных антител класса А у человека обусловлен их потенциальными способностями: усиливать проникновение химических канцерогенов из окружающей среды через поверхностный эпителий, как это показано в экспериментах *in vitro* [12, 13]; модулировать содержание в сыворотке химических канцерогенов и стероидных гормонов у иммунизированных животных [9, 11, 15, 17, 22, 25]; проникать из сыворотки в эпителиальные клетки и переносить в них сывороточные канцерогены и гормоны.

В начале настоящей работы с помощью ROC-анализа мы рассчитали пограничные значения (cut-off) уровней исследуемых антител, по кото-

рым сравниваемые группы имели наибольшие различия: для IgA-Bp = 2, IgA-Es = 2, IgA-Pg = 2, для соотношений уровней антител IgA-Bp/IgA-Pg = 1, IgA-Es/IgA-Pg = 1. Выяснилось, что высокие уровни IgA-Bp у больных РМЖ встречались чаще, чем у здоровых женщин (65,7% против 54,9%, $p = 0,0008$). Высокие уровни IgA-Pg, наоборот, обнаруживались чаще у здоровых (62,4%), чем у больных РМЖ (54,4%, $p = 0,02$) и у больных НМРЛ (50,4%, $p = 0,03$). Сравнимые группы не различались по уровням IgA-Es (рис. 1).

Значительно более достоверные различия ($p < 0,0001$) проявились при анализе индивидуальных соотношений уровней IgA-Bp и IgA-Es к уровням IgA-Pg (позиции 1.1 и 1.2 в табл. 1). Превышение уровней IgA-Bp и IgA-Es над уровнями IgA-Pg оказалось ассоциированным с высоким риском РМЖ (OR = 2,8 и 2,4 соответственно) и высоким риском РЛ (OR = 2,9 и 2,8 соответственно). И наоборот, значения OR снижались до 0,3-0,4 для РМЖ и РЛ, если уровни IgA-Pg были больше, чем уровни IgA-Bp и IgA-Es. Это подтверждает предположение о том, что IgA-Bp и IgA-Es способны стимулировать, а IgA-Pg тормозить возникновение РМЖ и РЛ у женщин в постменопаузе. При этом баланс между IgA-Bp и IgA-Es с одной стороны и IgA-Pg с другой стороны имеет гораздо большее значение, чем содержание указанных антител каждого по отдельности.

Однако эти утверждения можно считать корректными только при определенных условиях. Анализ четырех возможных комбинаций указанных соотношений показал следующее. Сниже-

ние рисков РМЖ и РЛ до значений OR = 0,4 и 0,3 имело место только при одновременно низких уровнях IgA-Bp и IgA-Es по сравнению с индивидуальным уровнем IgA-Pg (комбинация 2.1). Частота обнаружения комбинаций 2.2 и 2.3, когда уровни IgA-Pg превышали таковые только IgA-Es, но не IgA-Bp, или только IgA-Bp, но не IgA-Es, оказалась сопоставимой в сравниваемых группах ($p > 0,05$). В то же время только одновременное повышение индивидуальных уровней и IgA-Bp, и IgA-Es над уровнем IgA-Pg (комбинация соотношений 2.4) было ассоциированным с высокими рисками РМЖ и РЛ (OR = 2,9 и 3,1).

С помощью лог-регрессии рассчитали риски РМЖ и РЛ с учетом факторов курения и возраста. Выяснилось, что значения OR для комбинаций соотношений исследуемых антител 2.1 и 2.4 остаются прежними, 0,3 и 3,1 ($p < 0,0001$) при этих заболеваниях. Вероятно, образование антител против химических канцерогенов и стероидных гормонов не зависит от канцерогенной нагрузки и происходит даже при минимальных количествах соответствующих аддуктов независимо от их локализации в органах и тканях. Индивидуальные особенности соотношений указанных антител и их комбинаций, очевидно, обусловлены иными конституциональными особенностями реакции иммунной системы на аддукты низкомолекулярных соединений с макромолекулами организма.

Таким образом, у 43,6% здоровых женщин (комбинация соотношений 2.1) стимулирующее действие IgA-Bp и IgA-Es на процессы инициации и промоции канцерогенеза в молочной же-

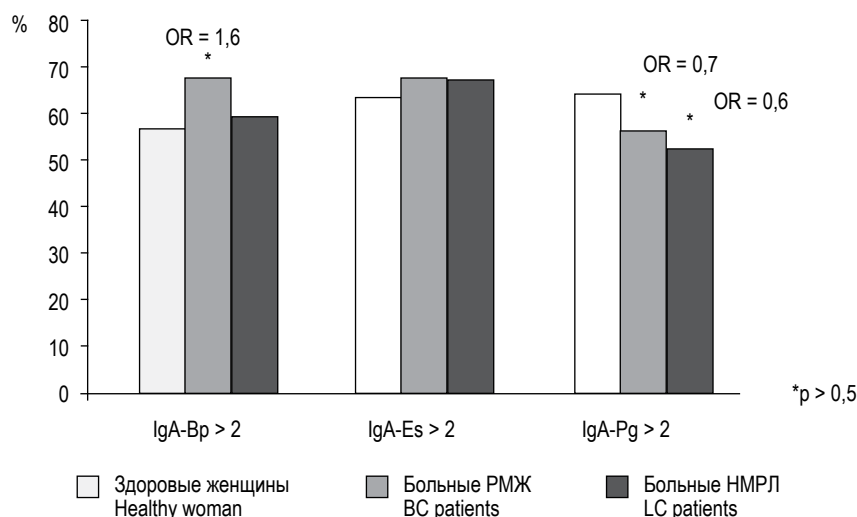


Рисунок 1. Частота встречаемости (%) высоких (> 2) уровней антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону (IgA-Bp, IgA-Es, IgA-Pg) у здоровых женщин, больных раком молочной железы (РМЖ) и раком легкого (НМРЛ)

Figure 1. Frequency (%) of high (> 2) antibodies levels to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone (IgA-Bp, IgA-Es, IgA-Pg) at the healthy women, breast cancer (BC) patients and patients with lung cancer (NSCL)

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО СЛУЧАЕВ (n) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ НИЗКИХ ($\leq$) И ВЫСОКИХ ($>$) СООТНОШЕНИЙ УРОВНЕЙ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ (IgA-Bp/IgA-Pg, IgA-Es/IgA-Pg), А ТАКЖЕ ВОЗМОЖНЫХ КОМБИНАЦИЙ ЭТИХ СООТНОШЕНИЙ У ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН, БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) И РАКОМ ЛЕГКОГО (НМРЛ)

TABLE 1. CASES QUANTITY (n) AND FREQUENCY (%) OF LOW ($\leq$) AND HIGH ($>$) RATIOS OF ANTIBODIES LEVELS TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE (IgA-Bp/IgA-Pg, IgA-Es/IgA-Pg), AND ALSO POSSIBLE COMBINATIONS OF THESE RATIOS AT THE HEALTHY WOMEN, BREAST CANCER (BC) PATIENTS AND PATIENTS WITH LUNG CANCER (NSCL)

