

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

январь-февраль

2019, том 21

№ 1

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 серозидемиологии, 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

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

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

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197136, Санкт-Петербург, а/я 58.

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

© Медицинская иммунология

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

Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

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

Издательство «Человек»

199004, Россия, Санкт-Петербург, Малый пр. В.О., 26, оф. 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 17.01.2019 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 24,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 866

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

199178, Санкт-Петербург, 8-я линия В.О., 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.

Пинегин Борис Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунодиагностики и иммунокоррекции ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Симбирцев Андрей Семенович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Смирнов Вячеслав Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель Медико-биологического научно-производственного комплекса «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

Халдосяниди 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

January-February

2019, volume 21

No. 1

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 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

199004, Russian Federation, St. Petersburg, Malyy ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 17.01.2019. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 24,25. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

199178, Russian Federation, St. Petersburg, 8 line of Vasilevsky Island, 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

Передовая

Недоспасов С.А.

НОБЕЛЕВСКИЕ ПРЕМИИ 2018 г. ПО МЕДИЦИНСКОЙ ИММУНОЛОГИИ	7
---	---

Обзоры

Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П.

ТРОМБОЦИТЫ КАК АКТИВАТОРЫ И РЕГУЛЯТОРЫ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ.

ЧАСТЬ 2. ТРОМБОЦИТЫ КАК УЧАСТНИКИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ	9
--	---

Михайлова В.А., Баженов Д.О., Белякова К.Л., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НК-КЛЕТОК. ВЗГЛЯД ЧЕРЕЗ ПРИЗМУ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ

21

Ширинский В.С., Казыгашева Е.В., Ширинский И.В.

ВОСПАЛЕНИЕ И ИММУНИТЕТ: РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТЕОАРТРИТА	39
--	----

Оригинальные статьи

Равв М.Б., Литвинова Л.С., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмов П.В., Заморина С.А.

РОЛЬ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β 1-ГЛИКОПРОТЕИНА В РЕГУЛЯЦИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-КЛЕТОК ИММУННОЙ ПАМЯТИ

49

Чикилева И.О., Шубина И.Ж., Самойленко И.В., Караулов А.В., Киселевский М.В.

ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ К CTLA-4 И PD-1 НА СОДЕРЖАНИЕ ИХ РЕЦЕПТОРОВ МИШЕНЕЙ	59
---	----

Барило А.А., Смирнова С.В., Смольникова М.В.

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА	69
---	----

Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзиковецкий Д.Э., Медведев А.Ю., Гвоздев И.И.

ЗАВИСИМОСТЬ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА НЕЙТРОФИЛОВ ОТ СОСТОЯНИЯ ИХ МЕТАБОЛИЗМА У БОЛЬНЫХ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ ОСТРОГО ДЕСТРУКТИВНОГО ПАНКРЕАТИТА

77

Трушина Е.Ю., Костина Е.М., Молотиллов Б.А., Типикин В.А., Баранова Н.И.

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ	89
--	----

Ганковская Л.В., Намазова-Баранова Л.С., Порядин Г.В., Греченко В.В., Ганковский В.А., Алексеева А.А., Салмаси Ж.М.,

Казимирский А.Н., Брагвадзе Б.Г., Свитич О.А.

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ	99
---	----

Басина В.В., Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Эсауленко Е.В., Тотолян Арег А.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ CXCR3 И CCR6 И ИХ ЛИГАНДОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С ВО ВРЕМЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕГИЛИРОВАННЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ	107
--	-----

Ширинский И.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский В.С.

ПЛЕИОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ СИМВАСТАТИНА И ФЕНОФИБРАТА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ:

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	121
----------------------------------	-----

Колесникова О.В., Петренко Т.И., Колпакова Т.А., Труфакин В.А.

ЭФФЕКТЫ ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО СТАТУСА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ

БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ	129
-----------------------------------	-----

Краткие сообщения

Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Кривцов А.В., Старкова К.Г., Отавина Е.А.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ АПОПТОЗА В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТАБИЛЬНЫМ СТРОНЦИЕМ	137
---	-----

Попова Т.Е., Шнайдер Н.А., Петрова М.М., Таппахов А.А.

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 β В РАЗВИТИИ ПРЕИМУЩЕСТВЕННО СЕНСОРНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩЕЙ ПОЛИНЕВРОПАТИИ

141

Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Ситникова А.В., Бармина С.Э.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ	149
---	-----

Смирнова О.В., Каспаров Э.В., Перелечай Я.И., Несытых А.А., Беляев В.С.

ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ

У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ В ДИНАМИКЕ	157
---	-----

Старкова К.Г., Долгих О.В., Отавина Е.А., Безрученко Н.В., Гусельников М.А., Мазунина А.А.

МАРКЕРЫ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ АЛЮМИНИЯ	165
--	-----

Хроника

Корнева Е.А., Петяева А.В., Федоткина Т.В., Чурилов Л.П., Шенфельд И.

ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ АУТОИММУНОЛОГИИ В МИРЕ (ПО МАТЕРИАЛАМ 11-ГО МЕЖДУНАРОДНОГО КОНГРЕССА В ЛИССАБОНЕ 16-20 МАЯ 2018 ГОДА). СООБЩЕНИЕ I: ПЕРВАЯ АКАДЕМИЯ АУТОИММУНИТЕТА

171

Юбилей	189
--------------	-----

Правила для авторов	191
---------------------------	-----

Авторский указатель	194
---------------------------	-----

Предметный указатель	194
----------------------------	-----

CONTENTS

Editorial

Nedospasov S.A. NOBEL PRIZE IN MEDICAL IMMUNOLOGY IN 2018.....	7
---	---

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 2. THROMBOCYTES AS PARTICIPANTS OF IMMUNE REACTIONS.....	9
Mikhailova V.A., Bazhenov D.O., Belyakova K.L., Selkov S.A., Sokolov D.I. DIFFERENTIATION OF NK CELLS. A LOOK THROUGH THE PRISM OF TRANSCRIPTION FACTORS AND INTRACELLULAR MESSENGERS.....	21
Shirinsky V.S., Kazygashova E.V., Shirinsky I.V. INFLAMMATION AND IMMUNITY: A ROLE OF PATHOGENESIS OF OSTEOARTHRITIS	39

Original articles

Rayev M.B., Litvinova L.S., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Zamorina S.A. THE ROLE OF PREGNANCY-SPECIFIC GLYCOPROTEIN IN REGULATION OF MOLECULAR GENETIC DIFFERENTIATION MECHANISMS OF IMMUNE MEMORY T CELLS.....	49
Chikileva I.O., Shubina I.Zh., Samoylenko I.V., Karaulov A.V., Kiselevsky M.V. INFLUENCE OF ANTIBODIES AGAINST CTLA-4 AND PD-1 UPON QUANTITIES OF THEIR TARGET RECEPTORS	59
Barilo A.A., Smirnova S.V., Smolnikova M.V. AGE-DEPENDENT INDEXES OF IMMUNITY IN THE PATIENTS WITH PSORIATIC ARTHRITIS	69
Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetskiy D.E., Medvedev A.Yu., Gvozdev I.I. DEPENDENCE OF NEUTROPHIL RESPIRATORY BURST ON THEIR METABOLIC STATE IN THE PATIENTS WITH ACUTE DESTRUCTIVE PANCREATITIS OF DIFFERENT SEVERITY	77
Trushina E.Yu., Kostina E.M., Molotilov B.A., Tipikin V.A., Baranova N.I. ROLE OF IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 CYTOKINES IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE	89
Gankovskaya L.V., Namazova-Baranova L.S., Poriadin G.V., Grechenko V.V., Gankovsky V.A., Alekseeva A.A., Salmashi Zh.M., Kazimirsky A.N., Bragvadze B.G., Svitich O.A. CHANGES OF INNATE IMMUNITY INDEXES IN SEVERE ASTHMA IN CHILDREN.....	99
Basina V.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Lyubimova N.E., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Totolian Areg A. EXPRESSION PATTERNS OF CHEMOKINE RECEPTORS CXCR3 AND CCR6, AND THEIR LIGANDS IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C DURING ANTIVIRAL THERAPY USING PEGYLATED INTERFERONS	107
Shirinsky I.V., Kalinovskaya N.Yu., Shirinsky V.S. PLEIOTROPIC EFFECTS OF SIMVASTATIN AND FENOFIBRATE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS: A COMPARATIVE STUDY.....	121
Kolesnikova O.V., Petrenko T.I., Kolpakova T.A., Trufakin V.A. EFFECTS OF PSYCHOPHYSIOLOGICAL NEUROTHERAPY IN REGULATION IMMUNE RESPONSE COMBINED WITH STANDARD ANTITUBERCULOSIS DRUG THERAPY IN ACUTE PULMONARY TUBERCULOSIS	129

Short communications

Dolgikh O.V., Zaitseva N.V., Dianova D.G., Krivtsov A.V., Starkova K.D., Otavina E.A. EXPERIMENTAL MODELING OF APOPTOSIS UNDER CONDITIONS OF STABLE STRONTIUM EXPOSURE.....	137
Popova T.E., Shnayder N.A., Petrova M.M., Tappakhov A.A. THE ROLE OF INTERLEUKIN 1 β GENE POLYMORPHISM IN DEVELOPMENT OF PREDOMINANTLY SENSORY CHRONIC INFLAMMATORY DEMYELINATING POLYNEUROPATHY	141
Churina E.G., Urazova O.I., Novitsky V.V., Sitnikova A.V., Barmina S.E. FUNCTIONAL POLYMORPHISM OF THE PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE GENES IN PULMONARY TUBERCULOSIS	149
Smirnova O.V., Kasparov E.V., Perepechay Ya.I., Nesytykh A.A., Belyaev V.S. FEATURES OF NEUTROPHIL CHEMILUMINESCENCE IN THE PATIENTS WITH ADVANCED RECTAL CANCER	157
Starkova K.G., Dolgikh O.V., Otavina E.A., Bezruchenko N.V., Guselnikov M.A., Mazunina A.A. HYPERSENSITIVITY MARKERS IN CHILDREN UNDER ENVIRONMENTAL ALUMINUM EXPOSURE	165

Chronicle

Korneva E.A., Petyaeva A.V., Fedotkina T.V., Churilov L.P., Shoenfeld Ye. SYNOPSIS AND PROSPECTS OF AUTOIMMUNOLOGY DEVELOPMENT WORLDWIDE (AFTER THE MATERIALS OF THE 11 th INTERNATIONAL CONGRESS IN LISBON, MAY 16-20, 2018). PROCEEDING I: FIRST ACADEMY OF AUTOIMMUNITY	171
---	-----

Anniversary	189
-------------------	-----

Instructions to Authors	191
-------------------------------	-----

Author index	194
--------------------	-----

Subject index.....	194
--------------------	-----

НОБЕЛЕВСКИЕ ПРЕМИИ 2018 г. ПО МЕДИЦИНСКОЙ ИММУНОЛОГИИ

Недоспасов С.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

1 октября 2018 г. Джеймсу Эллисону (James Patrick Allison) и Тасуку Хондзэ (Tasuku Honjo) (рис. 1) были присуждены Нобелевские премии в номинации «Физиология или медицина» за пионерские работы, приведшие к успехам в иммунотерапии рака. Оракулы давно предсказывали премию Эллисону «за иммунологические чек-пойнты». Не ясно было только одно: в какой комбинации эту премию дадут — с кем?

Джеймс Эллисон — американец, выдающийся специалист в Т-клеточной иммунологии, много лет изучавший молекулярные механизмы передачи сигнала в Т-лимфоцитах, в частности образование иммунологического синапса. Его работы 80-90-х годов прошлого века, несомненно, относятся к фундаментальной молекулярной иммунологии.

В 90-е годы Эллисон стал изучать (открытый не им — см. [2]) рецептор CTLA-4 на Т-клетках, который ингибировал главный иммунологический «сигнал 2», за счет того, что конкурировал с классическим рецептором костимуляции CD28 за связывание с CD80 (B-7) [7]. Без этого сигнала Т-лимфоциты не активируются и не могут выполнять свои эффекторные функции. Были получены блокирующие моноклональные антитела к CTLA-4, обработка которыми приводила к активации Т-клеток. Более того, еще в 1995 г. было показано, что в экспериментальных раковых моделях на мышах такие антитела проявляют яркий противоопухолевый эффект [8]. Эти работы сначала привели к новой концепции «иммунологических контрольных точек», а затем и к революции в иммунотерапии опухолей (см. обзор [1]). Примерно через 10 лет на основании открытия лаборатории Эллисона фармацевтическими компаниями было сделано лекарство «Ипилимумаб» — гуманизированное моноклональное антитело против CTLA-4 человека, которое хотя и не вылечило рак, но добавило новую важную модальность в практической онкологии. В этот момент Дж. Эллисон временно переехал в Нью-Йорк и возглавил программу, которая научно руководила первыми клиническими испытаниями. Следует подчеркнуть, что этот компонент терапии не персонализирован — CTLA-4 у всех одинаков, но его можно в будущем комбинировать с персонифицированными реагентами, такими как CAR, или клеточной терапией, такой как адаптивный перенос Т-лимфоцитов.



Рисунок 1. Нобелевские лауреаты по физиологии и медицине 2018 года

Слева Джеймс Эллисон (James Patrick Allison) и справа Тасуку Хондзэ (Tasuku Honjo). Фото с сайтов www.chron.com и www.asahi.com.

В отличие от Дж. Эллисона, специалиста по Т-лимфоцитам, второй лауреат — японский иммунолог Т. Хондзэ — классик В-клеточной иммунологии.

Его лаборатория примерно 30 лет назад открыла и охарактеризовала несколько очень важных молекул (например, IL-4 и IL-5), самая интересная и оригинальная из которых — дезаминаза AID (activation-induced deaminase). Без нее невозможно понять, как переключаются классы антител и как происходит созревание аффинитета антител в ходе иммунного ответа. AID и ее фундаментальное значение для иммунологии — абсолютно «нобелевские», но свою премию Т. Хондзэ получил не за нее. Тут отчасти дело в том (если кто не знает), что при изучении механизма действия AID лаборатория Хондзэ много лет движется в перпендикулярном направлении по сравнению со всей остальной фундаментальной В-клеточной иммунологией! И не быть ему нобелевским лауреатом, если бы много лет назад его лаборатория не проклонила рецептор PD-1 [5]. Этот рецептор во внутриклеточной части содержит классический ITIM и относится к категории ингибирующих рецепторов, функционально похожих на CTLA-4, хотя у него другой молекулярный механизм действия. Открытие этого рецептора (а затем и его лиганда PD-1L (B-7H) [4, 6], т.е. молекулы, которая передает сигнал через рецептор) привело к созданию новых лекарств, основанных на терапевтических антителах (в частности, Ниволумаба), которые в клинических испытаниях оказались еще более эффективны, чем пионерский Ипилимумаб [1]. Поскольку CTLA-4 и PD-1 используют разные механизмы ингибирования, то комбинация лекарств Ипилимумаба и Ниволумаба показала



Рисунок 2. Лауреаты Нобелевской премии по химии 2018 года

Слева Джордж Смит (George P. Smith) и справа Грег Винтер (Gregory P. Winter). Фото с сайта www.sciencenews.org.

терапевтический синергизм при лечении некоторых видов рака. Надо подчеркнуть, что клинические результаты с блокаторами PD-1 и PD-1L были получены существенно позже таковых с анти-CTLA-4. И открытию роли этих молекул в качестве иммунологических контрольных точек предшествовали концептуальные работы Эллисона. Повезло Хондзё? Можно сказать и так, но ведь везет талантливым и упорным!

Но это еще не все. На следующий день, 2 октября 2018 г., присудили Нобелевскую премию по химии. И при внимательном рассмотрении оказалось, что Джордж Смит (George P. Smith) и Грегори Винтер (Gregory P. Winter) (рис. 2), лауреаты премии по химии, тоже иммунологи, точнее — молекулярные иммунобиотехнологи!

Смит и Винтер внесли решающий вклад в разработку фагового дисплея — одной из са-

мых успешных и инновационных скрининговых технологий современности [3, 9]. Причем у Дж. Смита еще 50 лет назад была диссертация про антитела, т.е. он полноправный молекулярный иммунолог.

А Г. Винтер, который в 70-е годы участвовал в разработке метода секвенирования ДНК «по Сэнгеру», стал молекулярным иммунологом и иммунобиотехнологом позже, когда он организовал компанию и применил новый метод в создании терапевтических гуманизированных антител.

Интересно, что если Дж. Смит помещал на поверхность нитчатых фагов фрагменты антигенов, то Г. Винтер догадался помещать туда фрагменты антигенсвязывающих участков антител, после чего оптимизированные по связыванию домены могли быть вставлены в структуру «улучшенного» полноразмерного антитела. Отметим, что фаговый дисплей после процедуры скрининга, которая основана на белок-белковых взаимодействиях, позволяет сразу перейти на генный уровень, используя ДНК соответствующего нитчатого бактериофага.

Г. Винтер принял участие в создании одного из самых успешных лекарств антицитокиновой терапии — адалимумаба (блокатора TNF), с помощью которых в мире лечатся миллионы больных ревматоидным артритом, болезнью Бехтерева и некоторыми аутовоспалительными заболеваниями.

Итак, список иммунологов, отмеченных Нобелевскими премиями, пополнился в 2018 г. целыми четырьмя единицами. Так случилось, что я лично знаю трех из этих четырех лауреатов и готов при случае о них рассказать подробнее.

Список литературы

1. Боголюбова А.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Иммуноterapia опухолей, основанная на блокировке иммунологических контрольных «точек» («чекпойнтов») // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 395-406.
2. Brunet J.F., Denizot F., Luciani M.F., Roux-Dosseto M., Suzan M., Mattei M.G., Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily – CTLA-4. *Nature*, 1987, Vol. 328, pp. 267-270.
3. Clackson T., Hoogenboom H.R., Griffiths A.D., Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 1991, Vol. 352, pp. 624-628.
4. Freeman G.J., Long A.J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Fitz L.J., Malenkovich N., Okazaki T., Byrne M.C., Horton H.F., Fouser L., Carter L., Ling V., Bowman M.R., Carreno B.M., Collins M., Wood C.R., Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, pp. 1027-1034.
5. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.*, 1992, Vol. 11, pp. 3887-3895.
6. Iwai Y., Ishida M., Tanaka Y., Okazaki T., Honjo T., Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, Vol. 99, pp. 12293-12297.
7. Krummel M.F., Allison J.P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.*, 1995, Vol. 182, pp. 459-465.
8. Leach D.R., Krummel M.F., Allison J.P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 1996, Vol. 271, pp. 1734-1736.
9. Smith G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, Vol. 228, pp. 1315-1317.

ТРОМБОЦИТЫ КАК АКТИВАТОРЫ И РЕГУЛЯТОРЫ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ. ЧАСТЬ 2. ТРОМБОЦИТЫ КАК УЧАСТНИКИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ

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. Тромбоцитам принадлежит ведущая роль в сопряжении тромбоза, воспаления и врожденных иммунных реакций. Тромбоциты устанавливают стабильное адгезионное взаимодействие с иммунными клетками. Активированные тромбоциты экспрессируют CD40L (CD154), мембранный гликопротеин семейства фактора некроза опухоли (TNF), причем тромбоциты представляют собой главный источник sCD40L в плазме крови. Тромбоцитарный CD154 может взаимодействовать с рецептором CD40 на эндотелии, вызывая воспалительный ответ, и В-лимфоцитах, усиливая продукцию ими иммуноглобулинов. CD154 тромбоцитов в комплексе с другими сигналами может вызвать созревание и активацию дендритных клеток (ДК). Тромбоциты обладают функциональными рецепторами TLR2, TLR4, TLR7 и TLR9. На тромбоцитах присутствуют Fc-рецепторы, в том числе FcγRIIA, FcεRI и FcαRI. FcγRIIA на тромбоцитах может вовлекать их в защиту от бактерий. Перекрестная связь FcαRI на тромбоцитах приводит к продукции ими протромботических и провоспалительных медиаторов, таких как тканевой фактор и IL-1β. Активация тромбоцитов через FcεR1 вызывает высвобождение хемокина RANTES и серотонина, которые способствуют провоспалительному ответу других иммунных клеток. Тромбоциты обладают рецепторами для активированных компонентов комплемента (CR2, CR3, CR4, C1qR) и C1-ингибитора, факторов D и H. Активированные тромбоциты способствуют активации системы комплемента через высвобождение протеинкиназ и АТФ, а также путем фосфорилирования C3 и C3b. В α-гранулах тромбоцитов хранятся хемокины, которые представляют и самую многочисленную группу антимикробных белков тромбоцитов (киноцидины), а в цитоплазме тромбоцитов имеется антимикробный белок семейства дефензинов – hBD-1. Продуктами тромбоцитов, относящимися к семейству цитокинов и их рецепторов, признаны лиганд и рецептор суперсемейства TNF (TRAIL и LIGHT), хемокин SDF-1 (CXCL12), интерлейкины IL-1β, IL-8 и растворимый рецептор IL-6 (sRIL-6). Белок HMGB-1, классифицированный как воспалительный цитокин, экспрессируется в активированных тромбоцитах и вызывает формирование нейтрофилами внеклеточных ловушек. Тромбоциты являются источником многочисленных факторов роста, включая EGF-α и EGF-β1, EGF-β2, TGF-α и TGF-β1, TGF-β2, PDGF, HGF, FGF-β, IGF, про- и антианги-

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 2. Тромбоциты как участники иммунных реакций»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 9–20.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-9-20
© Серебряная Н.Б. и соавт., 2019

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 2. Thrombocytes as participants of
immune reactions”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 9–20.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-9-20
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-9-20

огенные факторы, например VEGF-F и ангиопоэтины Ang-1 и Ang-2. Реализация иммунных функций тромбоцитов осуществляется при их взаимодействии с лейкоцитами, которые привлекаются к месту инфекции и воспаления и удерживаются при формировании «иммунного тромба» в условиях высокого напряжения сдвига. Тромбоциты могут не только поддерживать и направлять иммунный ответ, но и инициировать его. Они способны презентировать антиген в контексте молекул МНС I класса и активировать наивные CD8⁺T-лимфоциты. В обзоре рассмотрены некоторые последствия взаимодействия тромбоцитов с нейтрофилами, моноцитами, дендритными клетками и лимфоцитами.

Ключевые слова: тромбоциты, хемокины, антимикробные белки, нейтрофилы, моноциты, лимфоциты, дендритные клетки

BLOOD PLATELETS AS ACTIVATORS AND REGULATORS OF INFLAMMATORY AND IMMUNE REACTIONS. PART 2. THROMBOCYTES AS PARTICIPANTS OF IMMUNE REACTIONS

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. Thrombocytes keep a leading role in conjugating thrombosis, inflammation and congenital immune responses. The platelets provide stable adhesion and interaction with immune cells. Activated platelets express CD40L (CD154), a membrane glycoprotein of tumor necrosis factor (TNF) family. Hence, the platelets are the main source of sCD40L in blood plasma. Platelet CD154 may interact with CD40 receptor on endothelial cells, causing an inflammatory response, and enhancing production of immunoglobulins by B-lymphocytes. Membrane and soluble CD154 of platelets combined with other signals can induce maturation and activation of dendritic cells (DC). The platelets possess functional receptors, e.g., TLR2, TLR4, TLR7 and TLR9 they also bear Fc-receptors, including FcγRIIA, FcεRI and FcαRI. FcγRIIA on platelets mediate protection against bacteria. Cross-linking of FcαRI on platelets results in production of prothrombotic and pro-inflammatory mediators such as tissue factor and IL-1β. Activation of platelets via FcεRI causes release of chemokine RANTES and serotonin, which contribute to the pro-inflammatory response of other immune cells. Platelets possess receptors for activated complement components and its fragments (CR2, CR3, CR4, C1q, C1 inhibitor and factors D and H). Activated platelets trigger the complement system through the release of protein kinases and ATP, and also by phosphorylation of C3 and C3b. α-granules of platelets contain chemokines which represent the most numerous group of antimicrobial proteins of platelets (kinocidins), and there is an antimicrobial protein of the defensin family – hBD-1 in the cytoplasm of platelets. Ligand and receptor of the TNF superfamily (TRAIL and LIGHT), the SDF-1 chemokine (CXCL12), the IL-1β interleukins, IL-8 and the soluble IL-6 receptor (sRIL-6) are recognized as platelet products belonging to the family of cytokines and their receptors. The HMGB-1 protein classified as an inflammatory cytokine, is expressed by activated platelets and causes formation of the extracellular traps by neutrophils. Platelets produce numerous growth factors, including EGF-α and EGF-β1, EGF-β2, TGF-α and TGF-β1, TGF-β2, PDGF, HGF, FGF-β, IGF, pro- and antiangiogenic factors, e.g., VEGF-F and angiopoietins Ang-1 and Ang-2. Fulfillment of immune functions by the platelets is carried out by their interaction with leukocytes, which are attracted to the site of infection and inflammation and retained during the development of an “immune thrombus” under conditions of high shear stress. Platelets can not only maintain and guide the immune response, but also initiate these events. They are able to present the antigen in the context of MHC class I molecules, and activate naïve CD8⁺ T lymphocytes. Potential consequences of platelet interaction with neutrophils, monocytes, dendritic cells and lymphocytes are discussed in the review article.

Keywords: platelets, chemokines, antimicrobial proteins, neutrophils, monocytes, lymphocytes, dendritic cells

Данная работа является продолжением обзора о тромбоцитах, который был опубликован ранее [1]. Если в первой части были описаны основные характеристики тромбоцитов, то в данном обзоре обсуждается их участие в иммунной системе.

Тромбоциты — первые клетки, которые попадают в места повреждения сосудов, распознают их и активируются компонентами базальной мембраны. Им принадлежит ведущая роль в сопряжении тромбоза, воспаления и врожденных иммунных реакций [57]. Активированные тромбоциты взаимодействуют с эндотелиальными клетками и циркулирующими лейкоцитами, высвобождая растворимые регуляторные молекулы, которые могут действовать как на местном, так и на системном уровне. Секреция цитокинов и хемокинов тромбоцитами позволяет расценивать их активацию как неотъемлемый фактор воспаления. Как и при регуляции гемостаза, тромбоциты могут быть вовлечены в разнонаправленные процессы. Последовательность событий, развивающихся во времени, может приводить к завершению продукции провоспалительных медиаторов и переключению тромбоцитов на синтез и высвобождение противовоспалительных регуляторов в фазе репарации повреждения. То есть динамика вовлечения тромбоцитов в иммунные реакции, вероятно, сложна и неоднозначна [60].

Рецепторы, которые определяют взаимодействие тромбоцитов с иммунными клетками

Тромбоциты обладают рецепторами, которые позволяют устанавливать стабильное взаимодействие с иммунными клетками. Некоторые рецепторы экспрессируются только на активированных тромбоцитах, например Р-селектин (CD62P), лиганд которого PSGL-1 экспрессируется на лейкоцитах [54]. Другие представлены на мембране постоянно, например GPIb α , который взаимодействует с β 2-цепью интегрина Mac 1 (CD11b/CD18; интегрин α M β 2) на нейтрофилах [86]. Молекула межклеточной адгезии 2 (ICAM-2), представленная на тромбоцитах [20], обеспечивает связь с лейкоцитами через лейкоцитарный функциональный антиген 1 (LFA1). Активированные тромбоциты экспрессируют CD40L (CD154), мембранный гликопротеин семейства фактора некроза опухоли (TNF). Первоначально этот рецептор был определен на Т-лимфоцитах как важный компонент регуляции адаптивного иммунитета, который предоставляет костимулирующие сигналы антигенпредставляющим клеткам (АПК) [28]. Позднее CD154 был обнаружен на мембране тромбоцитов, в том числе их микрочастиц [66]. Матриксные металлопротеиназы тромбоцитов обеспечивают шеддинг (сбрасывание) рецептора CD154, что обеспечивает его присутствие в плазме в растворенной форме (sCD40L), причем именно тромбоциты

представляют собой главный источник sCD40L в плазме крови [75, 76]. Тромбоцитарный CD154 может взаимодействовать с рецептором CD40 на эндотелиальных клетках, вызывая воспалительный ответ [40], и В-лимфоцитах, усиливая продукцию ими иммуноглобулинов [13]. CD154 тромбоцитов в комплексе с другими сигналами может вызвать созревание и активацию дендритных клеток (ДК) [46, 65]. Через рецептор CLEC-2 тромбоциты могут быть проактивированы воспалительными макрофагами, для которых характерна экспрессия его лиганда подопламина [46].

Toll-подобные рецепторы на тромбоцитах

Toll-подобные рецепторы (TLR) — рецепторы распознавания структур патогенов и стресс-молекул собственных клеток (алларминов), присутствуют на многих типах клеток, но лучше всего охарактеризованы на клетках иммунной системы. Тромбоциты экспрессируют белки TLR1-9 и обладают функциональными рецепторами TLR2, TLR4, TLR7 и TLR9 [2, 13]. Открытие TLR на тромбоцитах в 2004 г. существенно продвинуло представление о них как о клетках, вовлеченных в иммунные реакции [79, 84]. Стимуляция тромбоцитарных TLR2 и TLR9 вызывает агрегацию тромбоцитов. Тромбоцитарный TLR4 участвует в ответе на бактериальный эндотоксин, активирует привлечение тромбоцитов к воспаленной или поврежденной сосудистой стенке и высвобождение из тромбоцита микровезикул. Активированные через TLR4 тромбоциты при контакте с нейтрофилами активируют их к образованию внеклеточных ловушек, способных к захвату бактерий [11, 12]. Тромбоциты, экспрессирующие TLR7, вовлечены в ответ организма на вирусные инфекции без индукции агрегации тромбоцитов [44, 49].

Рецепторы для Fc-фрагментов иммуноглобулинов и компонентов комплемента

Наличие рецепторов для Fc-фрагментов иммуноглобулинов и компонентов комплемента на тромбоцитах, таких же, как на основных фагоцитах — нейтрофилах и моноцитах, подтверждает наличие у них разнообразных иммунных функций. Fc-рецепторами, выявленными на тромбоцитах, являются низкоаффинный рецептор для Fc-области IgG (Fc γ RIIA) [77], высокоаффинный рецептор для IgE (Fc ϵ RI) [42] и рецептор для IgA (Fc α RIA) [74]. Fc γ RIIA на тромбоцитах может вовлекать их в иммунологическую защиту от бактерий. Перекрестная связь Fc α RI на тромбоцитах приводит к продукции ими протромботических и провоспалительных медиаторов, таких как тканевый фактор и IL-1 β [74]. Активация тромбоцитов через Fc ϵ RI вызывает высвобождение хемокина RANTES (Regulated on Activation, Normal T cells Expressed and Secreted) и серотонина, медиаторов, которые способствуют провоспалительному ответу других иммунных клеток [16,

36]. В модели контактной Т-зависимой гиперчувствительности показано, что связывание тромбоцитарного Fc ϵ RI с IgE приводит к выпуску серотонина и инициирует кожное воспаление [60].

Тромбоциты обладают рецепторами для активированных компонентов комплемента и их фрагментов — CR2, CR3, CR4, C1qR и рецепторами для C1-ингибитора и факторов D и H. Связывание C1q с рецептором C1qR на тромбоцитах способствует активации классического пути комплемента [70]. Активированные тромбоциты способствуют активации системы комплемента через высвобождение протеинкиназ и АТФ, а также при фосфорилировании C3 и C3b [23]. Тромбоциты могут связывать C3b через Р-селектин; активация тромбоцитов и повышение экспрессии Р-селектина приводят к активации системы комплемента и распространению этого процесса в циркуляции [17].

Как другие клетки крови, тромбоциты содержат ряд мембранных белков, которые специфично защищают их от неконтролируемой активации комплемента и аутоповреждения [86]. К числу этих регуляторных белков относятся CD55 (фактор ускорения распада, DAF), CD59 (мембранный ингибитор реактивного лизиса, MIRL) и C8-связывающий белок или гомологичный фактор рестрикции (C8bp/HRF). Таким образом, взаимодействия между тромбоцитами и системой комплемента сложны и разнонаправленны: тромбоциты могут как активировать комплемент, так и подавлять его активность [71].

Хемокины и антимикробные белки тромбоцитов

Хемокины — основные сигнальные молекулы, контролирующие миграцию и проникновение лейкоцитов как при воспалении, так и на этапах дифференцировки. В α -гранулах тромбоцитов хранятся хемокины классов CC и CXC, которые высвобождаются после активации тромбоцитов [6, 8, 29]. Хемокины CC, такие как CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α) и CCL5 (RANTES), привлекают и активируют лейкоциты [29, 38, 40]. Хемокины CXC, CXCL1 (GRO- α), CXCL4, CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (PBP, β -тромбоглобулин, STAP-III, NAP-2), CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF-1 α) CXCL4 (PF4) привлекают нейтрофилы и подавляют их апоптоз [7, 33, 82]. CXCL-5 может модулировать хемотаксис нейтрофилов [63].

Хемокины тромбоцитов представляют и самую многочисленную группу антимикробных белков тромбоцитов (киноцидины), классифицируемых как Platelet Microbicidal Proteins (PMP). Киноцидины подразделяют на две подгруппы, согласно номенклатуре цитокинов. Хемокины CXC-типа определяют как α -киноцидины, а CC-хемокин RANTES — это β -киноцидин. Киноцидины CXCL4 (PF-4) и CXCL7 (STAP-3) проявляют синергетичную микробицидную активность против бактерий. В гранулах тромбоцита хранят-

ся также микробицидные фибринопептиды А и В (FP-A и FP-B) и тимозин β -4 [95]. Тимозин- β 4 — анионный белок, который высвобождается из α -гранул при активации тромбином и обладает прямой антимикробной активностью, непосредственно убивая микроорганизмы [95]. Обычно PMP проявляют большую активность против бактерий, чем грибов. Активность их является дозозависимой и выше при низких (кислотных) значениях pH. Особые характеристики выявлены для PF-4, который имеет бимодальный дозозависимый микробицидный ответ, и T β -4, активность которого выше при щелочных значениях pH. Хемокины, высвобождаемые из тромбоцитов при активации, по-видимому, используют два ключевых механизма антибактериальной защиты организма: первый — непосредственная ингибция роста, или киллинг патогенных микроорганизмов, и второй — привлечение, активация лейкоцитов и усиление их антибактериальных ответов. В цитоплазме тромбоцитов (в экстрагранулярном отделе) имеется антимикробный белок семейства дефензинов — hBD-1. Он высвобождается из тромбоцитов, когда они разрушаются литическими токсинами. Дефензин hBD-1 задерживает рост патогенных штаммов *S. aureus* и вызывает образование внеклеточных ловушек нейтрофилов [50].