Соотношения антител и их комбинации Antibody ratios and combinations thereof	Здоровые женщины Healthy women (n = 335)	Больные РМЖ BC patients (n = 824)	Больные НМРЛ NSLC patients (n = 127)	OR (95%CI) (p)	
	n/%	n/%	n/%	РМЖ	РЛ
1.1. IgA-Bp/IgA-Pg $\leq$ 1 IgA-Bp/IgA-Pg $>$ 1	207/61,8 128/38,2	304/36,9 520/63,1	45/35,4 82/64,6	0,4 (0,3-0,5) ($<$ 0,0001) 2,8 (2,1-3,6) ($<$ 0,0001)	0,3 (0,2-0,5) ($<$ 0,0001) 2,9 (1,9-4,5) ($<$ 0,0001)
1.2. IgA-Es/IgA-Pg $\leq$ 1 IgA-Es/IgA-Pg $>$ 1	185/55,2 150/44,8	281/34,1 543/65,9	39/30,7 88/69,3	0,4 (0,3-0,5) ($<$ 0,0001) 2,4 (1,8-3,1) ($<$ 0,0001)	0,4 (0,2-0,6) ($<$ 0,0001) 2,8 (1,8-4,3) ($<$ 0,0001)
2.1. IgA-Bp/IgA-Pg $\leq$ 1 IgA-Es/IgA-Pg $\leq$ 1	146/43,6	181/22,0	24/18,9	0,4 (0,3-0,5) ($<$ 0,0001)	0,3 (0,2-0,5) ($<$ 0,0001)
2.2. IgA-Bp/IgA-Pg $>$ 1 IgA-Es/IgA-Pg $\leq$ 1	39/11,6	100/12,1	15/11,8	(0,89)	(0,91)
2.3. IgA-Bp/IgA-Pg $\leq$ 1 IgA-Es/IgA-Pg $>$ 1	61/18,2	123/14,9	21/16,5	(0,19)	(0,78)
2.4. IgA-Bp/IgA-Pg $>$ 1 IgA-Es/IgA-Pg $>$ 1	89/26,6	420/51,0	67/52,8	2,9 (2,2-3,8) ($<$ 0,0001)	3,1 (2,0-4,7) ($<$ 0,0001)

Примечание. Пороговое значение для соотношения уровней антител к бензо[а]пирену и прогестерону IgA-Bp/IgA-Pg = 1, для соотношения уровней антител к эстрадиолу и прогестерону IgA-Es/IgA-Pg = 1.

Note. Threshold for antibodies ratio to benzo[a]pyrene and progesterone IgA-Bp/IgA-Pg = 1, for antibodies ratio to estradiol and progesterone IgA-Es/IgA-Pg = 1.

лезе и в легких полностью блокируется антипро-моторным действием высоких уровней IgA-Pg. Такое состояние можно обозначить как «протек-тивный антиканцерогенный иммунологический баланс». У 26,6% здоровых женщин совмест-ное стимулирующее действие высоких уровней IgA-Bp и IgA-Es превалирует над ингибирую-щим действием IgA-Pg (комбинация 2.4). Такое состояние можно обозначить как «проканцеро-генный иммунологический дисбаланс». Про-межуточные состояния (комбинации 2.2 и 2.3.) у 29,8% здоровых женщин можно обозначить как «компенсационный иммунологический ба-ланс», поскольку отдельные стимулирующие эф-фекты IgA-Bp или IgA-Es компенсируются инги-бирующим действием IgA-Pg.

Вся совокупность описанных состояний пред-ставляет собой феномен «иммунологической ин-терференции». В самом деле, слабо выраженные

ассоциации с РМЖ и РЛ каждого из исследуемых IgA-Bp и IgA-Es, по отдельности участвующих в процессах инициации и промоции канцерогене-за, значительно усиливаются при совместном подъеме их уровней и слабом антипромотормом влиянии IgA-Pg. И наоборот, совместное стиму-лирующее действие IgA-Bp и IgA-Es значитель-но подавляется превалирующим образованием IgA-Pg.

Обращает на себя внимание почти полная идентичность ассоциаций исследуемых антител с РМЖ и РЛ. Почему при одинаковых соотноше-ниях антител и их комбинациях у одних женщин возникает РМЖ, а у других РЛ? Наиболее веро-ятым (но, очевидно, не единственным) объяс-нением могут быть различия в экспрессии эстро-геновых рецепторов α и β в ткани РМЖ и РЛ, а также особенности их локализации в клетках, в ядре или в цитоплазме [1]. Кроме того, за рам-

ками настоящего исследования осталось участие в иммунологическом дисбалансе антиидиотических антител к Es и Pg, описанных нами ранее при РМЖ [4, 5], и к Bp при РЛ у мужчин [26].

Практическое значение полученных результатов состоит в расширении возможностей лабо-

раторной диагностики индивидуальных рисков возникновения РМЖ и РЛ у женщин в постменопаузе с помощью комплексного иммуноанализа антител класса А к Bp, Es и Pg для последующей профилактики, в том числе селективными модуляторами эстрогеновых рецепторов.

Список литературы / References

1. Богуш Т.А., Дудко Е.А., Беме А.А., Богуш Е.А., Ким А.И., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А., Давыдов М.И. Эстрогеновые рецепторы, антиэстрогены и немелкоклеточный рак легкого // Биохимия, 2010. Т. 75, № 12. С. 1633-1641. [Bogush T.A., Dudko E.A., Beme A.A., Bogush E.A., Kim A.I., Polotsky B.E., Tjuljandin S.A., Davydov M.I. Estrogen receptors, antiestrogens, and non-small cell lung cancer. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2010, Vol. 75, no. 12, pp. 1633-1641. (In Russ.)]
2. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А., Баканова М.Л., Минина В.И., Мун С.А., Ларин С.А., Костянко М.В. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные 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.)]
3. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Костянко М.В., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А., Рагожина С.Е. Ассоциации сывороточных антител к эстрадиолу с рецепторами эстрогенов в опухоли у больных раком молочной железы // Российский иммунологический журнал, 2016. Т. 10 (19), № 2. С. 166-173. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E., Vafin I.A., Ragozhina S.E. Associations of the serum antibodies to estradiol and the tumor estrogen receptors at the breast cancer patients. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2016, Vol. 10 (19), no. 2, pp. 166-173. (In Russ.)]
4. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Костянко М.В., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А., Рагожина С.Е. Антитела и анти-антитела к стероидным гормонам и риск рака молочной железы // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 577-584. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E., Vafin I.A., Ragozhina S.E. Antibodies and anti-antibodies to steroid hormones, and breast cancer risk. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 577-584. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2017-5-577-584.
5. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Костянко М.В., Титов В.А., Вафин И.А., Рагожина С.Е. Взаимное влияние антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону на риски возникновения рака легкого // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 3. С. 343-349. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Titov V.A., Vafin I.A., Ragozhina S.E. Mutual effects of antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone on the lung cancer risks. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 3, pp. 343-349. (In Russ.)]
6. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Магарилл Ю.А., Аносова Т.П., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е. Антитела к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону у больных раком молочной железы в постменопаузе // Сибирский онкологический журнал, 2016. Т. 15, № 6. С. 28-34. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Magarill Yu.A., Anosova T.P., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E. Antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone in the postmenopausal breast cancer women. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2016, Vol. 15, no. 6, pp. 28-34. (In Russ.)]
7. Давыдов М.И., Богуш Т.А., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А. Эстрогеновые рецепторы β – новая мишень в терапии немелкоклеточного рака легкого // Вестник РАМН, 2012. Т. 67, № 2. С. 16-22. [Davidov M.I., Bogush T.A., Polotsky B.E., Tyulyandin S.A. Estrogen receptors β – new target in cellular lung cancer treatment. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, Vol. 67, no. 2, pp. 16-22. (In Russ.)]
8. Bouchardy C., Benhamou S., Schaffar R., Verkooijen H.M., Fioretta G., Schubert H., Vinh-Hung V., Soria J.C., Vlastos G., Rapiti E. Lung cancer mortality risk among breast cancer patients treated with anti-estrogens. *Cancer*, 2011, Vol. 117, no. 6, pp. 1288-1295.
9. Caldwell B.V., Tillson S.A., Esber H., Thorneycroft I.H. Survival of tumors after immunization against estrogens. *Nature*, 1971, Vol. 231, no. 14, pp. 118-119.
10. Cavalieri E.L., Rogan E.G., Zahid M. Critical depurinating DNA adducts: Estrogen adducts in the etiology and prevention of cancer and dopamine adducts in the etiology and prevention of Parkinson's disease. *Int. J. Cancer*, 2017, Vol. 141, no. 6, pp. 1078-1090.
11. Černohorská H., Klimešová S., Lepša L., Jinoch P., Milcová A., Schmuczerová J., Topinka J., Lábaj J. Influence of immunization with non-genotoxic PAH-KLH conjugates on the resistance of organisms exposed to benzo[a]pyrene. *Mut. Res.*, 2012, Vol. 742, no. 1-2, pp. 2-10.