Хемокинами тромбоцитов являются также два особых антимикробных катионных белка (PMP1 и PMP2), которые отличаются от дефензинов молекулярной массой, последовательностью и расположением остатков лизина и аргинина. Они высвобождаются из тромбоцитов при их активации тромбином или бактериями. Для того чтобы проявились их антимикробные свойства, эти молекулы должны быть расколоты тромбином, после чего обе субъединицы действуют автономно, но дополняют друг друга, нарушая проницаемость бактериальной стенки [97].

Цитокины тромбоцитов

Цитокины — наиболее многочисленная группа сигнальных молекул, включающая ростовые факторы и интерлейкины. Продуктами тромбоцитов, относящимися к семейству цитокинов и их рецепторов, признаны лиганд и рецепторы суперсемейства TNF (соответственно, TRAIL и LIGHT), фактор, продуцируемый стромальными клетками (SDF-1 α , классифицируемый также как CXCL12), интерлейкины IL-1 β (который секретируется в микрочастицах тромбоцитов), IL-8 и растворимый рецептор IL-6 (sRIL-6) [31, 37, 59]. Белок High mobility group box 1 (HMGB-1), недавно классифицированный как воспалительный цитокин, экспрессируется в активированных тромбоцитах и вызывает формирование нейтрофилами внеклеточных ловушек (NET) [80].

Тромбоциты являются источником многочисленных факторов роста, включая эпидермальный

фактор роста (EGF) альфа- и бета-1 и -2 трансформирующие факторы роста (TGF- α и TGF- β 1, TGF- β 2), ростовой фактор тромбоцитарного происхождения (PDGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), бета-фактор роста фибробластов (FGF- β или FGF-2), инсулиноподобный фактор роста (IGF), про- и антиангиогенные факторы, например факторы роста сосудистого эндотелия (VEGF-F) и ангиопоэтины Ang-1 и Ang-2 [4, 66, 81, 93].

Ангиогенные факторы тромбоцитов способствуют повышению проницаемости стенки сосуда и привлечению, росту и пролиферации эндотелиальных клеток и фибробластов. Хотя эти факторы роста могут секретироваться различными воспалительными клетками, скорость, с которой тромбоциты накапливаются в месте повреждения сосудов, делает их наиболее доступным источником этих медиаторов [9, 95]. Например, после рассечения лучевой артерии и формирования тромба концентрации VEGF в течение нескольких минут повышаются в 3 раза. VEGF также накапливается внутри тромбоцитарного тромба [5]. Полученный из тромбоцитов VEGF и FGF-2 оказывают трофическую поддержку эндотелиальным клеткам [73]. А комплекс тромбоцитарных цитокинов VEGF, FGF-2 и PDGF способствует нормализации кровоснабжения аорты путем стимуляции роста новых кровеносных сосудов (*vasa vasorum*) [10].

Взаимодействие тромбоцитов с иммунными клетками

Тромбоциты — динамические клетки, которые способны на ранних этапах различных сосудистых воспалительных процессов осуществлять связь между врожденным и адаптивным иммунным ответом. Реализация иммунных функций тромбоцитов осуществляется при их взаимодействии с лейкоцитами, которые привлекаются к месту инфекции и воспаления [39]. В условиях высокого напряжения сдвига контактные взаимодействия тромбоцитов с другими иммунными клетками опосредуются через P-селектин и его лиганд PSGL-1, рецепторы ICAM1 и GPIb α [98].

Нейтрофилы

В сосудистом русле активированные тромбоциты формируют агрегаты с нейтрофилами, связываясь через P-селектин с его лигандом PSGL-1 на нейтрофилах [68]. После этого гликопротеин Ib α (GPIb α) тромбоцитов взаимодействует с Mac-1 (CD11b/CD18; интегрин α M β 2) на нейтрофилах, индуцируя образование нейтрофилами микровезикул [85]. Микровезикулы направляются к тромбоцитам и переносят им арахидоновую кислоту. В тромбоцитах микровезикулы перемещаются во внутриклеточные отделения, содержащие большое количество циклогеназы-1, которая метаболизирует арахидоновую кислоту с образованием тромбоксана A2 (TxA2).

Высвобождение тромбоцитарного TxA2 вызывает экспрессию на эндотелии ICAM-1 и определяет полный ответ нейтрофилов, усиливая их адгезивность к эндотелию и экстравазацию. То есть в неактивированном состоянии пары фермент—субстрат (арахидоновая кислота — ЦОГ-1) разделены между нейтрофилами и тромбоцитами, но они объединяются при активации в агрегатах нейтрофил—тромбоцит [79].

Синхронизация активности при взаимодействии тромбоцит—нейтрофил идет с участием реактивных радикалов кислорода (РРК), производимых как тромбоцитами, так и нейтрофилами [47]. В активированных тромбоцитах вызывать образование РРК (супероксид-аниона, перекиси водорода и гидроксильных радикалов) могут различные активаторы, в том числе микробные продукты [51]. РРК образуются NADPH-оксидазой; в тромбоцитах выявлены две ее изоформы, NOX1 и NOX2, а также их регуляторные субъединицы p22phox, p47phox и p67phox [91]. Производимые тромбоцитами РРК регулируют экспрессию и лиганд-связывающую функцию P-селектина и гликопротеина Ib α , приводя к усилению тромбообразования, агрегации и секреции тромбоцитов [18]. При этом РРК, произведенные NOX2 нейтрофилов, увеличивают активацию и связывающую активность лиганда α M β 2 интегрин, усиливая межклеточное взаимодействие.

Результатом взаимодействия нейтрофилов с активированными тромбоцитами является увеличение активности фагоцитоза и повышение выживания нейтрофилов, чему способствует тромбоцитарный фактор 4 (PF4) [35]. Другим сценарием активации нейтрофилов тромбоцитами является направление нейтрофилов к аутофагии или формированию внеклеточных ловушек (NET), способных захватывать микроорганизмы [3]. NET сохраняют целостность в условиях кровотока и удерживают бактерии в пределах сосудистого русла, подвергая их воздействию микробицидных факторов. Такую активность проявляют тромбоциты, активированные через TLR4 [12], а в формирование NET вовлечен также тромбоцитарный β -дефензин [50]. Jan Rossaint и соавт. [78] недавно показали, что для формирования NET необходима одновременная активация нейтрофилов через Mac-1 и связывание рецептор-ассоциированного белка Gai хемокиновым гетеродимером RANTES-PF4, полученным из тромбоцитов [52].

Важно отметить, что активированные тромбоциты при бактериальной инфекции не только индуцируют воспаление, но и сами представляют угрозу гомеостазу, так как выставляют на мембране фосфатидилсерин, мощный индуктор коагуляции [67]. Нейтрофилы удаляют вступающие в апоптоз тромбоциты, распознавая фосфатидилсерин. Нейтрофилы взаимодействуют с ак-

тивированными тромбоцитами (используя связь P-selectin/PSGL-1 и активную форму интегрина $\alpha\text{M}\beta 2$, который связывается с фибриногеном на поверхности активированных тромбоцитов), что приводит к удалению активированных тромбоцитов из циркуляции путем фагоцитоза [61].

Моноциты

Тромбоциты, обеспечивая ускорение и расширение каскада коагуляции, способствуют образованию факторов, которые активируют и тромбоциты, и лейкоциты. Например, воздействие активированных тромбоцитов на моноциты вызывает усиление экспрессии ими тканевого фактора (TF) и связывание с фактором коагуляции Ха и фибриногеном. Образующийся тромбин вызывает не только агрегацию и активацию тромбоцитов, но и активацию моноцитов, направляя их к усилению адгезии и продукции хемокинов CCL2, RANTES [15, 52].

При контакте с тромбоцитами моноциты приобретают воспалительный фенотип и повышают аффинность адгезии к эндотелию [69, 88]. В свою очередь, активированные тромбоциты могут захватываться моноцитами и макрофагами, что вызывает увеличение выхода цитокинов из мононуклеаров [83].

Взаимодействие активированных тромбоцитов с моноцитами в крови и формирование комплексов моноцитов с тромбоцитами происходит при многих тромботических и воспалительных состояниях. Агрегаты моноцитов с тромбоцитами формируются легче (т.е. при более низких концентрациях агонистов тромбоцитов), быстрее и являются более стабильными по сравнению с агрегатами тромбоциты–нейтрофилы или тромбоциты–лимфоциты [62]. При взаимодействии с активированными тромбоцитами через PSGL-1/P-селектин, а также при связывании продуктов активированных тромбоцитов (RANTES, IL-1 β и PAF) в моноцитах индуцируются NF- κ B-зависимые воспалительные гены [21], в их числе гены моноцитарного хемотактического белка 1 (MCP-1), TNF α и IL-8. Связывание PSGL-1 приводит также к активации MAP-киназного пути и mTOR-пути [21]. Каскад mTOR участвует в реализации основных иммунных ответов и известен как молекулярная мишень иммуносупрессоров/модификаторов.

Кроме того, сигнал, запускаемый в моноцитах при контактном взаимодействии с тромбоцитами и связывании эндогенного IL-1 (то есть более поздний сигнал), индуцирует экспрессию циклооксигеназы 2 (ЦОГ-2) и образование зависимого от нее простагландина E2 (PGE2) [21]. Выделенный PGE2 может, в свою очередь, снизить активность тромбоцитов [71, 72] и иммунных клеток [89]. Активированные тромбоциты влияют также на выживание моноцитов и их дифферен-

цировку, после чего комплексы моноцитов с активированными тромбоцитами распадаются [90].

В условиях острого инфекционного процесса (сепсис) взаимодействия моноцитов и тромбоцитов могут приводить к противовоспалительным эффектам [32, 33, 96]. Так, связывание тромбоцитарного хемокина CXCL13 с рецептором CXCR5 на моноцитах приводит к ингибции продукции TNF α и IL-6 [32]. При низком уровне тромбоцитов в цельной крови продукция цитокинов мононуклеарами периферической крови, индуцированная бактериями, повышается [31, 96].

Другим проводником противовоспалительных эффектов тромбоцитов является комплекс GPIb-IX. У мышей, не имеющих комплекса GPIb-IX, при сепсисе повышена экспрессия адгезионной молекулы MAC-1 на нейтрофилах и увеличена продукция провоспалительных хемокинов и цитокинов моноцитами [14, 15]. Таким образом, результаты взаимодействия тромбоцитов с моноцитами могут быть разнонаправленными и многообразными в различных ситуациях.

Лимфоциты

Агрегаты тромбоцитов с лимфоцитами формируются при взаимодействии P-селектина с PSGL-1. Взаимодействие тромбоцитов с T-, B- и NK-лимфоцитами вызывает их адгезию, хоминг и активацию [56]. Тромбоциты могут служить мостом, направляющим T-лимфоциты к эндотелию, облегчая их экстравазацию в воспаленные ткани и проникновение через высокий эндотелий венул во вторичную лимфоидную ткань, способствуя формированию иммунологической памяти [19].

Связывание PSGL-1 на лимфоцитах вызывает активацию и/или объединение в кластеры $\beta 2$ -интегринов, которые могут после этого распознавать молекулы семейства ICAM на тромбоцитах или других клетках [55]. Аффинность связывания P-селектина и проявляемая адгезивность отличаются у лимфоцитов различных субпопуляций [55]. При контакте T-лимфоцитов с тромбоцитами через CD40-CD40L тромбоциты увеличивают выпуск хемокина RANTES, усиливая привлечение лимфоцитов к участку воспаления [17, 43].

Тромбоциты модулируют функцию лимфоцитов как при прямом межклеточном взаимодействии, так и растворимыми медиаторами [57]. Тромбоциты продуцируют цитокины, способные как увеличивать (RANTES), так и ингибировать (TGF β) дифференцировку и функции Th1 [31, 76]. Стимулировать T-хелперы могут также выпускаемый из везикул активированных тромбоцитов серотонин [54] и хемокины (PF4 и CCL5) [37]. Тромбоцитарный PF4 регулирует многие T-клеточные реакции, а CCL5 определен как фактор активации T-хелперов 1 типа (Th1) при HCV-инфекции [45]. У больных ревматоид-

ным артритом связывание тромбоцитов с лимфоцитами усиливает их пролиферацию, а также производство IL-17 и IFN γ CD4 $^+$ T-хелперами [96].

Показано, что тромбоциты регулируют дифференцирование CD4 $^+$ T-лимфоцитов косвенно, через секрецию хемокинов, и напрямую, через межклеточное связывание. Тромбоциты способствуют поляризации Th1, Th17 и Treg, но не Th2, и увеличивают производство цитокинов, необходимых для поляризации этих подтипов CD4 T-клеток [30].

Тромбоциты могут также вызывать противовоспалительные эффекты, модулируя дифференцировку T-лимфоцитов. Специфичный тромбоцитарный хемокин PF4 был определен как фактор, модулирующий баланс между регуляторными и нерегуляторными T-клетками, способный уменьшить Th1-клеточные реакции [27], увеличивая активность Treg [58]. Изучение динамики клеточных реакций CD4 $^+$ T-лимфоцитов, регулируемых тромбоцитами, показало, что тромбоциты постоянно способствуют клеточным реакциям Treg, но проявляют двухфазное регулирование активации Th1/Th17, а именно транзитное усиление Th1/Th17 сменяется фазой супрессии с усилением Treg. Во второй фазе воспалительного ответа (подавляющей) именно тромбоциты являются основным регулятором, продуцирующим цитокин TGF β , способным ингибировать пролиферацию FoxP3 $^+$ T-лимфоцитов [99].

Взаимодействие тромбоцитов с CD8 T-лимфоцитами через CD40L усиливает защитные реакции при вирусной инфекции, способствуя активации цитотоксических T-лимфоцитов (CTL) и направляя их на зараженные вирусом клетки организма [76]. Удаление тромбоцитов у животных с вирусным гепатитом уменьшает воспаление в печени, но вирусная нагрузка при этом увеличивается из-за отсутствия CD8-клеток. Восстановление нормального количества тромбоцитов, напротив, увеличивает воспаление печени из-за проникновения CD8-клеток, но вирусная нагрузка при этом уменьшается [41].

При гуморальных адаптивных T-зависимых реакциях тромбоциты способствуют формированию зародышевых центров и продукции специфичных IgG, подавая сигнал B-лимфоцитам через CD40L [24]. Фактически тромбоциты могут стимулировать созревание B-лимфоцитов, когда CD40L-положительных T-клеток недостаточно.

Дендритные клетки

Взаимодействия тромбоцитов с дендритными клетками (ДК) могут быть контактными (через P-селектин/PSGL и Mac-1 на ДК и JAM-C на тромбоцитах) и опосредованными растворимыми факторами. Тромбоциты регулируют дифференцировку, созревание и активацию ДК и при прямом контакте, и растворимыми продукта-

ми [27, 39]. Показано, что контакт с P-селектином и серотонин, выпускаемый тромбоцитами, могут увеличить дифференцировку моноцитов в направлении ДК, задерживая их дифференцировку до макрофагов [55]. При определенных условиях дифференцировке и/или созреванию ДК способствует CD40L тромбоцитов [25, 44].

Результаты контактных и медиаторных воздействий могут разнонаправленно регулировать ответ ДК [34]. При высоком напряжении сдвига прямое взаимодействие ДК с тромбоцитами способствует привлечению ДК к месту повреждения и создает условия для их созревания [32]. При прямом взаимодействии тромбоцитов с ДК активируется фагоцитоз тромбоцитов и апоптоз ДК [55, 56]. Тромбоциты изменяют активацию и секрецию провоспалительных цитокинов ДК [32, 34, 48, 53]. Тромбоциты могут секретировать RANKL, увеличивая опосредованную ДК реакцию Th2-клеток при аллергии [64]. Тромбоциты также могут ослабить дифференцировку и созревание ДК и уменьшить продукцию ими провоспалительных цитокинов IL-12p70 и TNF α [48].

Клиническая значимость событий, связанных с активацией тромбоцитов, подтверждается наблюдениями за больными системной красной волчанкой (СКВ). Активация тромбоцитов иммунными комплексами, действующими через Fc γ RIIA, коррелирует с тяжестью заболевания. В крови больных СКВ выявлены агрегаты, сформированные активированными тромбоцитами, моноцитами и плазмоцитоидными ДК. Взаимодействие с тромбоцитами (вероятно, через CD40/CD40L) усиливает секрецию интерферона- α плазмоцитоидными ДК [22].