12. de Buck S.S., Augustijns P., Muller C.P. Specific antibody modulates absorptive transport and metabolic activation of benzo[a]pyrene across Caco-2 monolayers. *J. Pharmacol. Experim. Therap.*, 2005, Vol. 313, no. 2, pp. 640-646.
13. de Buck S.S., Schellenberger M.T., Ensich C., Muller C.P. Effects of antibodies induced by a conjugate vaccine on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone absorptive transport, metabolism, and proliferation of human lung cells. *Int. J. Cancer*, 2010, Vol. 127, no. 3, pp. 513-520.
14. Glushkov A.N., Polenok E.G., Ustinov V.A. Immunomodulation of human carcinogenesis by the blood serum antibodies to environmental carcinogens and endogenous steroids. *Open Immunol. J.*, 2016, Vol. 6, no. 3, pp. 67-72.
15. Grova N., Prodhomme E.J., Schellenberger M.T., Farinelle S., Muller C.P. Modulation of carcinogen bioavailability by immunisation with benzo[a]pyrene – conjugate vaccines. *Vaccine*, 2009, Vol. 27, no. 31, pp. 4142-4151.
16. 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.
17. 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.
18. LaCroix A.Z., Powles T., Osborne C.K., Wolter K., Thompson J.R., Thompson D.D., Allred D.C., Armstrong R., Cummings S.R., Eastell R., Ensrud K.E., Goss P., Lee A., Neven P., Reid D.M., Curto M., Vukicevic S. Breast cancer incidence in the randomized PEARL trial of lasofoxifene in postmenopausal osteoporotic women. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2010, Vol. 102, no. 22, pp. 1706-1715.
19. Mohammed H., Russell I.A., Stark R., Rueda O.M., Hickey T.E., Tarulli G.A., Serandour A.A., Birrell S.N., Bruna A., Saadi A., Menon S., Hadfield J., Pugh M., Raj G.V., Brown G.D., D'Santos C., Robinson J.L., Silva G., Launchbury R., Perou C.M., Stingl J., Caldas C., Tilley W.D., Carroll J.S. Progesterone receptor modulates ERα action in breast cancer. *Nature*, 2015, Vol. 523, no. 7560, pp. 313-317.
20. Rastogi P. Chemoprevention in postmenopausal women. *Menopause*, 2008, Vol. 15, no. 4, pp. 810-815.
21. Rundle A., Tang D., Hibshoosh H., Estabrook A., Schnabel F., Cao W., Grumet S., Perera F.P. The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis*, 2000, Vol. 21, no. 7, pp. 1281-1289.
22. Schwartz U., Dyrenfurth I., Khalaf S., Vande Wiele R.L., Ferin M. A comparison of the effects of active immunization of female rhesus monkeys to estradiol-17 or progesterone-20-protein conjugates. *J. Steroid Biochem.*, 1975, Vol. 6, no. 3-4, pp. 541-545.
23. Sestak I. Preventative therapies for healthy women at high risk of breast cancer. *Cancer Manag. Res.*, 2014, Vol. 6, pp. 423-430.
24. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.*, 2017, Vol. 67, no. 1, pp. 7-30.
25. Sundaram K., Tsong Y.Y., Hood W., Brinson A. Effect of immunization with estrone-protein conjugate in rhesus monkeys. *Endocrinology*, 1973, Vol. 93, no. 4, pp. 843-847.
26. Ustinov V.A., Matveeva V.A., Kostyanko M.V., Glushkov A.N., Antibodies against benzo[a]pyrene in immunized mouse and in lung cancer patients. *Exp. Oncol.*, 2013, Vol. 35, no. 3, pp. 207-210.
27. Vogel V.G. Role of hormones in cancer prevention. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book*, 2014, pp. 34-40.

Авторы:

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

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

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

Authors:

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

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

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

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

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

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

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

Вержбицкая Н.Е. — к.м.н., заведующая патологоанатомическим отделением ГБУЗ КО ОТ «Кемеровское областное патологоанатомическое бюро», г. Кемерово, Россия

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

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

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

Antonov A.V., Chief, Mammology Department, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

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

Verzhbitskaya N.E., PhD (Medicine), Chief, Pathology Department, Regional Pathological Bureau, Kemerovo, Russian Federation

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

Поступила 19.03.2018
Принята к печати 22.03.2018

Received 19.03.2018
Accepted 22.03.2018

СРАВНЕНИЕ ИФА С ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ И КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgG-АНТИТЕЛ К ЭРИТРОПОЭТИНУ ЧЕЛОВЕКА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Кудряшова А.М., Михайлова Н.А., Борисова О.В.

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

Резюме. Серьезной проблемой терапии препаратами рекомбинантного человеческого эритропоэтина является выработка антител к эритропоэтинстимулирующим препаратам, приводящая к изменению фармакокинетического профиля и снижению эффективности терапии. При длительном лечении препаратами эритропоэтина в редких случаях может происходить выработка нейтрализующих антител, приводящих к полной аплазии красного костного мозга. Определение антител к терапевтическим препаратам эритропоэтина является важным этапом оценки их иммуногенности на этапах доклинических и клинических исследований, а также в ходе терапии препаратами эритропоэтина. Проведено сравнение методов выявления специфических IgG-антител к эритропоэтину человека твердофазным иммуноферментным методом с применением колориметрической и хемилюминесцентной детекции, в системах 3,3',5,5'-тетраметилбензидин — пероксид водорода и люминол — пероксид водорода соответственно. Выявление антител проводили в сыворотках крови экспериментальных животных — кроликов и морских свинок — полученных после введения животным разных доз препаратов пегилированного человеческого рекомбинантного эритропоэтина подкожно или внутривенно. В качестве контроля использовали аффинно очищенные поликлональные антитела кролика к эритропоэтину человека. Исследовано влияние концентрации перекиси водорода и люминола на чувствительность хемилюминесцентного метода. Показано, что при использовании для усиления хемилюминесценции 4-йодофенола наблюдается повышение чувствительности в 1,5–2 раза. Сравнение интенсивности хемилюминесценции во времени показало большую стабильность во времени для субстратной смеси, приготовленной на боратном буфере. Снижение хемилюминесцентного сигнала во времени было пропорционально снижению фонового сигнала, что делало соотношение сигнал/фон стабильным в течение 3–30 мин. В результате оптимизации состава субстратной смеси и условий проведения регистрации интенсивности хемилюминесценции минимальное количество аффинно очищенных поликлональных антител кролика к эритропоэтину человека, выявленных в методе с хемилюминесцентной детекцией, составило 0,08 нг/мл, а с колориметрической детекцией — 0,6 нг/мл. Диапазон измерений при этом был расширен более чем в 20 раз. При выявлении специфических IgG антител к эритропоэтину человека в сыворотках крови экспериментальных животных методом с хемилюминесцентной детекцией показано увеличение чувствительности, определяемое путем сравнения