Тромбоциты как антигенпрезентирующие клетки (АПК)

Тромбоциты могут не только поддерживать и направлять иммунный ответ, но могут и инициировать его. Они способны презентировать антиген в контексте молекул МНС I класса и активировать наивные CD8 $^+$ T-лимфоциты. Для осуществления антигенпрезентирующей функции в тромбоцитах имеются активные протеасомы, шероховатый эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, транспортеры антигенных пептидов (TAP), кальнексин и кальретикулин. В тромбоцитах также высоко экспрессируется мРНК для субъединиц МНС I, таких как бета-2 микроглобулин (β 2M) и лейкоцитарные антигены человека (HLA) [17]. Кроме того, тромбоциты также экспрессируют костимуляторные и адгезионные молекулы, важные для клеток, представляющих антиген T-лимфоцитам, такие как CD40, CD44, ICAM-2 и DC-SIGN. Исследование, проведенное Lesley Chapman и соавт., показывает, что тромбоциты способны пред-

ставлять антигены, полученные из *Plasmodium* CD8⁺T-лимфоцитам, как *in vitro*, так и *in vivo* [10].

Антигенпредставляющая функция тромбоцитов может быть важной при многих гемотрансмиссивных инфекциях и сосудистых воспалительных заболеваниях [94]. Иммунная тромбоцитопения (ИТП) является результатом атаки цитотоксических Т-лимфоцитов на тромбоциты, представляющие аутоантигены. Тромбоцитопения наблюдается и при многих инфекционных заболеваниях. По-видимому, патогенезы тромбоцитопении при инфекциях и ИТП очень многообразны, но частично могут быть обусловлены и тромбоцитами, представляющими антиген-специфичным CD8⁺T-лимфоцитам.

Иммуномодулирующие эффекты антитромбоцитарной терапии

Антитромбоцитарная терапия уменьшает активацию тромбоцитов и их сосудистое накопление, также она может уменьшить активность воспаления, выпуск медиаторов и привлечение лейкоцитов к местам повреждения. Использование клопидогрела, который блокирует рецептор P2Y₁₂, вовлеченный в АДФ-зависимую активацию тромбоцитов, связано с сокращениями уровня С-реактивного белка и уменьшением экспрессии CD40L и Р-селектина при множестве болезненных состояний, включая сердечно-сосудистые и цереброваскулярные нарушения, диабет и трансплантацию почки [77, 87]. При исследовании на животных предварительная обработка клопидогрелом уменьшает взаимодействие лейкоцитов с тромбоцитами и снижает производство нейтрофилами реактивных радикалов кислорода [26]. Важно отметить, что не все исследования показали противовоспалительный эффект антитромбоцитарной терапии, в некоторых публикациях показано, что клопидогрел может фактически увеличить экспрессию хемокинов

моноцитами [92]. В некоторых исследованиях двойная антитромбоцитарная терапия клопидогрелом и аспирином показала более выраженные уровни снижения воспалительных маркеров.

Заключение

Представленные в настоящем обзоре данные демонстрируют многообразие свойств тромбоцитов, характерных для клеток врожденного иммунитета. Учитывая количество этих клеток в циркуляции, их раннее появление в зоне повреждения/воспаления, многообразие доступных адгезионных взаимодействий с клетками различных типов и компонентами межклеточного матрикса, огромное многообразие содержащихся в гранулах и вновь синтезируемых иммунных медиаторов и регуляторов, мишенями которых являются все типы клеток иммунной системы, не вызывает сомнений, что тромбоциты — важнейшие участники врожденных иммунных реакций, значение которых все еще недооценено. Несмотря на то, что иммунные функции тромбоцитов интенсивно исследуются в последнее десятилетие, в российской научной литературе эти функции тромбоцитов освещены пока крайне недостаточно. В настоящем обзоре мы стремились восполнить этот дефицит информации, привлечь внимание иммунологов и клиницистов к вопросам модуляции воспаления и иммунных реакций путем возможности воздействия на активацию и/или ингибцию определенных реакций тромбоцитов. Представляется, что появление новых лекарственных препаратов, изменяющих адгезионные и секреторные характеристики тромбоцитов, даст новые рычаги в управлении иммунными реакциями и воспалением, дефицит которых мы явно ощущаем в клинической практике при лечении заболеваний, в основе которых лежат различные типы воспаления.

Список литературы / References

1. 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 // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 785-796. [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. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 785-796. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-785-796.
2. Andonegui G., Kerfoot S.M., McNaghy K., Ebbert K.V.J., Patel K.D., Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*, 2005, Vol. 106, pp. 2417-2423.
3. Andrews R.K., Arthur J.F., Gardiner E. Neutrophil extracellular traps (NETs) and the role of platelets in infection. *Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 112, no. 4, pp. 659-665.
4. Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nurden P., Nurden A.T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.*, 2004, Vol. 91, pp. 4-15.
5. Arisato T., Hashiguchi T., Sarker K.P., Arimura K., Asano M., Matsuo K., Osame M., Maruyama I. Highly accumulated platelet vascular endothelial growth factor in coagulant thrombotic region. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, no. 1, pp. 2589-2593.
6. Blair P., Flaumenhaft R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.*, 2009, Vol. 23, no. 4, pp. 177-189.
7. Boehlen F., Clemetson K.J. Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice? *Transfus. Med.*, 2001, no. 11, pp. 403-417.

8. Brandt E., Petersen F., Ludwig A., Ehlert J.E., Bock L., Flad H.D. The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *J. Leukoc. Biol.*, 2000, Vol. 67, pp. 471-478.
9. Brill A., Elinav H., Varon D. Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis. *Cardiovasc. Res.*, 2004, Vol. 63, pp. 226-235.
10. Chapman L.M., Aggrey A.A., Field D.J., Srivastava K., Ture S., Yui K., Topham D.J., Baldwin W.M. 3rd, Morrell C.N. Platelets present antigen in the context of MHC class I. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 2, pp. 916-923.
11. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., Mcavoy E., Sinclair G.D., Keys E.M., Allen-Vercoe E., Devinney R., Doig C.J., Green F.H.Y., Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, pp. 463-469.
12. Cognasse F., Hamzeh H., Chavarin P., Acquart S., Genin C., Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol. Cell. Biol.*, 2005, Vol. 83, pp. 196-198.
13. Cognasse F., Hamzeh-Cognasse H., Lafarge S., Chavarin P., Cogné M., Richard Y., Garraud O. Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins. *Exp. Hematol.*, 2007, Vol. 35, pp. 1376-1387.
14. Colotta F., Sciacca F.L., Sironi M., Luini W., Rabet M.J., Mantovani A. Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am. J. Pathol.*, 1994, Vol. 144, no. 5, pp. 975-985.
15. Corken A., Russell S., Dent J., Post S.R., Ware J. Platelet glycoprotein Ib-IX as a regulator of systemic inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2014, Vol. 34, pp. 996-1001.
16. Danese S., de la Motte C., Reyes B.M., Sans M., Levine A.D., Fiocchi C. Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, pp. 2011-2015.
17. del Conde I., Cruz M.A., Zhang H., López J.A., Afshar-Kharghan V. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 201, no. 6, pp. 871-879.
18. Delaney M.K., Kim K., Estevez B., Xu Z., Stojanovic-Terpo A., Shen B., Ushio-Fukai M., Cho J., Du X. Differential roles of the NADPH-oxidase 1 and 2 in platelet activation and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2016, Vol. 36, no. 5, pp. 846-854.
19. Diacovo T.G., Catalina M.D., Siegelman M.H., von Andrian U.H. Circulating activated platelets reconstitute lymphocyte homing and immunity in L-selectin-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 187, no. 2, pp. 197-204.
20. Diacovo T.G., de Fougerolles A.R., Bainton D.F., Springer T.A. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J. Clin. Invest.*, 1994, Vol. 94, pp. 1243-1251.
21. Dixon D.A., Tolley N.D., Bemis-Standoli K., Martinez M.L., Weyrich A.S., Morrow J.D., Prescott S.M., Zimmerman G.A. Expression of COX-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, pp. 2727-2738.
22. Duffau P., Seneschal J., Nicco C., Richez C., Lazaro E., Douchet I., Bordes C., Viallard J.-F., Goulvestre C., Pellegrin J.-L., Weil B., Moreau J.-F., Batteux F., Blanco P. Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2010, Vol. 1, no. 2 (47), 47ra63. doi: 10.1126/scitranslmed.3001001.
23. Ekdahl K.N., Nilsson B. Phosphorylation of complement component C3 and C3 fragments by a human platelet protein kinase. Inhibition of factor I-mediated cleavage of C3b. *J. Immunol.*, 1995, Vol. 154, no. 12, pp. 6502-6510.
24. Elzey B.D., Ratliff T.L., Sowa J.M., Crist S.A. Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. *Thromb. Res.*, 2011, Vol. 127, no. 3, pp. 180-183.
25. Elzey B.D., Sprague D.L., Ratliff T.L. The emerging role of platelets in adaptive immunity. *Cell Immunol.*, 2005, Vol. 238, pp. 1-9.
26. Evangelista V., Manarini S., Dell'Elba G., Martelli N., Napoleone E., Di S.A., Lorenzet P.S. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation. *Thromb. Haemost.*, 2005, Vol. 94, no. 3, pp. 568-577.
27. Fleischer J., Grage-Griebenow E., Kasper B., Heine H., Ernst M., Brandt E., Flad H.-D., Petersen F. Platelet factor 4 inhibits proliferation and cytokine release of activated human T cells. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, pp. 770-777.
28. Foy T.M., Aruffo A., Bajorath J., Buhlmann J.E., Noelle R.J. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu. Rev. Immunol.*, 1996, Vol. 14, pp. 591-617.
29. Gear A.R.L., Camerini D. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation*, 2003, no. 10, pp. 335-350.
30. Gerdes N., Zhu L., Ersoy M., Hermansson A., Hjendahl P., Hu H., Hansson G.K., Li N. Platelets regulate CD4⁺ T-cell differentiation via multiple chemokines in humans. *Thromb. Haemost.*, 2011, Vol. 106, pp. 353-362.
31. Gudbrandsdottir S., Hasselbalch H.C., Nielsen C.H. Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF- α secretion by monocytes. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 8, pp. 4059-4067.
32. Hagihara M., Higuchi A., Tamura N., Ueda Y., Hirabayashi K., Ikeda Y., Kato S., Sakamoto S., Hotta T., Handa S., Goto S. Platelets, after exposure to a high shear stress, induce IL-10-producing, mature dendritic cells *in vitro*. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 9, pp. 5297-5303.
33. Halvorsen B., Smedbakken L.M., Michelsen A.E., Skjelland M., Bjerkeli V., Sagen E.L., Taskén K., Bendz B., Gullestad L., Holm S., Biessen E.A., Aukrust P. Activated platelets promote increased monocyte expression of CXCR5 through prostaglandin E2-related mechanisms and enhance the anti-inflammatory effects of CXCL13. *Atherosclerosis*, 2014, Vol. 234, no. 2, pp. 352-359.

34. Hamzeh-Cognasse H., Cognasse F., Palle S., Chavarin P., Olivier T., Delézay O., Pozzetto B., Garraud O. Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation. *BMC Immunol.*, 2008, Vol. 9, no. 1, pp. 54-60.
35. Hartwig H., Drechsler M., Lievens D., Kramp B., von Hundelshausen P., Lutgens E., Weber C., Döring Y., Soehnlein O. Platelet-derived PF4 reduces neutrophil apoptosis following arterial occlusion. *Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 111, no. 3, pp. 562-564.
36. Hasegawa S., Pawankar R., Suzuki K., Nakahata T., Furukawa S., Okumura K., Ra C. Functional expression of the high affinity receptor for IgE (FcεRI) in human platelets and its' intracellular expression in human megakaryocytes. *Blood*, 1999, Vol. 93, pp. 2543-2551.
37. Hawrylowicz C.M., Howells G.L., Feldmann M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J. Exp. Med.*, 1991, Vol. 174, pp. 785-790.
38. Henn V., Slupsky J.R., Gräfe M., Anagnostopoulos I., Förster R., Müller-Berghaus G., Kroczeck R.A. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 1998, Vol. 391, pp. 591-594.
39. Herter J.M., Rossaint J., Zarbock A. Platelets in inflammation and immunity. *J. Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 12, no. 11, pp. 1764-1775.
40. von Hundelshausen P., Weber K.S., Huo Y., Proudfoot A.E., Nelson P.J., Ley K., Weber C. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation*, 2001, Vol. 103, pp. 1772-1777.
41. Iannaccone M., Sitia G., Isogawa M., Marchese P., Castro M.G., Lowenstein P.R., Chisari F.V., Ruggeri Z.M., Guidotti L.G. Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. *Nat. Med.*, 2005, no. 11, pp. 1167-1170.
42. Joseph M., Auriault C., Capron A., Vorng H., Viens P. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*, 1983, Vol. 303, pp. 810-812.
43. Kameyoshi Y., Schröder J.M., Christophers E., Yamamoto S. Identification of the cytokine RANTES released from platelets as an eosinophil chemotactic factor. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1994, Vol. 104, no. 1, pp. 49-51.
44. Kaneider N.C., Kaser A., Tilg H., Ricevuti G., Wiedermann C.J. CD40 ligand-dependent maturation of human monocyte-derived dendritic cells by activated platelets. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2003, Vol. 16, pp. 225-231.
45. Katsounas A., Schlaak J.F., Lempicki R.A. CCL5: a double-edged sword in host defense against the hepatitis C virus. *Int. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 30, no. 5-6, pp. 366-378.
46. Kerrigan A.M., Navarro-Núñez L., Pyz E., Finney B.A., Willment J.A., Watson S.P., Brown G.D. Podoplanin-expressing inflammatory macrophages activate murine platelets via CLEC-2. *J. Thromb. Haemost.*, 2012, no. 10, pp. 484-486.
47. Kim K., Li J., Tseng A., Andrews R.K., Cho J. NOX2 is critical for heterotypic neutrophil-platelet interactions during vascular inflammation. *Blood*, 2015, Vol. 126, no. 16, pp. 1952-1964.
48. Kissel K., Berber S., Nockher A., Santoso S., Bein G., Hackstein H. Human platelets target dendritic cell differentiation and production of proinflammatory cytokines. *Transfusion*, 2006, Vol. 46, pp. 818-827.
49. Koupenova M., Vitseva O., MacKay C.R., Beaulieu L.M., Benjamin E.J., Mick E., Kurt-Jones E.A., Ravid K., Freedman J.E. Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. *Blood*, 2014, Vol. 124, pp. 791-802.
50. Kraemer B.F., Campbell R.A., Schwertz H., Cody M.J., Franks Z., Tolley N.D., Kahr W.H., Lindemann S., Seizer P., Yost C.C., Zimmerman G.A., Weyrich A.S. Novel anti-bacterial activities of β-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathog.*, 2011, Vol. 7, no. 11, e1002355. doi: 10.1371/journal.ppat.1002355.
51. Krotz F., Sohn H.Y., Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, Vol. 24, no. 11, pp. 1988-1996.
52. Langer H.F., Daub K., Braun G., Schönberger T., May A.E., Schaller M., Stein G.M., Stellos K., Bueltmann A., Siegel-Axel D., Wendel H.P., Aebert H., Roecken M., Seizer P., Santoso S., Wesselborg S., Brossart P., Gawaz M. Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function *in vitro*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007, Vol. 27, no. 6, pp. 1463-1470.
53. Larsen E., Celi A., Gilbert G.E., Furie B.C., Erban J.K., Bonfanti R., Wagner D.D., Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*, 1989, Vol. 59, pp. 305-312.
54. León-Ponte M., Ahern G.P., O'Connell P.J. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT₇ receptor. *Blood*, 2007, Vol. 109, no. 8, pp. 3139-3146.
55. Li G., Kim Y.J., Mantel C., Broxmeyer H.E. P-selectin enhances generation of CD14⁺CD16⁺ dendritic-like cells and inhibits macrophage maturation from human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, pp. 669-677.
56. Li N. Platelet-lymphocyte cross-talk. *J. Leukoc. Biol.*, 2008, Vol. 83, pp. 1069-1078.
57. Li Zh., Yang F., Dunn S., A. Gross K., Smyth S.S. Platelets as immune mediators: Their role in host defense responses and sepsis. *Thromb. Res.*, 2011, Vol. 127, no. 3, pp. 184-188.
58. Liu C.Y., Battaglia M., Lee S.H., Sun Q.-H., Aster R.H., Visentin G.P. Platelet factor 4 differentially modulates CD4⁺CD25⁺ (Regulatory) versus CD4⁺CD25⁻ (Nonregulatory) T cells. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, pp. 2680-2686.

59. Loppnow H., Bil R., Hirt S., Schonbeck U., Herzberg M., Werdan K., Rietschel E.T., Brandt E., Flad H.D. Platelet-derived interleukin-1 induces cytokine production, but not proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Blood*, 1998, Vol. 91, pp. 134-141.
60. Matsuda H., Ushio H., Geba G.P., Askenase P.W. Human platelets can initiate Tcell-dependent contact sensitivity through local serotonin release mediated by IgE antibodies. *J. Immunol.*, 1997, Vol. 158, pp. 2891-2897.
61. Maugeri N., Rovere-Querini P., Evangelista V., Covino C., Capobianco A., Bertilaccio M.T., Piccoli A., Totani L., Cianflone D., Maseri A., Manfredi A.A. Neutrophils phagocytose activated platelets *in vivo*: a phosphatidylserine, P-selectin, and (beta)2 integrin-dependent cell clearance program. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 21, pp. 5254-5265.
62. Mei J., Liu Y., Dai N., Favara M., Greene T., Jeyaseelan S., Poncz M., Lee J.S., Worthen G.S. CXCL5 regulates chemokine scavenging and pulmonary host defense to bacterial infection. *Immunity*, 2010, Vol. 33, pp. 106-117.
63. Michetti N., Weyrich A.S., Zimmerman G.A. Platelet-leukocyte interactions in inflammation and thrombosis. *US Hematology*, 2009, no. 2, pp. 24-27.
64. Nakanishi T., Inaba M., Inagaki-Katashiba N., Tanaka A., Vien P.T.X., Kibata K., Ito T., Nomura S. Platelet-derived RANK ligand enhances CCL17 secretion from dendritic cells mediated by thymic stromal lymphopoietin. *Platelets*, 2014, Vol. 25, pp. 425-431.
65. Nomura S., Fujita S., Nakanishi T., Yokoi T., Shimamoto K., Miyamoto R., Ito T. Platelet-derived microparticles cause CD154-dependent activation of dendritic cells. *Platelets*, 2012, Vol. 23, no. 1, pp. 81-82.
66. Nurden A.T., Nurden P., Sanchez M., Andia I., Anitua E. Platelets and wound healing. *Front. Biosci.*, 2008, Vol. 13, pp. 3532-3548.
67. O'Brien M. The reciprocal relationship between inflammation and coagulation. *Top Companion Anim. Med.*, 2012, Vol. 27, no. 2, pp. 46-52.
68. Page C., Pitchford S. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *Int. Immunopharmacol.*, 2013, Vol. 17, no. 4, pp. 1176-1184.
69. Passacuale G., Vamadevan P., Pereira L., Hamid C., Corrigan V., Ferro A. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 10, e25595. doi: 10.1371/journal.pone.0025595.
70. Peerschke E.I., Yin W., Ghebrehiwet B. Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis. *Mol. Immunol.*, 2010, Vol. 47, no. 13, pp. 2170-2175.
71. Peerschke E.I., Yin W., Grigg S.E., Ghebrehiwet B. Blood platelets activate the classical pathway of human complement. *J. Thromb. Haemost.*, 2006, Vol. 4, no. 9, pp. 2035-2042.
72. Petrucci G., de Cristofaro R., Rutella S., Ranelletti F.O., Pocaterra D., Lancellotti S., Habib A., Patrono C., Rocca B. Prostaglandin E2 differentially modulates human platelet function through the prostanoid EP2 and EP3 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2011, Vol. 336, pp. 391-402.
73. Pintucci G., Froum S., Pinnell J., Mignatti P., Rafii S., Green D. Trophic effects of platelets on cultured endothelial cells are mediated by platelet-associated fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Thromb. Haemost.*, 2002, Vol. 88, pp. 834-842.
74. Qian K., Xie F., Gibson A.W., Edberg J.C., Kimberly R.P., Wu J. Functional expression of IgA receptor FcalphaRI on human platelets. *J. Leukoc. Biol.*, 2008, Vol. 84, pp. 1492-1500.
75. Rahman M., Roller J., Zhang S., Syk I., Menger M.D., Jeppsson B., Thorlacius H. Metalloproteinases regulate CD40L shedding from platelets and pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis. *Inflamm. Res.*, 2012, Vol. 61, pp. 571-579.
76. Ramadan A., Ali, Leah M. Wuescher, Randall G. Worth. Platelets: essential components of the immune system. *Curr. Trends Immunol.*, 2015, Vol. 16, pp. 65-78.
77. Rosenfeld S.I., Looney R.J., Leddy J.P., Phipps D.C., Abraham G.N., Anderson C.L. Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes. *J. Clin. Invest.*, 1985, Vol. 76, no. 6, pp. 2317-2322.
78. Rossaint J., Herter J.M., van Aken H., Napirei M., Döring Y., Weber C. Soehnlein O., Zarbock A. Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. *Blood*, 2014, Vol. 123, no. 16, pp. 2573-2584.
79. Rossaint J., Kühne K., Skupski J., van Aken H., Looney M.R., Hidalgo A., Zarbock A. Directed transport of neutrophil-derived extracellular vesicles enables platelet-mediated innate immune response. *Nat. Commun.*, 2016, no. 7, 13464. doi: 10.1038/ncomms13464.
80. Rouhiainen A., Imai S., Rauvala H., Parkkinen J. Occurrence of amphoterin (HMG1) as an endogenous protein of human platelets that is exported to the cell surface upon platelet activation. *Thromb. Haemost.*, 2000, Vol. 84, no. 6, pp. 1087-1094.
81. Rozman P., Bolta Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat.*, 2007, Vol. 16, pp. 155-165.
82. Scheuerer B., Ernst M., Dürbaum-Landmann I., Fleischer J., Grage-Griebenow E., Brandt E., Flad H.D., Petersen F. The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood*, 2000, Vol. 95, pp. 1158-1166.
83. Scull C.M., Hays W.D., Fischer T.H. Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets. *J. Inflamm. (Lond.)*, 2010, no. 7, pp. 53-58.

84. Shiraki R., Inoue N., Kawasaki S., Takei A., Kadotani M., Ohnishi U., Ejiri J., Kobayashi S., Hirata K., Kawashima S., Yokoyama M. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb. Res.*, 2004, Vol. 113, pp. 375-385.
85. Simon D.I., Chen Z., Xu H., Li C.Q., Dong J.F., McIntire L.V., Ballantyne C.M., Zhang L., Furman M.I., Berndt M.C., López J.A. Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, pp. 193-204.
86. Spycher M.O., Nydegger U.E. Participation of the blood platelet in immune reactions due to platelet-complement interaction. *Infusionsther. Transfusionsmed.*, 1995, Vol. 22, no. 1, pp. 36-43.
87. Steinhubl S.R., Badimon J.J., Bhatt D.L., Herbert J.M., Luscher T.F. Clinical evidence for anti-inflammatory effects of anti-platelet therapy Steinhubl in patients with atherothrombotic disease. *Vasc. Med.*, 2007, Vol. 12, no. 2, pp. 113-122.
88. Stephen J., Emerson B., Fox K.A., Dransfield I. The uncoupling of monocyte-platelet interactions from the induction of proinflammatory signaling in monocytes. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 11, pp. 5677-5683.
89. Tilley S.L., Coffman T.M., Koller B.H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J. Clin. Invest.*, 2001, Vol. 108, pp. 15-23.
90. Vieira-de-Abreu A., Campbell R.A., Weyrich A.S., Zimmerman G.A. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin. Immunopathol.*, 2012, Vol. 3, no. 1, pp. 5-30.
91. Violi F., Pignatelli P. Platelet NOX a novel target for anti-thrombotic treatment. *Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 111, no. 5, pp. 817-823.
92. Waehre T., Damas J.K., Pedersen T.M., Gullestad L., Yndestad A., Andreassen A.K., Froland S.S., Semb A.G., Hansteen V., Gjertsen E., Ueland T., Brosstad F., Solum N.O., Aukrust P. Clopidogrel increases expression of chemokines in peripheral blood mononuclear cells in patients with coronary artery disease: results of a double-blind placebo-controlled study. *J. Thromb. Haemost.*, 2006, Vol. 4, no. 10, pp. 2140-2147.
93. Weltermann A., Wolzt M., Petersmann K., Czerni C., Graselli U., Lechner K., Kyrle P.A. Large amounts of vascular endothelial growth factor at the site of hemostatic plug formation *in vivo*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999, Vol. 19, pp. 1757-1760.
94. Xiang B., Zhang G., Guo L., Li X-A., Morris A.J., Daugherty A., Whiteheart S.W., Smyth S.S., Li Z. Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway. *Nat. Commun.*, 2013, no. 4, p. 2657.
95. Yeaman M.R. Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cell Mol. Life Sci.*, 2010, Vol. 67, no. 4, pp. 525-544.
96. Zamora C., Cantó E., Nieto J.C., Ortiz M.A., Diaz-Torné C., Diaz-Lopez C., Llobet J.M., Juarez C., Vidal S. Functional consequences of platelet binding to T lymphocytes in inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 2013, Vol. 94, no. 3, pp. 521-529.
97. Zander D.M., Klinger M. The blood platelets contribution to innate host defense – what they have learned from their big brothers. *Biotechnol. J.*, 2009, Vol. 4, no. 6, pp. 914-926.
98. Zarbock A., Polanowska-Grabowska R.K., Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.*, 2007, Vol. 21, no. 2, pp. 99-111.
99. Zhu L., Huang Z., Stålesen R., Hansson G.K., Li N. Platelets provoke distinct dynamics of immune responses by differentially regulating CD4⁺ T-cell proliferation. *J. Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 12, pp. 1156-1165.

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

Якутени 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

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НК-КЛЕТОК. ВЗГЛЯД ЧЕРЕЗ ПРИЗМУ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ

Михайлова В.А.^{1,2}, Баженов Д.О.¹, Белякова К.Л.¹, Сельков С.А.¹,
Соколов Д.И.^{1,2,3}

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

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

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

Резюме. Все лимфоидные клетки относят к врожденному или адаптивному звену иммунитета согласно механизмам реализации иммунных реакций. Реализация функциональной активности НК-клеток не связана с процессами предварительной активации в результате контакта с антигеном, реаранжировкой генов антигенраспознающих рецепторов и клональной пролиферацией. В связи с этим НК-клетки традиционно относят к клеткам врожденного иммунитета. Ранее полагали, что единственной популяцией лимфоидных клеток врожденного иммунитета являются НК-клетки, однако в последние годы в литературе появляется все больше свидетельств существования различных популяций этих клеток, что послужило основанием для выделения общего кластера под названием «лимфоидные клетки врожденного иммунитета» (Innate Lymphoid Cells – ILC). По классификации ILC НК-клетки относят к первой группе врожденных лимфоидных клеток согласно их общим функциональным характеристикам, а также участию транскрипционного фактора T-bet в их дифференцировке. Сложность, многоэтапность и частично нелинейный характер дифференцировки НК-клеток связаны с влиянием клеточного микроокружения, последовательной экспрессией транскрипционных факторов и активацией различных внутриклеточных путей передачи сигнала в НК-клетках. В обзоре рассматривается место НК-клеток в классификации ILC, основные транскрипционные факторы, участвующие в процессе дифференцировки НК-клеток. Авторами предпринимается попытка обобщить основные пути внутриклеточной передачи сигнала в НК-клетках в зависимости от активации цитокинами, присутствующими в клеточном микроокружении и оказывающими влияние на НК-клетки. Особым объектом дифференцировки НК-клеток являются НК-клетки децидуальной оболочки при беременности. Кроме НК-клеток, в составе децидуальной оболочки присутствуют стромальные клетки, клетки трофобласта, макрофаги. В обзоре рассмотрен частный случай влияния клеток микроокружения на экспрессию транскрипционных факторов и активацию внутриклеточных мессенджеров НК-клеток на примере клеток трофобласта. Открытое в настоящее время многообра-

Адрес для переписки:

Михайлова Валентина Анатольевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 328-98-50.
E-mail: mva_spb@mail.ru

Address for correspondence:

Mikhailova Valentina A.
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
199034, Russian Federation, St. Petersburg,
Mendeleev Line, 3.
Phone: 7 (812) 328-98-50.
E-mail: mva_spb@mail.ru

Образец цитирования:

В.А. Михайлова, Д.О. Баженов, К.Л. Белякова, С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Дифференцировка НК-клеток. Взгляд через призму транскрипционных факторов и внутриклеточных мессенджеров» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 21-38. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-21-38
© Михайлова В.А. и соавт., 2019

For citation:

V.A. Mikhailova, D.O. Bazhenov, K.L. Belyakova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov "Differentiation of NK cells. A look through the prism of transcription factors and intracellular messengers", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 21-38. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-21-38
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-21-38

зие НК-клеток, реализующееся в зависимости от микроокружения в процессе их дифференцировки, требует дальнейшего изучения.

Работа поддержана грантом НШ-2873.2018.7. Участие Баженова Д.О. поддержано стипендией Президента РФ СП-2836.2018.4.

Ключевые слова: НК-клетки, лимфоидные клетки врожденного иммунитета, дифференцировка, транскрипционные факторы, внутриклеточные мессенджеры, децидуальные НК-клетки, трофобласт

DIFFERENTIATION OF NK CELLS. A LOOK THROUGH THE PRISM OF TRANSCRIPTION FACTORS AND INTRACELLULAR MESSENGERS

Mikhailova V.A.^{a, b}, Bazhenov D.O.^a, Belyakova K.L.^a, Selkov S.A.^a, Sokolov D.I.^{a, b, c}

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

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

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

Abstract. All lymphoid cells are referred to as an innate or adaptive immunity unit in terms of the mechanisms of performing immune reactions. The functional activity of natural killer (NK) cells is not associated with pre-activation processes resulting from contact with antigen, rearrangement of antigen-recognition receptor genes, and clonal proliferation. In this regard, NK cells are traditionally referred to as cells of innate immunity. Previously, it was believed that NK cells represent the only population of innate immunity lymphoid cells, but, more recently, there has been increasing evidence in the literature concerning existence of different populations of these cells, thus serving a basis for isolating a common cluster called Innate Lymphoid Cells (ILC). According to the ILC classification, NK cells are classified as the first group of innate lymphoid cells according to their overall functional characteristics, as well as contribution of the T-bet transcription factor to their differentiation. Complexity, multistage and partially nonlinear character of NK cell differentiation are associated with influence of the cellular microenvironment, consistent expression of transcription factors and activation of various intracellular signaling pathways in NK cells. The review considers positioning of NK cells in the ILC classification, the main transcription factors involved in NK cell differentiation. The authors are seeking for generalization of the major routes of intracellular signal transmission in NK cells depending on their activation by cytokines located in the cellular microenvironment and affecting NK cells. The decidual NK cells during pregnancy represent a special object of NK cell differentiation. Stromal cells, trophoblast cells and macrophages are present in the decidua, in addition to NK cells. The review concerns a special case of microenvironmental effects upon expression of transcription factors and activation of NK intracellular messengers, while considering trophoblast cells an example of such influences. The recently discovered variety of NK cells, induced by the microenvironment in the course of their differentiation, requires further study. The work is supported by the grant NSh-2873.2018.7. The participation of D.O. Bazhenov was supported by a Presidential scholarship of the Russian Federation SP-2836.2018.4.

Keywords: NK cells, innate immunity lymphocytes, differentiation, transcription factors, intracellular messengers, decidual NK cells, trophoblast

The work was supported by the Council on Grants of the President of the Russian Federation (Grant No. NSh-2873.2018.7). The participation of D.O. Bazhenov was supported by a scholarship of the President of the Russian Federation (SP-2836.2018.4).

Lymphoid cells of innate immunity

All lymphoid cells are referred to as an innate or adaptive immunity unit in terms of the mechanisms of performing immune reactions. Lymphoid cells that determine the development of reactions of adaptive immunity are T and B lymphocytes. In the process of

their antigen-independent differentiation, the antigen-recognizing receptors of T and B lymphocytes (TcR and Ig, respectively) mature, including recombining the gene sections of the chains of these receptors. The biological meaning of recombination of the genes of T and B lymphocyte receptors is to increase the diversity of the antigen-recognition regions of the receptors. After recognition of the antigen by T and B lymphocytes, their clonal proliferation takes place, when a large number of lymphocytes are formed, capable of binding a specific antigen, which stimulated

their proliferation. Clonal proliferation increases the number of CD4⁺T-helper lymphocytes, CD8⁺ cytotoxic T and B lymphocytes [23]. During antigen-dependent differentiation of T and B lymphocytes, part of the proliferating clone cells differentiates as memory cells [23]. Among lymphoid cells, controlling the development of effector mechanisms of innate immunity, NKT cells and NK cells are determined [23]. Implementation of the functional activity of NK cells is neither associated with the processes of pre-activation due to the contact with antigen, nor with the rearrangement of gene antigen-recognizing receptors, nor with the clonal proliferation; and therefore the NK cells are traditionally attributed to the cells of innate immunity [23].

Previously, it was believed that NK cells are the only population of innate immunity lymphoid cells. However, in recent years, there has been increasing evidence in the literature on the existence of different populations of lymphoid cells that belong to the group of innate immunity lymphoid cells (Innate Lymphoid Cells – ILC). Most of the data on the characteristics of ILC, presented in the literature, was obtained by studying them in model animals, mainly mice. Among the ILC, conventional NK cells (cNK) and ILC1, ILC2 and ILC3 populations are distinguished. In 2013, Spits et al. proposed the nomenclature of lymphoid cells of innate immunity, based on the cytokines secreted by these cells and the main transcription factors involved in their differentiation [68]. They identified three groups of ILC. The cells of the first group (group 1 ILC) include ILC1 and NK cells secreting IFN γ [68]. For group 1 ILC, namely, ILC1 and NK cells, expression of the T-bet transcription factor is characteristic. At the same time, in addition to T-bet, NK cells also express the Eomes transcription factor [69]. The cells of the second group of ILC

(group 2 ILC) are ILC2, which are characterized by the secretion of IL-5 and IL-13. Differentiation of ILC2 occurs with the participation of the ROR α and GATA3 transcription factors [68]. The third ILC group (group 3 ILC) is ILC3, for the differentiation of which ROR γ t is required, and which secrete IL-17 and IL-22. Within group 3 ILC, ILC3 population is distinguished, which secrete only IL-22, and when stimulated with IL-12 and IL-18, may differentiate as ILC1, as well as lymphoid tissue-inducing cells (LTi), necessary for lymph node formation during the embryogenesis stage [68]. In humans, individual ILC groups (shown for RORc⁺ILC, which can be classified as ILC3) may be in an inactive state in secondary lymphoid organs, but when activated may be involved in the implementation of inflammatory responses due to IL-17 and IL-22 cytokine production. [30]. For the differentiation of all ILC groups, expression of the cytokine common γ -chain is required, which is a part of IL-2R, IL-7R, IL-9R, IL-15R, IL-21R [68] (Table 1). Given the diversity of ILC and certain similarities to existing groups of T-helper (Th) lymphocytes, existence is possible of ILC evolutionary continuity between innate immunity and T lymphocytes of the adaptive immunity [70, 73].