Адрес для переписки:

Кудряшова Александра Михайловна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15.
Тел.: 8 (495) 674-54-97.
E-mail: 2238250@rambler.ru

Address for correspondence:

Kudryashova Alexandra M.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
115088, Russian Federation, Moscow,
1st Dubrovskaya str., 15.
Phone: 7 (495) 674-54-97.
E-mail: 2238250@rambler.ru

Образец цитирования:

А.М. Кудряшова, Н.А. Михайлова, О.В. Борисова
«Сравнение ИФА с хемилюминесцентной и колориметрической детекцией для выявления специфических IgG-антител к эритропоэтину человека в сыворотках крови экспериментальных животных» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 935–942. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-935-942
© Кудряшова А.М. и соавт., 2018

For citation:

A.M. Kudryashova, N.A. Mikhailova, O.V. Borisova
“Comparison of colorimetric and chemiluminescent ELISA tests for detection of IgG antibodies to human EPO in the sera of experimental animals”, Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 935–942.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-935-942
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-935-942

индексов позитивности анализируемых образцов, в 1,9-2,6 раза в сыворотках кроликов и в 1,8-8,9 раза в сыворотках морских свинок. Выявлена корреляция при количественном определении анти-тел в сыворотках кроликов двумя методами ($R = 0,981$). Таким образом, хемилюминесцентный метод детекции позволил повысить чувствительность выявления IgG-антител к эритропоэтину человека твердофазным иммуноферментным методом.

Ключевые слова: хемилюминесценция, рекомбинантный эритропоэтин, твердофазный ИФА, антитела к эритропоэтину, люминол, иммуногенность

COMPARISON OF COLORIMETRIC AND CHEMILUMINESCENT ELISA TESTS FOR DETECTION OF IgG ANTIBODIES TO HUMAN EPO IN THE SERA OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Kudryashova A.M., Mikhailova N.A., Borisova O.V.

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

Abstract. Production of antibodies to erythropoietin-stimulating drugs is an important problem of therapy with recombinant human erythropoietin (EPO). It leads to changes in the pharmacokinetic profile and decreased therapeutic efficiency. Upon long-term treatment with EPO preparations, neutralizing antibodies can result in rare cases, thus leading to complete pure red cell aplasia. Hence, detection of antibodies to EPO is an important stage in the assessment of the drug immunogenicity in preclinical and clinical studies, as well as during the treatment with EPO. We have compared colorimetric and chemiluminescent ELISA tests for detection of IgG antibodies to human EPO with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine – hydrogen peroxide and luminol –hydrogen peroxide detection systems, respectively. Antibodies to human EPO were determined in blood serum samples of experimental animals, i.e., rabbits and guinea pigs following their immunization with different doses of pegylated human recombinant EPO-beta subcutaneously or intravenously. The affinity-purified rabbit polyclonal antibodies to human EPO were used as a reference material. The effects of hydrogen peroxide and luminol concentrations upon sensitivity of a chemiluminescent method were also studied. We have shown a 1.5-2-fold increase in sensitivity when using 4-iodophenol for amplification of chemiluminescence. A comparison of the chemiluminescence intensity with time has demonstrated a better stability for the substrate mixture prepared on borate buffer. A decrease in chemiluminescence signal with time was proportional to the decrease in background signal, thus rendering stability of the signal/background ratio for 3 to 30 minutes. Due to optimizing the substrate mixture composition and conditions of chemiluminescence recording, the reached detection limits for colorimetric and chemiluminescent ELISA's were, respectively, 0.6 ng/ml and 0.08 ng/ml. The measurement range was extended by more than 20 times for chemiluminescent ELISA. The chemiluminescent ELISA for anti-erythropoietin antibody detection showed a 1.9 to 2.6-fold increase in sensitivity for rabbit serum, and 1.8 to 8.9-fold for guinea pigs serum. Good correlation of results was found for quantitative detection of antibodies in rabbit sera using the two methods ($R = 0.981$). Thus, chemiluminescent ELISA allowed develop a more sensitive detection technique of IgG antibodies to human erythropoietin.

Keywords: chemiluminescence, recombinant erythropoietin, ELISA, antibodies to EPO, luminol, immunogenicity

Введение

Препараты рекомбинантного человеческого эритропоэтина (рчЭПО) используют для лечения пациентов с эритропоэтиндефицитными анемиями. Серьезной проблемой такой терапии является выработка антител к эритропоэтинстимулирующим препаратам, приводящая к изменению фармакокинетического профиля и снижению эффективности лечения. При длительном приеме препаратов эритропоэтина может происходить выработка нейтрализующих антител, спо-

собных перекрестно реагировать с эндогенным эритропоэтином, что приводит к редкому, но тяжелому осложнению – полной аплазии красного костного мозга (ПАККМ). Определение антител к терапевтическим препаратам эритропоэтина является важным этапом оценки их иммуногенности на этапах доклинических и клинических исследований, а также в ходе терапии препаратами эритропоэтина [1, 4, 5]. Основная задача заключается в определении антител в образцах сывороток в максимально низких концентрациях как основном моменте в понимании причин

снижения терапевтической эффективности препаратов эритропоэтина и диагностики ПАКМ на ранних стадиях. Наиболее часто для определения антител к эритропоэтину используется твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), как метод, обладающий высокой чувствительностью и доступностью. В ряде исследований показано, что замена ИФА с колориметрической детекцией на хемилюминесцентную имела ряд преимуществ [6, 8], в том числе и для выявления антител к чЭПО [7].

Целью данной работы было сравнение методов выявления специфических IgG-антител к эритропоэтину человека ИФА с применением колориметрической и хемилюминесцентной детекции.

Материалы и методы

3,3',5,5'-тетраметилбензидин, люминол, р-гидроксикоричная кислота (Fluka); 4-йодофенол и 4-фенилфенол (Sigma), стрептавидин («Сорбент-сервис», Москва). Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Milli-Q System, Millipore, США). Для проведения ИФА использовали 96-луночные планшеты, прозрачные для колориметрической детекции (Costar) и белые непрозрачные для хемилюминесцентной (Nunc). Эритропоэтин рекомбинантный человеческий (рчЭПО, Shandong Kexing Bioproducts), аффинно очищенные антитела кролика к эритропоэтину человека (ПАТ кролика к чЭПО, ООО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург), антитела козы к IgG кролика (H+L), конъюгированные с пероксидазой (Thermo Scientific), антитела кролика к IgG морской свинки, конъюгированные с пероксидазой (Thermo Scientific).

Сыворотки крови экспериментальных животных — кроликов и морских свинок — предоставлены Биофармацевтической компанией ООО «ФОРТ», Москва, Россия. Сыворотки получены после введения животным препаратов ПЭГ-ЭПО (пэгилированный рчЭПО-β) [3] и метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтина бета (Мирцера®, Hoffmann-La Roche Inc.) в течение 28 дней один раз в неделю подкожно (кролики) и внутривенно (кролики и морские свинки) в дозе 2,5 мкг/кг и 5 мкг/кг и последующего забора крови через 14 дней после последней инъекции (в каждую группу входило от 3 до 8 экспериментальных животных).

Оптическую плотность измеряли на аппарате BioRadModel 680. Для регистрации результатов люминесценции использовали микропланшетный детектор Varioskan Flach (Thermo Scientific).

Инкубацию планшета проводили на термостатируемом планшетном встряхивателе (ELMI SkyLine) при режиме 500 об/мин и температуре

37 °С. После всех инкубаций проводили отмывку планшет на планшетном промывателе (StatFax).

Выявление антител к чЭПО в сыворотках экспериментальных животных проводили прямым методом твердофазного иммуноферментного анализа.

В 96-луночные планшеты вносили по 100 мкл рчЭПО в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,6 в концентрации 5 мкг/мл. Планшеты выдерживали в течение 19-22 часов при температуре (4-8) °С и на 1 час вносили блокирующий раствор-0,02 М фосфатный буферный раствор pH 7,2, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Твин 20. Далее вносили поликлональные антитела кролика к чЭПО или образцы сывороток животных в разведении 1:50 в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Twin 20. После инкубации в течение 45 минут и отмывки вносили по 100 мкл конъюгированных с пероксидазой антител козы к IgG кролика (H+L) либо антител кролика к IgG морской свинки в разведении 1:15 соответственно. Повторяли этап инкубирования и вносили по 100 мкл 33мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

При хемилюминесцентной детекции, после осуществления иммунологических реакций в белых непрозрачных планшетах, вносили субстратную смесь по 100 мкл в каждую лунку, выдерживали 5 минут при режиме встряхивания 500 об/мин и проводили измерение. Эмиссию света с поверхности каждой лунки регистрировали в течение 10 мс.

В каждом случае проводили подбор параметров ИФА с целью достижения максимальной чувствительности и специфичности. Чувствительность определения оценивалась двумя способами:

— сравнивали значения индексов позитивности анализируемых сывороток, определяемые как отношение S образца/ S порог, где S порог = $Scp.K. + 3\sigma$, где $Scp.K.$ — среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для нормальной пулированной сыворотки экспериментальных животных (6-10 повторов);

— чувствительность (предел обнаружения) определяли как количество антител к эритропоэтину, при котором S образца/ S порог = 1.

При колориметрической детекции $S = ОП$, где ОП — оптическая плотность; при хемилюминес-

центной — $S = I$, где I — интенсивность люминесценции.

Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения OriginPro 9.1 (64-bit) SR3 b87 (OriginLabCorporation). Результаты для каждой группы экспериментальных животных выражали как среднее S образца/ S порог. $\pm$ стандартное отклонение (σ). Критерий Манна–Уитни использовали для сравнения результатов, полученных для разных условий эксперимента. Величина $p \leq 0,05$ рассматривалась как статистически значимая.

Результаты

На первой стадии работы проведена оптимизация определения пероксидазы с помощью хемилюминесцентной реакции в системе люминол — пероксид водорода, усиленной фенольными соединениями, при определении ПАТ кролика к чЭПО.

Исследованы субстратные буферные смеси с содержанием разных концентраций люминола в диапазоне 0,05–10 мМ и пероксида водорода в диапазоне 20–0,3 мМ (рис. 1). Полученные результаты показали колоколообразную зависимость индекса позитивности от концентрации перекиси водорода с максимумом около 0,6 мМ. При этом уменьшение индекса позитивности при концентрации H_2O_2 выше 0,6 мМ связано с сильным ростом фонового сигнала. При оптимальной концентрации перекиси водорода максимальное отношение S образца/ S порог. наблюдалось при концентрации люминола 0,1 мМ. Соответственно,

концентрации люминола 0,1 мМ и пероксида водорода 0,6 мМ в дальнейшем использовали в настоящей работе при приготовлении субстратной буферной смеси для хемилюминесцентной детекции сигнала.

Для усиления хемилюминесценции исследованы: p -гидроксикоричная кислота, 4-йодофенол и 4-фенилфенол [9, 10]. Наибольшая интенсивность хемилюминесцентного сигнала и повышение чувствительности в 1,5–2,0 раза достигнуты с использованием 4-йодофенола в концентрации 0,62 мМ (диапазон концентраций 4 мМ — 0,03 мМ). Уменьшение концентрации 4-йодофенола приводило к резкому падению хемилюминесцентного сигнала, а увеличение — к росту фонового сигнала.

В данной работе для приготовления субстратной буферной смеси сравнивали два буферных раствора: боратный буфер, pH 9,6 и Tris-буфер, pH 8,6. Время измерения интенсивности хемилюминесцентного сигнала было исследовано в диапазоне 0–30 мин (рис. 2). Сопоставление двух вариантов показало большую стабильность во времени для субстратной смеси, приготовленной на боратном буфере. При этом снижение хемилюминесцентного сигнала было пропорционально снижению фонового сигнала, что делало соотношение S образца/ S порог. стабильным в течение 3–30 мин. В данной работе измерения интенсивности сигнала проводили через 5 минут.

Определение уровня антител к чЭПО в сыворотках кроликов. На рисунке 3 (А, Б) представле-

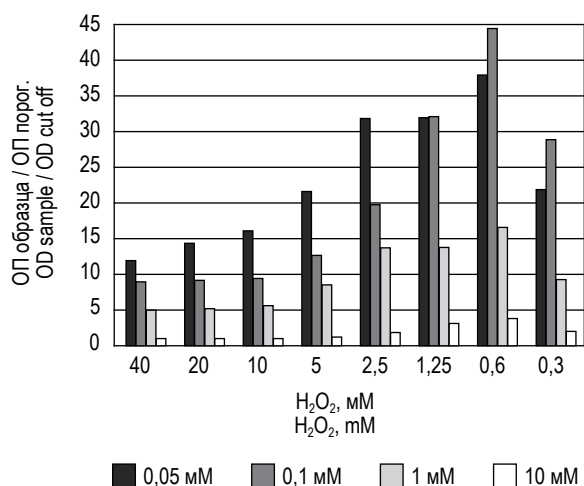


Рисунок 1. Подбор оптимальных концентраций соотношения люминол (0,05–10 мМ) – пероксид водорода

Figure 1. Selection of optimal concentrations ratio of luminol (0.05–10 mM) – hydrogen peroxide