Analysis of transcribed genes in ILC1, ILC2, ILC3 and NK cells did not show unique genes that regulate the development of a particular population [56], indicating flexibility of individual stages of differentiation, and the possibility of mutual ILC transitions [56]. For example, ILC2 are characterized by secretion of IL-5 and IL-13 after stimulation with IL-25 or IL-33 [18], while ILC3 are characterized by the expression of IL-22 and IL-17 [18]. Between the populations of ILC2 and ILC3, there is the possibility of mutual transition: under the influence of IL-12, ILC2

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF ILC GROUPS

Characteristic	cNK	ILC1	ILC2	ILC3
Phenotype (in humans)	CD3 ⁺ CD56 ⁺ [69] CD4 ⁺ [68] NKp46 ⁺ [69] CD49b ⁺ [69] CD94 ⁺ [69] NKG2D ⁺ [69] NKp30 ⁺ [69] NKp46 ⁺ [69] IL-12R ⁺ [66] IL-15R ⁺ [66] IL-18R ⁺ [66]	CD3 ⁺ [28] CD4 ⁺ [68] CD27 ⁺ [69] CD56 ⁺ [69] CD94 ⁺ [69] CD127 ⁺ [69] NKp46 ⁺ [68]	CD3 ⁺ [28] CD4 ⁺ [68] CD127 ⁺ [68] NKp46 ⁺ [68] CRTH2 ⁺ [66] IL-18R ⁺ [66] CD161 ⁺ [66] IL-25R ⁺ [66] IL-33R ⁺ [66] IL-17R ⁺ [28]	CD3 ⁺ [28] CD4 ⁺ [68] CD56 ⁺ [69] CD127 ⁺ [68] NKp44 ⁺ [66] IL-18R ⁺ [66] IL-1R ⁺ [66] IL-23R ⁺ [66]
Secreted cytokines	IFN γ [68] TNF α [66]	IFN γ [68] TNF α [66]	IL-5, IL-13 [68] IFN γ [66] IL-4 [66] IL-3, IL-8 [28] IL-9, IL-21 [28]	IL-17, IL-22 [66, 68] IL-2, TNF α [66]
Transcription factors	T-bet [69] Eomes [69]	T-bet [69]	ROR α [68] GATA3 [68]	ROR γ t [68]

and ILC3 can be transdifferentiated into ILC1. Under the influence of IL-4 and IL-23, ILC1 in turn can differentiate into ILC2, and IL-23 will promote differentiation of ILC1 into ILC3 [69]. It was shown that LT α can differentiate into ILC2 and secrete IL-5 and IL-13 after exposure to IL-2 in combination with TLR2 ligands [13]. Such flexibility is associated with inhibition of GATA-3 and ROR γ t transcription factors and the activation of T-bet [69]. It was shown that ROR γ t⁺ ILC can differentiate into ILC1 under the influence of IL-2 and IL-12 [4]. Depending on the tissue (thymus, liver, salivary glands), the phenotype of ILC1 and their functional characteristics may differ. For example, the liver ILC1 are characterized by the performance of cytotoxicity through the TRAIL-mediated pathway, and not through granzymes and perforin [69]. Probably, the conditions of the microenvironment can have a significant effect on the ILC, erasing to a certain extent the differences between the currently determined ILC1 and cNK [60, 69].

Not only is the differentiation of ILC under the influence of the cytokine microenvironment, but vice versa, ILC affect the surrounding cells and tissues. So, ILC of the spleen, located near the T and B lymphocytes, in the adult body express the OX40L and CD30L costimulatory molecules, characteristic for T lymphocytes. Due to these costimulatory molecules, the spleen ILC can contribute to the survival of Th2 lymphocytes and memory T cells [70]. ILC promote differentiation of plasma cells in Peyer's glands and switching of synthesized antibodies towards IgA [70]. In the reviews of Tait Wojno et al. (2012) and Spits et al. (2012), the authors describe that ILC2, under the influence of IL-25 and IL-33 secreted by intestinal epithelial cells in helminthiasis, increase the secretion of IL-5, which stimulates the proliferation of eosinophils. Also, ILC2 support activation of Th2 lymphocytes and stimulate, thus, the adaptive immune response [70, 72]. Thus, the formation of different ILC groups is performed under the control of microenvironment cells. At the same time, ILC can influence both other cells of innate immunity, and regulate the reactions of adaptive immunity.

Place of NK cells in the group of lymphoid cells of innate immunity

cNK cells are considered in the framework of differentiation of the first group of ILC, which also include ILC1. At the moment, it has not been possible to identify intracellular and surface markers that would clearly allow the population of cNK cells and ILC1 to be separated (Table 1) [69]. A significantly overlapping spectrum of transcribed genes in NK cells and ILC1 suggests both the late discrepancy between these populations in the differentiation process and the subsequent differentiation of immature NK cells and later mature NK cells, from ILC1 [56].

Despite the existence of a generalizing classification of H. Spits et al., more and more refinements are observed in the literature concerning different ILC groups and the position of NK cells in this classification. In addition to the cNK cells present predominantly in the peripheral blood, nonconventional NK cells are distinguished within the NK cell population, which in turn include the NK cells of the thymus, liver, lungs, skin, uterus, kidneys, pancreas and salivary glands [20]. The existing diversity of populations of tissue-resident NK cells causes difficulties with the unambiguous determination of their place in the ILC classification. In experiments using mice, it has been shown that, in the absence of infections, ILC1 remains predominantly tissue-resident, while cNK cells recirculate [69]. In some works, cNK is referred to ILC with predominantly killer activity [18]. At the same time, in other studies, ILC1 is differentiated from cNK cells by the reduced or no cytotoxic activity [69], the absence of expression of the *Gzma* and *Prf1* genes encoding, respectively, granzyme A and perforin [56], absence of granzyme B and perforin [4], as well as the absence of expression of receptors for IL-15 and KIR3DL1 [4]. At the same time, the separation of ILC1 and cNK is to a certain extent conditional, since in part the expression profiles of surface receptors of these cell populations [18], as well as their transcription factors [68] overlap. Thus, analysis of transcriptomic programs of ILC and NK cells revealed that NK cells are different from ILC1 by the presence of the *Eomes* gene expression in the liver and in the spleen and in the lamina propria of the mouse small intestine [56]. In general, the mouse model shows that the *Tnfrsf10*, *Tnf* and *Cxcr6* genes are transcribed in the spleen and liver ILC1, while the *Eomes* genes, *Ilgam* genes (encoding CD11b), the *Klra* gene family (encoding the Ly49 family) are transcribed in the NK cells [56].

Thus, according to the ILC classification, NK cells belong to the group 1 innate lymphoid cells according to their general functional characteristics, as well as the participation of the T-bet transcription factor in their differentiation. The complexity and multistage process of differentiation of NK cells involves the participation of many transcription factors, which will be discussed in the next section.

Participation of transcription factors in the process of differentiation of NK cells within the ILC branch

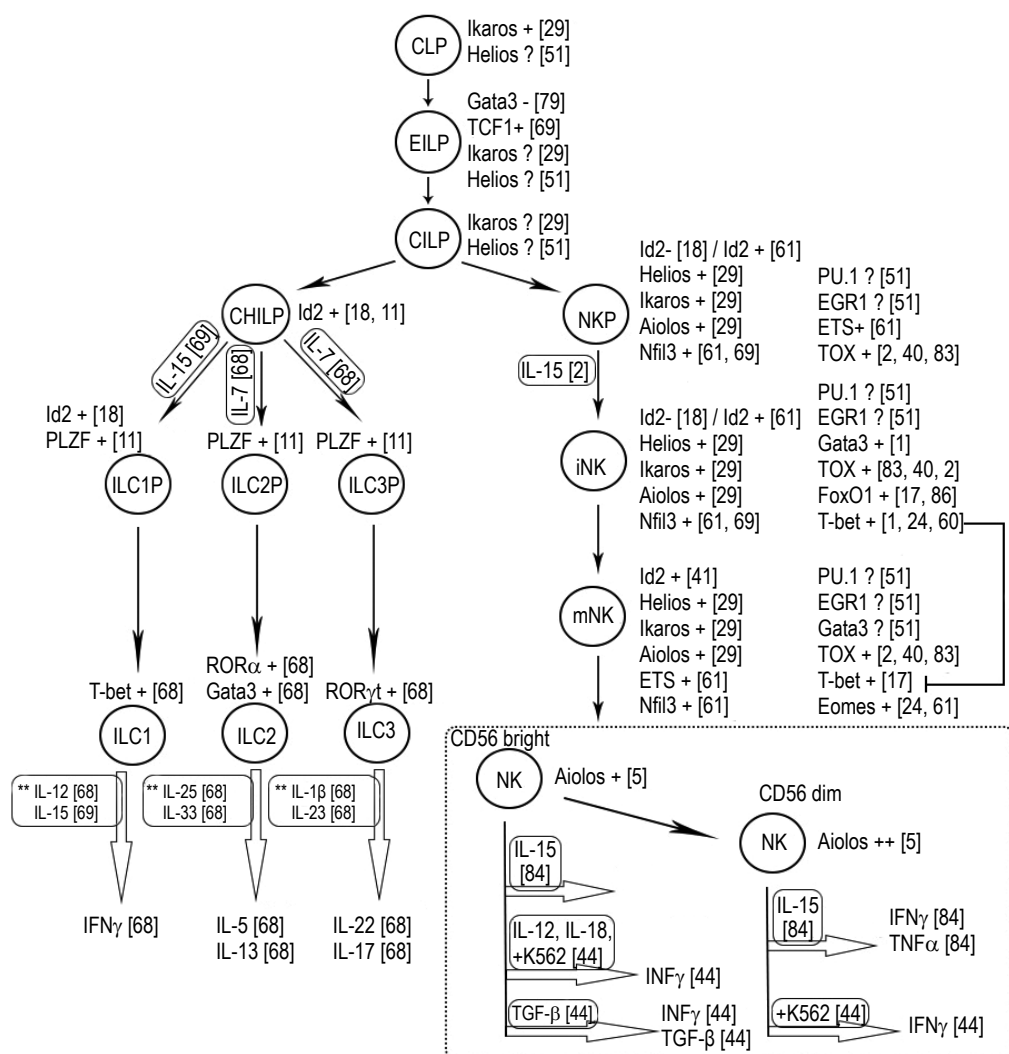
The mouse is the model object in most studies concerning the research of transcription factors involved in the control of differentiation of various ILC groups, in particular NK cells. Despite certain differences in the ILC phenotype in humans and mice, we may make some analogy, since the ILC localization, their functions and the transcription factors participating in their formation, are similar in the human and mouse ILC [72]. Differentiation of different stages of NK cells involves a spectrum of different transcription

factors: Id2, Nfil3, TOX, ETS1, Eomes, GATA-3, FoxO1, Ikaros, T-bet, Aiolos [29, 53, 60, 83]. However, these transcription factors are not unique to the regulation of NK cells, they also participate in the differentiation of other ILCs. At present, the role of these factors in the differentiation of NK cells is not yet defined unambiguously. This section provides information on some of the transcription factors, which impact the main stages of maturation of NK cells (Figure 1).

Id2 transcription factor in differentiation of NK cells

Forming the bulk of NK cells occurs in the bone marrow, but NK cells may also differentiate in the lymph nodes of CD34⁺ hematopoietic stem cells [45, 59]. It is believed that the differentiation of NK cells

begins with the stage of the common lymphoid progenitor (CLP) [18]. CLP differentiates into an early progenitor of ILC (EILC), the formation of which is associated with the expression of the transcription factor TCF1 [69]. Sequential differentiation into the common progenitor of ILC (CILP) is associated with the expression of the Id2 transcription factor [18]. Id2 can also claim to be the main transcription factor regulating ILC differentiation, since mice with a defect in this transcription factor were characterized by the absence of all ILC populations, while the differentiation of T and B lymphocytes was not impaired [18]. If Id2 is defective, mice do not develop lymphoid organs and Peyer's glands, and the number of NK cells is greatly reduced [89]. The Id2 transcription factor is one of



* – FoxO1 suppresses the expression of the T-bet transcription factor [17].

** – Due to the diversity of ILC, depending on the tissue microenvironment, the cytokines regulating the differentiation of individual ILC populations are not clearly defined.

? – Differences in the tactics used to investigate the degree of differentiation of NK cells complicate the unambiguous attribution of these factors to a certain stage in the presented scheme.

Figure 1. The main stages of differentiation of NK cells within the ILC classification and associated transcription factors

Note. CLP is a common lymphoid progenitor, EILC is an early progenitor of ILC, CILP is a common progenitor of ILC, CHILP is a common lymphoid progenitor of innate lymphocytes similar to helper cells, ILC1P is an ILC1 progenitor, ILC2P is an ILC2 progenitor, ILC3P is an ILC3 progenitor, NKP is a progenitor of NK cells, iNK are immature NK cells, mNK are mature NK cells.

the proteins that bind to E-proteins, thus blocking the possibility of binding of E-proteins and DNA [70]. E-proteins include E12 and E47, which regulate the development of B lymphocytes and participate in the differentiation of T lymphocytes [70]. E-proteins also include E2-2, which determines the development of plasmacytoid dendritic cells, and HEB involved in the development of T lymphocytes [70]. Thus, Id2 controls the switching of the CLP differentiation program towards ILC [70]. Later, Id2⁺ CHILP was isolated as a separate stage of differentiation, a common lymphoid progenitor of innate lymphocytes like helper cells (CHILP), which in turn gives rise to differentiation of various ILC populations, but not cNK [69]. Id2⁺ CHILP are not a homogeneous population by the profile of transcription factors, since, for example, only 50% of them express the PLZF transcription factor, encoded by the *Zbtb16* gene [11]. Previously, this transcription factor was considered as determining the differentiation of NKT cells [11]. PLZF^{high} + ILC progenitors give rise to ILC1, ILC2, ILC3, but not NK cells [11]. The CHILP stage in ILC differentiation has been validated for mice; for humans, the CHILP-ILC transition linearity and presence of the CHILP stage is under discussion [59]. Data on Id2 expression after the CHILP stage are inconsistent. According to one data, after the CHILP stage, Id2 is not expressed, since the progenitors of NK cells are predominantly Id2⁻ [18]. According to other data, NKP weakly express Id2 [61]. In the late stages of differentiation, the mature NK cells (mNK) express Id2 [18]. Probably, Id2 is expressed in immature NK cells (iNK), since in experiments using mice it was shown that Id2 is involved in the stage of differentiation of immature NK cells (iNK) into mature NK cells (mNK) [40]. In mice, it was shown that as the NKP differentiates into mNK, Id2 expression increases [61]. In the model of differentiation of human NK cells from CD34⁺ mononuclear cord blood cells *in vitro*, it was shown that in addition to Id2, in the early stages of NK cell line differentiation, transcription factors EGR-1 and PU.1 are expressed, then their expression decreases [51]. The cell phenotype after different cultivation times in this research was not evaluated, which makes it difficult to accurately determine the stage of differentiation where these transcription factors were expressed.

GATA-3 transcription factor in differentiation of NK cells

The differentiation of NK cells is negatively affected by the activation of the transcription factor GATA-3 at the CLP stage, which leads to disruption in the formation of NK cells and the predominance of T lymphocyte differentiation. Inhibition of GATA-3, regulating Notch signaling pathway in CLP, promotes transcription of genes involved in controlling formation of NK cells [79]. At the same time, the mouse model shows that the deficiency of GATA-3 in the later stages of differentiation of NK cells, namely iNK,

leads to a decrease in the expression of *Id2*, *T-bet* and *Nfil3* (*E4bp4*) genes, which in turn leads to disrupting differentiation of NK cells at the early stages [1]. For example, NK cells of mice deficient of GATA-3 showed reduced ability to secrete IFN γ , however degranulation and associated expression of LAMP-1 by NK cells was comparable with that of intact control mice [1]. Also, migration from the bone marrow has been impaired in GATA-3-NK cells, which is probably due to a defect in the expression of the CD11b adhesion molecule and an increased expression of CXCR4 binding the chemokine CXCL12 present in the bone marrow [1]. At the same time, iNK with GATA-3 defect has a high proliferative ability, when infected with mouse cytomegalovirus (MCMV), their number increases. Given that the cytotoxic activity of the cells was maintained at a level comparable to the cytotoxicity of intact NK cells, it's possible that iNK may participate in the antiviral defense [1]. The transcription factor GATA-3 not only participates in the regulation of the early stages of differentiation of NK cells. For humans, the expression of *GATA-3* is accompanied by reduced expression of *NKG2A* gene which indicates a GATA-3 involvement in the regulation of the functional properties of NK cells [51].