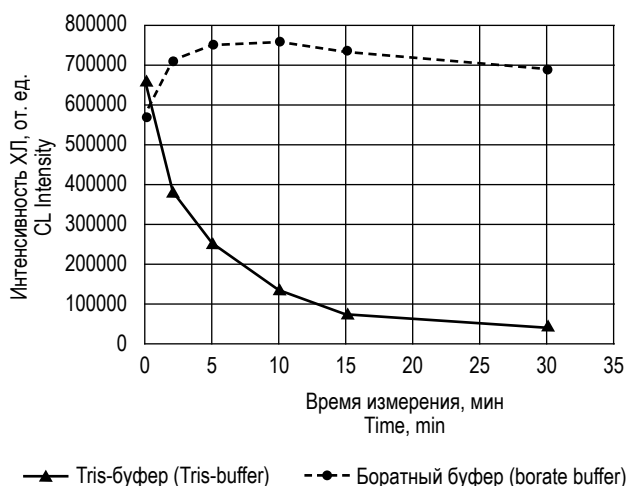


Рисунок 2. Сравнение во времени интенсивности хемилюминесценции при использовании для приготовления субстратной смеси различных буферных растворов

Figure 2. Comparison of buffer solutions for preparation of substrate mixture and intensity in time

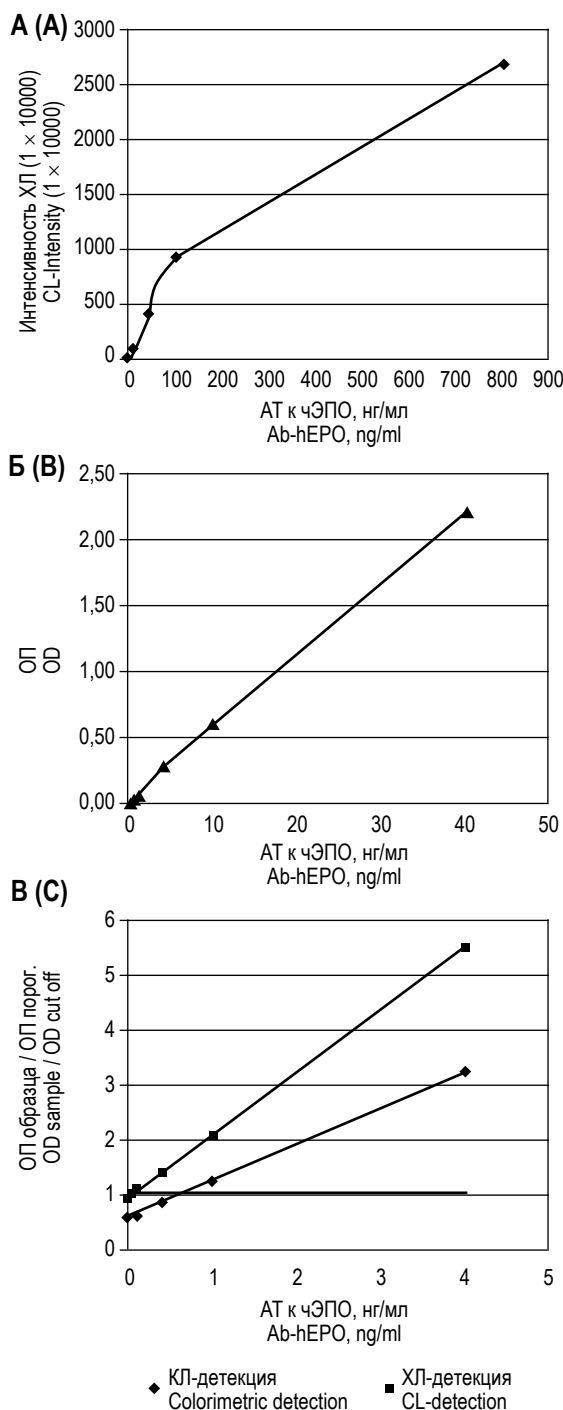


Рисунок 3. Сравнение диапазона калибровочных графиков для ИФА с колориметрической (А) и хемилюминесцентной (Б) детекцией. Сравнение графиков зависимости сигнала от концентрации для ИФА с колориметрической и хемилюминесцентной детекцией в диапазоне низких концентраций антител с указанием линии отсечения предела обнаружения (В)

Figure 3. Comparison of the range of calibration graphs for ELISA with colorimetric (A) and chemiluminescent (B) detection. Comparison of graphs of dependence of the signal on the concentration for the ELISA with colorimetric and chemiluminescent detection in the range of low concentrations of antibodies indicating the cut-off line detection limit (C)

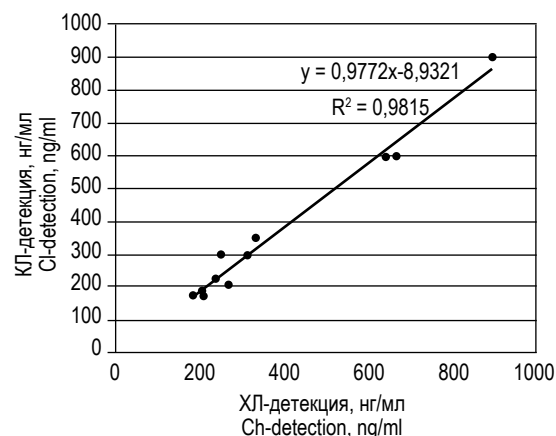


Рисунок 4. Результаты корреляции для двух типов ИФА при определении АТ к чЭПО в сыворотках кроликов

Figure 4. The results of correlation for the two types of ELISA in detection the antibody to the chEPO in the sera of rabbits

ны зависимости интенсивности детектируемого сигнала от концентрации аффинно очищенных поликлональных антител кролика к эритропоэтину человека в диапазоне 0,08-800 нг/мл для хемилюминесцентной детекции и 0,6-40 нг/мл для колориметрической детекции соответственно. Чувствительность, определенная как концентрация антител к эритропоэтину, при которой отношение сигнала к пороговому значению равнялась единице, составила 0,6 нг/мл при колориметрическом и 0,08 нг/мл при хемилюминесцентном методе детекции, результаты представлены на рисунке 3 (В). Контроль воспроизводимости в рамках одной постановки проводили, определяя концентрацию антител в 3 образцах с различным уровнем антител в восьми повторах, коэффициент вариации при колориметрическом методе детекции составлял 5,5-8%, при хемилюминесцентном – 9-12%.

Исследованы три группы сывороток экспериментальных кроликов при разной дозе и способе введения препаратов. В таблице 1 представлены средние значения индексов позитивности, полученные для исследуемых образцов.

В результате установлено, что для ИФА с хемилюминесцентной детекцией значения индексов позитивности в 1,9-2,6 раза превышали значение аналогичных показателей при проведении колориметрической детекции.

На рисунке 4 показана корреляция содержания антител к эритропоэтину, полученных при проведении ИФА с хемилюминесцентной и колориметрической детекцией и рассчитанных по калибровочным графикам, аналогичным приведенным на рисунке 3 (А, Б). Полученная корреляция выражается линейной зависимостью с коэффициентом детерминации $R = 0,981$.

ТАБЛИЦА 1. ИНДЕКС ПОЗИТИВНОСТИ АНАЛИЗИРУЕМЫХ СЫВОРОТОК КРОЛИКОВ ДЛЯ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ (КЛ) И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ (ХЛ) ДЕТЕКЦИИ

TABLE 1. THE INDEX OF POSITIVITY OF THE ANALYZED SERA OF RABBITS FOR COLORIMETRIC AND CHEMILUMINESCENT DETECTION

Препарат, доза Drug, dose	КЛ Среднее значение $\pm \sigma$ Colorimetric average value $\pm \sigma$	ХЛ Среднее значение $\pm \sigma$ Chemiluminescent average value $\pm \sigma$	р-значение p value
ПЭГ-ЭПО 2,5 мкг/кг (подкожно) PEG-EPO 2.5 μ g/kg (subcutaneously) n = 3	2,8 $\pm$ 0,26	5,4 $\pm$ 1,24	0,05
ПЭГ-ЭПО 5,0 мкг/кг (подкожно) PEG-EPO 5.0 μ g/kg (subcutaneously) n = 3	5,3 $\pm$ 1,3	12,0 $\pm$ 2,16	0,05
«Мирцера» 5,0 мкг/кг (подкожно) "Mircera" 5.0 μ g/kg (subcutaneously) n = 4	2,1 $\pm$ 0,01	5,4 $\pm$ 0,9	0,05

Примечание. Достигнутый уровень значимости р указывается для критерия Манна–Уитни в каждой группе животных.

Note. The achieved significance level p is indicated for the Mann–Whitney test in each group of animals.

ТАБЛИЦА 2. ИНДЕКС ПОЗИТИВНОСТИ АНАЛИЗИРУЕМЫХ СЫВОРОТОК МОРСКИХ СВИНОК ПРИ ПОДКОЖНОМ И ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ ДЛЯ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ (КЛ) И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ (ХЛ) ДЕТЕКЦИИ

TABLE 2. INDEX OF POSITIVITY OF THE ANALYZED GUINEA PIG SERA IN SUBCUTANEOUS AND INTRAVENOUS ADMINISTRATION FOR COLORIMETRIC AND CHEMILUMINESCENT DETECTION

Препарат, доза Drug, dose	КЛ Среднее значение $\pm \sigma$ Colorimetric average value $\pm \sigma$	ХЛ Среднее значение $\pm \sigma$ Chemiluminescent average value $\pm \sigma$	р-значение p value
ПЭГ-ЭПО 2,5 мкг/кг (подкожно) PEG-EPO 2.5 μ g/kg (subcutaneously) n = 7	0,6 $\pm$ 0,06	1,1 $\pm$ 0,19	0,01
ПЭГ-ЭПО 5,0 мкг/кг (подкожно) PEG-EPO 5.0 μ g/kg (subcutaneously) n = 8	1,5 $\pm$ 0,26	8,7 $\pm$ 2,3	0,001
ПЭГ-ЭПО 2,5 мкг/кг (внутривенно) PEG-EPO 2.5 μ g/kg (intravenously) n = 6	6,9 $\pm$ 0,45	61,6 $\pm$ 4,6	0,01
ПЭГ-ЭПО 5,0 мкг/кг (внутривенно) PEG-EPO 5.0 μ g/kg (intravenously) n = 7	4,8 $\pm$ 0,69	32,5 $\pm$ 5,8	0,01

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Определение уровня антител к ЭПО в сыворотках морских свинок

В таблице 2 представлены сравнительные данные по определению индекса позитивности для сывороток, показывающие, что при определении уровня антител к эритропоэтину при проведении ИФА с колориметрической и хемилюминесцентной детекцией более высокая чувствительность наблюдалась при хемилюминесцентной детекции (табл. 2).

Обсуждение

Основными преимуществами хемилюминесцентного метода являются широкий динамический диапазон, высокая чувствительность и полная совместимость с протоколом твердофазного иммуноферментного метода, широко используемого в клинической лабораторной диагностике. В качестве метки в иммуноферментном анализе широко применяют пероксидазу хрена, методы получения и стабилизации конъюгатов с которой хорошо изучены. Пероксидазу хрена чаще всего определяют колориметрически, но изучено также определение пероксидазы с помощью хемилюминесцентной реакции в системе люминол — пероксид водорода, усиленной фенольными соединениями. В настоящей работе проведено сравнение методов выявления специфических IgG антител к эритропоэтину человека твердофазным иммуноферментным методом с применением колориметрической детекции и хемилюминесцентной детекции, в системах 3,3',5,5'-тетраметилбензидин — пероксид водорода и люминол — пероксид водорода соответственно. Оптимизация состава субстратной смеси и условий проведения регистрации интенсивности хемилюминесценции позволили повысить чувствительность выявления специфических IgG-антител к эритропоэти-

ну человека. Так, предел обнаружения аффинно очищенных поликлональных антител кролика чЭПО был уменьшен в 4,5 раза, а диапазон измерений расширен более чем в 20 раз при замене колориметрической детекции на хемилюминесцентную. При выявлении специфических IgG-антител к эритропоэтину человека в сыворотках крови экспериментальных животных — кроликов и морских свинок — методом с хемилюминесцентной детекцией показано достоверное увеличение чувствительности, определяемое при сравнении индексов позитивности анализируемых образцов: во всех группах образцов наблюдалось увеличение индекса позитивности в 1,8-8,9 раза. В группе морских свинок с введением препарата эритропоэтина в дозировке 2,5 мкг/кг (подкожно) антитела были обнаружены только при ИФА с хемилюминесцентной детекцией.

При хемилюминесцентном методе детекции сопоставимая чувствительность была получена при использовании приготовленной в лаборатории субстратной смеси, а также коммерческой буферной субстратной смеси SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific.

Таким образом, хемилюминесцентный метод детекции с использованием системы люминол — пероксид водорода в присутствии 4-йодофенола повысил чувствительность выявления IgG-антител к эритропоэтину человека твердофазным иммуноферментным методом.

Благодарности

Авторы статьи выражают благодарность биофармацевтической компании ООО «ФОРТ» за предоставленный эритропоэтин рекомбинантный человеческий и сыворотки экспериментальных животных.

Список литературы / References

1. Herrington W., Wieser C., Rosenkranz A.R. Pure red cell aplasia after treatment of renal anaemia with epoetin theta. *Clin. Kidney J.*, 2013, Vol. 5, no. 6, pp. 539-542.
2. Kamidate T., Maruya M., Tani H., Ishida A. Application of 4-iodophenol-enhanced luminolchemiluminescence to direct detection of horseradish peroxidase encapsulated in liposomes. *Anal. Sci.*, 2009, Vol. 9, no. 25, pp. 1163-1166.
3. Lonshakov D.V., Sheremet'ev S.V., Belosludtseva E.M., Korovkin S.A., Semchenko A.V., Katlinskij A.V. Synthesis of 4-aminobenzoic acid esters of polyethylene glycol and their use for pegylation of therapeutic proteins. *RSC Adv.* 2015, Vol. 5, no. 53, pp. 42903-42909.
4. Macdougall I.C., Roger S.D., de Francisco A., Goldsmith D.J., Schellekens H., Ebberts H., Jelkmann W., London G., Casadevall N., Hörl W.H., Kemeny D.M., Pollock C. Antibody-mediated pure red cell aplasia in chronic kidney disease patients receiving erythropoiesis stimulating agents: new insights. *Kidney Int.*, 2012, Vol. 8, no. 81, pp. 727-732.
5. Macdougall I.C., Casadevall N., Locatelli F., Combe C., London G.M., di Paolo S., Kribben A., Fliser D., Messner H., McNeil J., Stevens P., Santoro A., de Francisco A.L., Percheson P., Potamianou A., Foucher A., Fife D., Mérit V., Vercammen E. Incidence of erythropoietin antibody-mediated pure red cell aplasia: the Prospective Immunogenicity Surveillance Registry (PRIMS). *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2015, Vol. 3, no. 30, pp. 451-460.
6. Wang F., Driscoll D., Richardson D., Ambrogelly A. The comparison of chemiluminescent- and colorimetric-detection based ELISA for Chinese Hamster ovary host cell proteins quantification in biotherapeutics fengqiang. *J. Bioprocess. Biotechnol.*, 2013, Vol. 3, no. 3, pp. 1-7.