Transcription factor ETS1 in differentiation of NK cells

In mice, it was shown that the differentiation of the NK cell line is associated with the expression of the transcription factor ETS1 predominantly in the iNK [52]. According to Seillet et al., *ETS1* expression is observed in the stages NKP, iNK and mNK with peak at the stage of iNK [61]. ETS1 binds directly to the *Tbx21* gene, which encodes the transcription factor T-bet, and *Cd122*, which encodes the IL-2 receptor, and regulates the expression of Id2 [52]. It should be noted that, despite the involvement of the ETS1 transcription factor in the early stages of NK cell differentiation, the knockout of its gene results in a violation of the expression by NK cell of such functional receptors as NKp46, Ly49D, Ly49H in mice, a proliferation disorder in response to IL-15 and violation of the cytotoxic activity of NK cells associated with the release of granzymes and perforin [52].

Transcription factor Nfil3 (E4bp4) in differentiation of NK cells

In a study in mice, it was also shown that the mRNA of the transcription factor Nfil3 (*E4bp4*) was detected in the stages of differentiation of NKP, iNK and mNK [61]. An increase in the expression of the *Nfil3* gene was observed in mNK [41]. In mice having a mutant *Nfil3* gene, decreased expression of *Eomes* was observed in mNK, indicating the involvement of the transcription factor Nfil3 in regulating differentiation of mature NK cells [61]. Nfil3 can bind to the regulatory regions of DNA controlling transcription of Id2 and *Eomes* [41]. Expression of *Nfil3* and *Id2*

transcription factors in NKP cells leads to a synthesis and exposure on the cell surface of the IL-15 receptor (IL-15R β / γ) encoded by *Il2rb* and *Il2rg* genes [53]. In this way, *Nfil3* promotes the differentiation of mature NK cells by inducing *Eomes* expression [41, 61]. However, the expression of *Nfil3* is not homogeneous for different populations of tissue-resident NK cells. It has been found that NK cells and ILC1 of the lamina propria of the mouse small intestine stand out by most highly expressed *Nfil3* gene, while low expression of this factor is characteristic of NK cells and ILC1 of liver and spleen [56].

Transcription factors of the Ikaros family in differentiation of NK cells

During differentiation of NK cells from CLP, expression of *Ikzf1* and *Ikzf2* genes was also observed, which encode, respectively, transcription factors of the Ikaros family (Ikaros and Helios) [29, 51]. Moreover, *Ikzf1* expression persists throughout the whole path from CLP to mNK [29]. Expression of *Ikzf2* is low at the initial stages of differentiation, when the NK cell line is not yet expressed (CLP), and increases in NKP, iNK and mNK [29]. In mice, it is shown that while the NKP line is isolated, the expression of the *Ikzf3* gene encoding the transcription factor Aiolos, which also belongs to the Ikaros factor family, also occurs. And its expression is preserved until the stage mNK [29]. Aiolos regulates differentiation of NK cells regardless of the factor T-bet [29]. In mice having a mutant *Ikzf3* gene, presence of large amounts of immature NK cells in bone marrow was observed [29]. The transcription factor Aiolos is also involved in the regulation of the functional activity of mature NK cells. In mice with a gene knockout of this factor, NK cells possess increased cytotoxic activity against tumour cells, but did not cause the death of virus-infected cells [29]. In humans, Aiolos expression is shown for NK cells with phenotype CD56^{dim} and CD56^{bright} of peripheral blood, which can be regarded as mNK. In CD56^{dim} NK cells, the Aiolos content was higher, which suggests the involvement of this factor in the terminal stages of differentiation of NK cells [5].

Transcription factor FoxO1 in differentiation of NK cells

In mice, it was shown that activation of transcription factor FoxO1 at the stage of iNK is necessary for differentiation of NK cells [17, 86]. This transcription factor regulates the autophagic process of cells, during which certain proteins and organelles degrade, and this ultimately helps to maintain cell homeostasis [86]. The process of autophagy promotes elimination of damaged mitochondria and thus prevents the induction of NK cells apoptosis caused by active oxygen species [86]. Mice knocked-out in FoxO1 demonstrate violations of the later stages of differentiation of NK cells and impaired homing of NK cells in the

lymph nodes [17]. Mice knocked-out in FoxO1, also demonstrated increased cytotoxic activity against tumour cells, which indicates that FoxO1 has a moderating role in the anti-metastatic activity of NK cells [17]. Transcription factor FoxO1 is a negative regulator of differentiation of NK cells. When it is phosphorylated, the ability to bind to DNA is blocked. Cytokines such as IL-2, IL-12 and IL-15 induce phosphorylation of FoxO1, which was shown in NK cells, NK-92 line and murine spleen NK cells [17]. FoxO1 suppresses the expression of the transcription factor T-bet at the late stage of NK cell differentiation (mNK). With a FoxO1 defect, there is an increased production of T-bet, as well as an increase in the cytotoxic function of NK cells and the secretion of IFN γ [17].

Transcription factor TOX in differentiation of NK cells

In mice, it was shown that the transcription factor TOX is involved in differentiation from NKP to mNK [2, 40]. At the stage of iNK and mNK, *Tox* gene expression significantly exceeds the expression at the NKP stage [2]. In mice with a defect of this transcription factor, there is almost complete absence of LTi cells, as a result, the formation of lymph nodes is disrupted [2]. Mutants in the *Tox* gene of NK cells show a decreased production of Id2 [2]. For humans, there are two forms of the transcription factor – TOX1 and TOX2. The genes of both transcription factors were expressed in NK cells during differentiation from CD34⁺ cells *in vitro*. Moreover, the *TOX1* and *TOX2* expression level increased with duration of cultivation and acquisition by cells of phenotype CD34-CD94⁺, which may indicate the involvement of these factors in regulating the formation of mature NK cells [83]. TOX2 can directly regulate the expression of the transcription factor T-bet [83]. By knockout of the *Tox* gene, the cytotoxic activity of NK cells is significantly reduced, which may be due to the observed reduced expression of perforin [83].

Transcription factors T-bet and Eomes in differentiation of NK cells

Transcription factors that are most frequently associated with terminal differentiation of NK cells are T-bet and Eomes [60, 75]. Mice show that T-bet regulates the formation iNK, stimulates NK cell egress from the bone marrow and induces the expression of IL-2R β [60]. Eomes contributes to the NK cells acquiring functional receptors Ly49 [60]. Also, using mice as the animal model demonstrated that violation of the T-bet expression results in disruption of maturation and differentiation of NK cells and loss of NK cells function associated with the antiviral response [55]. For NK cells of human peripheral blood, expression of T-bet and Eomes is also characteristic [65]. It should be pointed out, that one of the possible complications of allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells is the reduction of antiviral

protection and the ability to prevent the “graft-versus-host” reaction by NK cells. This complication correlates with reduced expression of T-bet in NK cells, which in turn confirms the participation of T-bet in the implementation of the functional activity of NK cells in humans [65]. The mouse model shows that in the absence of the transcription factors T-bet and Eomes, the differentiation of NK cells is impaired. Eomes knocked-out mice revealed an increase of iNK cells with T-bet expression [24]. After stimulation of peripheral blood NK cells with IL-2, the expression of *Eomes* genes increases [25]. T-bet induces the expression of the transcription factor Zeb2, the activity of which promotes the release of NK cells from the bone marrow [80]. Zeb2 regulates terminal differentiation of NK cells in both mouse and human subjects. By increasing the expression of T-bet, Zeb2 expression is also increased, which is associated with terminal differentiation of NK cells [80].

Thus, during the differentiation of NK cells from CLP to mNK, a sequential regulation of the expression of transcription factors is observed, which in turn promotes the expression of receptors for cytokines and cytotoxic receptors, and also stimulates the synthesis of granzymes by NK cells. Partial regulation of transcription factors in the expression of receptors for cytokines determines the possibility of the effect of the cytokine microenvironment on the differentiation of NK cells. Cytokines of the microenvironment, by communicating with their corresponding receptors of NK cells, can activate various cascades of intracellular signaling. In the next section, the main cytokines involved in the regulation of NK cell differentiation and activation, as well as the signal cascades activated by them, will be examined.

Activation of intracellular signaling pathways in NK cells depending on the cytokines of the microenvironment

Microenvironment cells can influence both the differentiation of NK cells and their functional characteristics. For example, IL-15 and IL-2 stimulate the cytotoxic reactions of NK cells, while TGF- β suppresses them [27]. Depending on the cytokine, signaling in the NK cell can take place with the participation of different cascades of intracellular messengers.

Activation of intracellular signaling pathways in NK cells by cytokines which receptors contain a common γ chain: IL-15, IL-2, IL-7

IL-15 is one of cytokines that play an important part in the NK cells differentiation and acquisition of functional characteristics [16]. IL-15 refers to cytokines which receptors contain a common γ -chain (IL-2, IL-7), so that their intracellular signaling pathways may overlap. Depending on the target cells, IL-15 can trigger activation of the three intracellular signaling pathways from IL-15R: JAK1/JAK3/STAT3/STAT5; PI3K/Akt/mTOR; Ras/Raf/MAPK [7, 27, 46] (Figure 2). In the JAK-STAT path-

way, several JAK-kinases are distinguished: JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2, as well as STAT proteins 1, 2, 3, 4, 5A, 5B and 6 [27]. After the binding of IL-15 to its receptor IL-15R β/γ , the receptor-associated kinases JAK1 and JAK3 become active, which facilitates the phosphorylation of STAT proteins [53]. STAT1 is a key messenger starting IFN γ production by NK cells [27] and, together with STAT5, it is involved in the induction of activation and the cytotoxic activity of NK cells [25, 27]. Cytokine IL-15 induces phosphorylation of STAT3 [27]. It is shown that the intracellular messenger mTOR promotes the phosphorylation of STAT3 [42]. *STAT3* mutations cause increased NK cell proliferation, such mutations often are detected with NK cell lymphomas [36]. Similar mutations of *STAT3* promote enhanced phosphorylation of STAT5B, which consequently remains in the activated state for a long time [36]. In experiments in mice, it was shown that the absence of STAT3 in NK cells does not affect their differentiation, while enhancing the expression of granzyme B, perforin and the activating receptor DNAM-1. Thus, STAT3 inhibits the cytotoxic function of NK cells [26]. STAT5 participates in the signal transmission from IL-15 [27, 42]. For mouse NK cells, the secretion of VEGFA and EGF is shown, with a decrease in the synthesis of STAT5, an increase in the production of VEGFA and EGF is observed, which in turn stimulates the tumour growth [25]. Humans show high production of VEGFA by peripheral blood NK cells with the phenotype of CD16⁺CD56^{bright}, together with a reduced amount of STAT5A and STAT5B [25]. The target gene of STAT5 is *Mcl1*, which maintains the survivability of the NK cell pool [53]. STAT5 is also involved in the regulation of the expression of anti-apoptotic genes *Bcl-xl*, *Bcl2* [14]. In mice having mutant *STAT5A* and *STAT5B* genes, there are no NK cells [14]. Activation of STAT6 reduces the cytotoxic activity of NK cells in cell culture [27]. A violation of the expression of the genes *Jak3*, *Stat5* or *Mcl1* leads to significant violations of NK cell functions [53].

When NK cells are activated via the JAK-STAT signaling pathway, the transcription of the *Cish* and *Socs1-7* genes occurs. The products of these genes (CIS and SOCS1-7, respectively) bind phosphorylated tyrosine kinase residues, and thus realize the mechanism of negative feedback, inhibiting the activation of NK cells [53]. The products of the genes *Cish* and *Socs1-7* belong to the SOCS family of proteins, the main mechanism of which is the initiation of proteasomal degradation of SOCS protein ligands [53]. CIS signaling protein binds JAK1, which phosphorylates STAT5, and triggers its proteasomal degradation, which leads to blocking of the signal from the receptor to IL-15 and containment thereby of the NK cells activation [15]. The mice with the *Cish* gene mutation observed increased proliferation of NK cells in re-

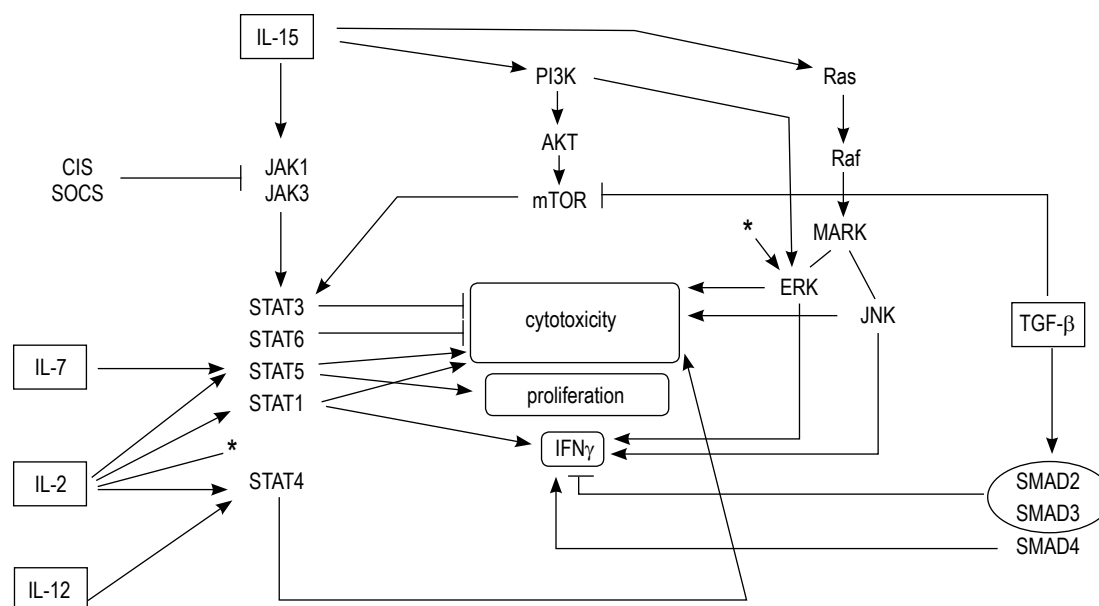


Figure 2. General scheme of activation of intracellular signaling pathways in NK cells depending on the microenvironment cytokines

Note. * IL-2 can cause activation of NK cells by phosphorylation of ERK.

sponse to low concentrations of IL-15 which did not cause proliferation of NK cells in the control group of mice [15]. In mice with a *Cish* gene mutation, no violations of AKT phosphorylation after IL-15 effects on NK cells were observed, indicating the specificity of blocking signal transmission from IL-15 by CIS protein precisely for the JAK-STAT pathway [15].

In addition to the JAK-STAT pathway for IL-15, activation of the MAPK (mitogen-activated protein kinase) signaling pathway, including activation of mitogen-associated protein kinases – ERK and JNK, is shown [49, 90]. Activation of these kinases by IL-2 cytokine, the receptor of which contains a common γ -chain with the IL-15 receptor, is accompanied by NK cells acquisition of the ability to secrete IFN γ and increase the cytotoxic activity [90]. As mentioned earlier, IL-15 also stimulates the signal through the signal pathway associated with the activation of mTOR [42], which participates in signal transmission from PI3K. So, in CD56^{bright} NK cells, IL-15 causes activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway, as well as the Ras/Raf/MAPK pathway of intracellular signaling. At the same time, during the IL-15 activation and induction of antitumor activity in the CD56^{dim} NK cells, the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway was not engaged [84]. It should be pointed that the PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MAPK paths can overlap. Thus, PI3K activation in NK cells leads to activation of ERK by Ras activation independent pathway that eventually leads to the induction of NK cell cytotoxicity [32]. For NK cells of the NK-92 line, regulation of signal transmission from the Syk kinase to the PI3K and ERK is also shown [32].

In addition to IL-15, activation of NK cells can be induced by IL-2 and IL-7. IL-2 has been shown to increase the proliferative activity of peripheral blood NK cells when administered intravenously to patients with advanced cancer [8] and when administered subcutaneously to patients with a chronic ‘graft-versus-host’ reaction. After intravenous administration of IL-2, NK cell secretion of IFN γ results in autocrine and paracrine activation of STAT1 NK cells and the formation of pSTAT1 [64]. In humans, at mutation of protein STAT1 gene, terminally differentiated NK cells as well as function of the cytotoxic NK cells are impaired [81]. In addition to STAT1, IL-2 induces activation of STAT4 in NK cells [85]. When the signal is transmitted from IL-2 and IL-7, activation of STAT5 occurs [27, 33]. In healthy donors with stimulation of IL-7 NK cells, pSTAT5 is formed, thereby increasing cytotoxicity of NK cells [33]. In chronic infections (HIV, hepatitis C virus) in NK cells, IL-7-induced phosphorylation of STAT5 is disrupted, which is associated with reduced cytotoxic function of NK cells [33].