7. Wang W., Lu Y., Zhang S., Wang S., Cao P., Tian Y., Zhang X. Development of a chemiluminescent imaging assay for the detection of anti-erythropoietin antibody in human sera. *Luminescence*, 2009, Vol. 1, no. 24, pp. 55-61.
8. Wayne O., Scalarone H., Scalarone G.M. Comparison of colorimetric and chemiluminescent ELISAs for the detection of antibodies to *Blastomyces dermatitidis*. *J. Med. Biol. Sci.*, 2009, Vol. 3, no. 1, 2009, pp. 1-6.
9. Yang L., Jin M., Du P., Chen G., Zhang C., Wang J. Jin F., Shao H., She Y., Wang S., Zheng L., Wang J. Study on enhancement principle and stabilization for the luminol-H₂O₂-HRP chemiluminescence system. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 7, e0131193. doi: 10.1371/journal.pone.0131193.

Авторы:

Кудряшова А.М. — младший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Михайлова Н.А. — д.м.н., профессор, заместитель директора по науке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Борисова О.В. — к.х.н., заведующая лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Kudryashova A.M., Junior Research Associate, Laboratory of Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Mikhailova N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Borisova O.V., PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 19.03.2018
Принята к печати 22.03.2018

Received 19.03.2018
Accepted 22.03.2018

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

Абасеева Т.Ю.	871	Калинина Е.П.	855	Панкратенко Т.Е.	871
Антонов А.В.	927	Калинина Н.М.	815	Поленок Е.Г.	927
Антонюк М.В.	913	Карпунина Т.И.	825	Романова Н.А.	797
Арефьева А.С.	807	Кнышова В.В.	855, 913	Семерник О.Е.	905
Бабаян А.А.	807	Кологривова И.В.	833	Серебряная Н.Б.	785
Беляева С.В.	921	Костяно М.В.	927	Серегин Ю.А.	797
Бодиенкова Г.М.	895	Кошельская О.А.	833	Старкова К.Г.	899
Борисова О.В.	935	Кречетова Л.В.	807	Сташкевич Д.С.	921
Бощенко А.А.	833	Кудряшова А.М.	935	Степанова Е.О.	807
Бунятян К.А.	877	Куртасова Л.М.	865	Суслова Т.Е.	833
Бурмистрова А.Л.	921	Курчевенко С.И.	895	Тарасова И.А.	877
Бусырев Ю.Б.	825	Лебеденко А.А.	905	Титов В.А.	927
Вафин И.А.	927	Лобанова Н.В.	797	Трубачева О.А.	833
Вержбицкая Н.Е.	927	Ломтатидзе Л.В.	847	Тюрина Е.Б.	905
Винницкая И.В.	833	Мазунина А.А.	899	Федосеева Е.А.	855
Виткина Т.И.	855, 913	Малиновская В.В.	847	Филиппова Ю.Ю.	921
Вороница Е.В.	797	Машкина Е.В.	905	Фомичева Е.Е.	785
Ворошилова Т.М.	815	Минеева Е.Е.	913	Хайдуков С.В.	847
Гвозденко Т.А.	855, 913	Мироманов А.М.	889	Цховребов А.Т.	877
Гельцер Б.И.	913	Миронова Н.А.	889	Чиненова Л.В.	815
Глушков А.Н.	927	Миронова О.Б.	889	Чудилова Г.А.	847
Годвалов А.П.	825	Михайлова Н.А.	935	Шакина Н.А.	865
Гордеева Л.А.	927	Москалец О.В.	871	Шанин С.Н.	785
Давыдова Н.И.	815	Мун С.А.	927	Шестаков А.Л.	877
Долгих О.В.	899	Нгуен Тхи Зуеу Лен	847	Шкурат Т.П.	905
Донцова Т.В.	807	Нестерова И.В.	847	Шмидт А.Р.	865
Дрейзина Т.К.	905	Николаева М.А.	807	Юренко А.В.	913
Иккес Л.А.	865	Новгородцева Т.П.	855, 913	Якуцени П.П.	785
Инвизьева Е.В.	877	Отавина Е.А.	899	Яхин И.Р.	797
Казакова О.А.	899	Павлович С.В.	807		
Калашникова А.А.	815				

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адалимуаб	798	канцерогенез	927	сепсис	816
аллотрансплантат	807	классические моноциты	816	СРК	922
антитела	927	комплекс интегральных		стронций	899
антитела к эритропоэтину	936	показателей	825	субпопуляции моноцитов	816
апоптоз	899	комplement	872	твердофазный ИФА	936
атипичный гемолитико-уремический		лейкоцитарный индекс интоксикации ..	825	тип иммунного ответа	914
синдром	872	лейкоциты	865	торакоабдоминальные	
АТФ	786	липидные медиаторы	786	вмешательства	878
белок теплового шока 70	895	люминол	936	трансформация иммунофенотипа ...	848
бензо[а]пирен	927	маркеры гиперчувствительности	899	тромбоциты	786
беременность	807	мегакарициты	786	фагоцитоз	899
бронхиальная астма	905, 914	межгенные взаимодействия	922	фактор некроза опухоли-α	798
вирус Эпштейна–Барр	865	метаболическая подготовка		фенотип	914
висцеральное ожирение	834	углеводами	878	хемилюминесценция	936
воспаление	816, 914	металлопротеиназы	905	хирургический стресс	878
генетика	905	метод сокращения многофакторной		хроническая обструктивная болезнь	
генетический полиморфизм	922	размерности	922	легких	855
гены	889	микрочастицы	786	хронический травматический	
голимумаб	798	моноклональные антитела	798	остеомиелит	889
дети	872, 905	нейтрофильные гранулоциты	848	цертолизумаб	798
диагностика	905	НЯК	922	циклоферон	865
диастилическая дисфункция	834	ожирение	914	цитокиновый баланс	825
иммунная регуляция	899	пациенты с ВБ	895	цитокиновый профиль	914
иммунный статус	878	переломы	889	цитокины	816, 878, 895, 922
иммуногенность	936	переходные моноциты	816	чувствительность	865
иммуноглобулины	899	пластика пищевода	878	эксперимент <i>in vitro</i>	848
иммунологическая толерантность ...	807	полиморфизм	889	экспрессия	889
иммунореактивность	895	полиморфизм гена	905	экулизумаб	872
ингибиторный рецептор	807	привычный выкидыш	807	эстрадиол	927
индекс воспалительной активности ...	825	прогестерон	927	этанерцепт	798
индекс иммунореактивности	825	рак легкого	927	CD200	807
индексная оценка	825	рак молочной железы	927	FoxP3 ⁺ T-регуляторные лимфоциты ...	834
инсулинорезистентность	834, 878	растворимые молекулы адгезии	872	IL-4	889
интерферон-альфа	865	рекомбинантный эритропоэтин	936	IL-6 сигналинг	855
инфекционный мононуклеоз	865	ремиссия	872	T-лимфоциты-хелперы 1-го типа ...	834
инфликсимаб	798	рецепторы	786	T-лимфоциты-хелперы 17-го типа ...	834
		сахарный диабет 2-го типа	834	Th-зависимый тип иммунного ответа ...	855