The cytokine IL-2 can also cause activation of NK cells by phosphorylation of ERK1/2 [63]. In cell lines, it was shown that phosphorylation of ERK2 in NK cells leads to polarization of microtubules and cytolytic granules [10]. Cytokine IL-2 causes activation of surface receptors 2B4 and NKG2D, which in addition to activating ERK triggers the phosphorylation of kinase VAV-1 [77]. As a result, the induction of cytotoxicity is resistant to inhibitory signals [77]. At the same time, under the influence of IL-2 on NK cells and the induction of cytotoxic activity, no involvement of

another MAPK-pathway, p38, was shown [90]. There was also no evidence of p38 involvement in the induction of NK cell cytotoxicity and in the absence of IL-2 [38]. In addition to VAV-1, the JNK kinase is also required for the realization of the cytotoxic function of NK cells. Violation of the phosphorylation of JNK leads to a violation of the polarization of microtubules and to the violation of immunological synapse formation [38]. In the *in vitro* model, the encephalitis virus (Japanese encephalitis virus) stimulates the shedding of sHLA-E from endothelial cells after infection. The cultivation of NK cells in the presence of media containing sHLA-E resulted in a decrease in the proliferation of NK cells and a decrease in the phosphorylation of ERK1/2 [63].

Thus, when activating NK cells by IL-15 and other cytokines whose receptors contain a common γ -chain (IL-2, IL-7) along the JAK-STAT pathway, the proteins (STAT1, STAT4 and STAT5) intensify the activation, whereas the other proteins (STAT3, STAT6, CIS and SOCS1-7) constrain it. In addition to the JAK-STAT pathway, IL-15 and similar cytokines (IL-2, IL-7) can transmit signal to the cell via signaling pathways associated with the final activation of ERK, JNK and Vav-1 kinases.

NK cells intracellular signaling pathways activation by the IL-12 cytokine

Another cytokine that affects the activation of NK cells is IL-12. In experiments on NK cell lines it was shown that IL-12 induces the synthesis of perforin mRNA [87], stimulates tyrosine phosphorylation in STAT4 proteins [85], but to a lesser extent than IL-2 or IFN γ [85]. In healthy donors, IL-12 causes an increase of STAT4 phosphorylated form in the NK cells [31, 85]. It was shown that the activated form of STAT4 binds to the promoter region of the perforin gene, stimulating its transcription [87]. In healthy donors, IL-12 causes an increase in CD107a expression by NK cells and an increase in the production of IFN γ [31]. After activation of NK cells by IL-12 in patients after liver transplantation, a decrease of phosphorylation of STAT4, which correlates with reduced cytotoxic NK cell function in these patients, is observed [31]. Thus, it can be concluded that STAT4 is involved in the regulation of IL-12-induced cytotoxicity of NK cells [27]. After stimulation of NK cells with IL-12, participation of STAT4 in the induction of expression of T-bet and IL-10 was demonstrated [27]. Currently, for NK cells, by analogy with T lymphocytes, the possibility of antigen-independent and antigen-dependent differentiation and the formation of memory-like NK cells or preactivated NK cells, is discussed [23]. Antigen-dependent differentiation means the formation of a pool of memory-like NK cells as a result of a virus (shown for cytomegalovirus) [35] or as a result of hapten exposure (in mouse experiments) [23]. The antigen-independ-

ent differentiation of memory-like NK cells, implies formation of a pool of these cells under the influence of cytokines (IL-12, IL-15 and IL-18) [23, 35]. In a murine model, it was demonstrated that NK cells defective in the gene *IL-12R* fail to form memory-like NK cells after MCMV infection [71]. For NK cells deficient for the gene *IL-12R*, a reduced expression of pSTAT4 is observed [71]. These results demonstrate the necessity of IL-12 stimulation and participation of JAK-STAT cascade in formation of memory-like NK cells, in a murine model [71]. Thus, IL-12 exerts an activating effect on NK cells predominantly with the participation of the JAK-STAT signaling pathway.

NK cells intracellular signaling pathways activation by the TGF- β cytokine

Unlike the cytokines described above, which activate NK cells, TGF- β is a cytokine with immunosuppressive properties. The antagonistic relationship between IL-15 and TGF- β is supported, for example, by the fact that TGF- β inhibits the mTOR kinase activity, the activation of which is induced by IL-15 [82]. It was shown that stimulation of NK cells through CD16 causes an increase in the production of IFN γ by NK cells. After incubation of the NK cells of the NK-92 line in the presence of TGF- β , the production of IFN γ as well as TNF α by the NK cells was reduced [76]. NK cells of the peripheral blood, as well as linear NK cells were used to show that incubation with TGF- β does not lead to an increase in phosphorylated form and STAT4 or ERK activation, but induces the SMAD3 protein phosphorylation [76]. Using the NK-92 cell line it was shown that under the action of TGF- β , NK cells phosphorylation of SMAD2 occurs [88]. Later it was found that NK cells have reduced cytotoxic activity in acute lymphoblastic B cell leukaemia, and inhibition of NK cell function is caused by TGF- β , initiating the signaling pathway of SMAD2/3 proteins [57]. In mice, it was shown that NK cells recovered from a solid tumour and probably exposed to TGF- β from the tumour cells, contained an increased amount of phosphorylated forms of SMAD2/3 [82]. SMAD3 phosphorylation caused decreased production of IFN γ by NK cells and significant inhibition of expression of a gene encoding the transcription factor T-bet [76]. Prolonged incubation of NK cells in the presence of TGF- β resulted in a decrease in their ability to realize antibody-dependent cellular cytotoxicity [76]. This effect was associated with a decreased production of granzyme A and granzyme B due to activation of SMAD3 [76]. Song et al. demonstrated that NK cells after exposure to TGF- β reduced expression of NKG2D receptor [67]. Both NK-92MI cell culture and primary NK cells showed that their incubation in the presence of IL-2 and IL-18 resulted in an increase in NKG2D receptor expression, which was reduced as a result of the previous exposure to TGF- β [67]. Recovery of the NKG2D cy-

cytotoxic receptor expression by NK cells is associated with the activation of IL-2 and IL-18 signaling pathway related to kinase JNK, but not kinase ERK [67]. In another study, it was also shown that TGF- β causes a decrease in NKG2D expression. Blocking kinases MAPK, ERK and p38 does not lead to restoration of expression of the NKG2D receptor [37]. The results described confirm the specificity of SMAD3 participation in the transmission of an inhibitory signal from TGF- β . Protein SMAD4 regulates signal transduction from TGF- β in NK cell, contributing to the conservation of NK cell expression of TRAIL and inhibiting cell functions via the receptor TGF- β R1 [12]. In a study using mice as model animals, it was found that NK cells defective in the SMAD4 protein exhibit reduced production of IFN γ after stimulation with IL-12 and IL-18 cytokines, as well as reduced cytotoxicity towards target cells [12]. NK cells defective in the SMAD4 protein are also characterized by a reduced expression of the activation receptors CD226 (DNAM-1) and increased expression of the inhibitory receptors TIGIT (WUCAM) [12], high expression of which is characteristic for all ILC1 [12]. Thus, TGF- β suppresses the function of NK cells by inhibiting mTOR and activating SMAD2/3. The absence of inhibition or restoration of the function of NK cells is possible, both through the activation of SMAD-cascade proteins, for example, SMAD4, and through the possible activation of alternative signaling pathways.

Thus, cytokines IL-2, IL-7, IL-15, IL-12 contribute to the differentiation and activation of NK cells using intracellular signaling pathways involving the activation of STAT1, STAT4 and STAT5 and activation of ERK, JNK and Vav-1. Cytokine TGF- β has an immunosuppressive effect on the cytotoxic function of NK cells due to the cascade of intracellular reactions associated with the activation of SMAD 2/3 proteins. In the described cascades, there are proteins which activity blocks the signal from the cytokine (STAT3, SMAD4, etc.) The antagonistic effects of cytokines (IL-15 and TGF- β) on NK cells, as well as the significantly branched cascades of intracellular signaling reactions, determine the complexity of studying NK signaling pathways.

NK cells of the uterus and trophoblast cells: A particular case of the mutual influence of NK cells and microenvironment cells

A special case of tissue-resident NK cells are NK cells of the endometrium and decidua. NK cells significantly change their representation in the uterus, depending on the phase of the menstrual cycle and the onset of pregnancy [44]. Discussion persists on the question of the formation of uterine NK cells. In the decidua, the presence of CD34⁺ cells were found in humans, which differ from CD34⁺ peripheral blood and cord blood cells in the spectrum of the mRNA transcription factors. The CD34⁺ cells of the decid-

ual membrane are characterized by the presence of mRNA transcription factors Nfil3 and Id2, which indicates the possibility of differentiation of NK cells in situ [78]. The possibility of uterine NK cells to differentiate from peripheral blood NK cells and proliferate in situ, is also discussed [9, 44].

Stromal cells and trophoblast cells are the cells of the microenvironment that are able to regulate the formation of the pool of decidual NK cells [44]. According to the literature, decidual stromal cells and trophoblast cells secrete IL-15 [62]. In experiments using mice, IL-15 is shown to be a necessary cytokine for differentiation of uterine NK cells [3]. The IFN-regulatory factor-1 (IRF-1) transcription factor binds to the promoter region of the gene encoding IL-15 [48]. IRF-2 is considered as a functional antagonist of IRF-1 [39]. In experiments with model animals, it is shown that the differentiation of decidual NK cells was disrupted in IRF-1 $-/-$ mice [3]. At the same time, according to other data, the knockout of the gene *IRF-2* had no significant effect on the formation of a pool of decidual NK cells [3, 54]. These results indicate the involvement of IRF-1 in the formation of a pool of decidual NK cells in response to IL-15. In the presence of IL-15, the NK-92 line cells express T-bet and Eomes, and the expression of these transcription factors persists as the IL-15 exposure time increases [49]. Tayade et al. show that at the beginning of pregnancy in murine uterine NK cells, expression of *T-bet* and *Eomes* increased [74]. At the same time, the expression of *Eomes* was significantly superior to the expression of *T-bet* [74]. *T-bet* defective mice did not show disorders of implantation and remodelling of spiral arteries [74]. These results indicate the predominant role of Eomes transcription factor in differentiation of uterine NK cells [74]. At the same time, expression of *T-bet* and *Eomes* increased as the duration of gestation increased, but to a certain level, and then decreased [74]. Park et al. show that the conditioned media of trophoblast cells inhibited the expression of T-bet and Eomes in NK cells previously cultured in the presence of IL-15 [49]. In NK cells, there was also a decrease in the mRNA of perforin and granzyme B when cultivated in the presence of conditioned media of trophoblast cells [49]. A similar effect was shown by Fu et al. on the example of the primary culture of trophoblast cells when cultivated together with decidual NK cells. Trophoblast cells caused reduction of expression of the transcription factor T-bet and Helios in NK cells, which can determine a decrease in IFN γ production and the acquisition of NK cells of the regulatory phenotype [22]. It is likely that at the trophoblast invasion and progressing pregnancy, its inhibitory effect on transcription factors expression of NK cells, associated with terminal stages of differentiation and the acquisition of cytotoxic activity, is enhanced.

In mice, uterine NK cells are shown to be a heterogeneous population consisting of CD49a⁻ cNK cells and CD49a⁺ NK cells expressing Eomes, as well as CD49a⁺ Eomes⁻ cells, which are classified as ILC1 [6, 47]. The number of Eomes⁺CD49a⁺ NK cells in the uterus decreases during pregnancy, while the number of cNK cells increases [47]. Mice during pregnancy also revealed the presence in the uterus of ILC2 population, expressing GATA-3, and ILC3 population, expressing ROR γ t, but in much smaller quantities than cNK cells [6]. As in mice, in the human decidua ILC3, expressing ROR γ t, were detected [19]. At the same time, the number of ILC2, expressing GATA-3, was extremely small [19]. In the analysis of human decidua NK cells, more than 85% of NK cells show the phenotype CD49a⁺ [21]. It has been determined that CD49a⁺ NK cells of the decidua containing the transcription factor Eomes express a number of genes (*PTN* (pleiotropine), *OGN* (osteoglycine), *SPP1* (osteopontin), etc.), which products regulate fetal development [21]. The production of HLA-G is characteristic of trophoblast cells. It was shown that the expression of the fetal growth regulating genes in the decidua NK cells was stimulated by extravillous trophoblast cells through the interaction of the NK cell ILT2 receptors and the trophoblast HLA-G [21]. In mice it was shown that defect of *Nfil3*, but not *T-bet*, led to a disruption of the expression of genes *PTN*, *OGN*, *SPP1*, which in turn led to weight loss and impaired fetal skeleton [21]. In mice, it was shown that defect of *Nfil3* led to a reduction in the amount of cNK cells in the uterus, disruption of spiral arteries remodelling [6] and practically total absence of ILC2, but it did not affect the number of ILC1 and ILC3 [19]. According to other data, the knockout of the gene of the transcription factor *Nfil3* did not significantly influence the formation of the total pool of decidua NK cells, but led to a disruption in the formation of the placenta [54]. Thus, in connection with the heterogeneity of NK cells population of the decidua membrane, both by surface receptors and transcription factors, their independent differentiation is possible. The transcription factors Eomes, *Nfil3*, *Id2*, ROR γ t and GATA-3 take part in the regulation of differentiation and function of individual populations of decidua NK cells [6, 21].

Cytokine IL-15 activates the proliferation of NK cells and triggers the MAPK signaling pathway, which involves the activation of mitogen-associated protein kinases – ERK and JNK [49]. However, it has been shown that the NK-92 line cells, previously cultured in the presence of IL-15, after exposing the conditioned media of the Sw.71 line trophoblast cells, contained a reduced amount of phosphorylated ERK and JNK compared to the control amount [49]. Also, inhibition of phosphorylation of STAT5 and a decrease

in production of perforin, granzyme B and IFN γ by NK cells of the NK-92 line after cultivation in conditioned media of trophoblast cells was shown [49]. When adding collagen synthesized by the primary cell coculture, including trophoblast and decidua stromal cells, to decidua NK cells *in vitro*, a decrease in the number of pSTAT1 and pSTAT4 was observed, which may reflect inhibition of a signaling pathway JAK-STAT [22]. Violation of the blocking of this signaling pathway in decidua NK cells can lead to an increased production of IFN γ by NK cells, which in turn can lead to miscarriage.

The expression and secretion of TGF- β is shown for trophoblast cells [43, 58]. In mice with knockout of the gene *ALK5* encoding one of the receptors for TGF- β , the number of uterine NK cells is significantly reduced [50]. *ALK5* participates in the transmission of signal from the TGF- β receptor to the SMAD2/3 proteins. Mice with a gene *ALK5* knockout in the uterine NK cells, expressed less genes encoding granzymes (A, B, D, E, F, G), as well as receptor genes to other cytokines [50]. It should be pointed out, that in experiments with mice, one cannot deny the knockout of the same gene in other cells of the microenvironment, which can also make changes to the differentiation process of NK cells of the uterus. For the trophoblast cells, the expression of HLA-E is observed [34]. Using an *in vitro* model with the encephalitis virus engaged to stimulate the shedding of sHLA-E from endothelial cells, it was shown that culturing NK cells in the presence of media containing sHLA-E resulted in a decrease in NK cell proliferation and a decrease in ERK1/2 phosphorylation [63]. In connection with this, the reduction of proliferation of NK cells and the decrease of the activation of NK cells in the decidua along the ERK-dependent pathway due to sHLA-E trophoblast becomes possible. Accordingly, trophoblast cells not only regulate the expression by NK cells of transcription factors of the terminal stages of differentiation, but also inhibit the cytotoxic function of NK cells by suppressing the signaling involving STAT proteins and ERK kinase.

Conclusion

Thus, lymphoid cells of innate immunity (ILC) are now distinguished, which in turn are divided into groups (group 1 ILC, group 2 ILC, group 3 ILC) based on the expression of certain receptors, transcription factors and various functional properties. According to the ILC classification, NK cells are classified as the first group of innate lymphoid cells according to their overall functional characteristics, as well as the participation of the T-bet transcription factor in their differentiation. The complexity and multistage nature of CLP differentiation in mNK are associated with consecutive expression in cells of transcription

factors. Partial regulation by transcription factors of receptor expression to cytokines determines the degree of effect of the cytokine microenvironment on the differentiation of NK cells. Among the cytokines of the microenvironment, IL-2, IL-7, IL-15, IL-12, IL-15 and TGF- β are distinguished, which promote terminal differentiation and regulate the activation of NK cells. The effect of these cytokines has a pleiotropic effect on NK cells and involves the activation of the proteins of the intracellular signaling pathways STAT1, STAT4, STAT5, ERK, JNK, Vav-1, SMAD2, SMAD3 and SMAD4. Depending on the location, the cells of the microenvironment and the spectrum of cytokines secreted by them may differ, which introduces peculiarities in the differentiation of NK cells.

For example, it has been found that the population of NK cells of the decidua is heterogeneous in surface receptors and in transcription factors expressed, among which Eomes, Nfil3, Id2, ROR γ t and GATA-3 are distinguished. Cells of the microenvironment for NK cells in the uterus during pregnancy are stromal decidual cells and trophoblast cells, which to some extent can regulate the heterogeneity of the decidual NK cells. Due to the expression of cytokines and the suppression of signaling involving STAT and ERK proteins, trophoblast cells inhibit the cytotoxic function of NK cells and promote the formation of a pool of regulatory NK cells. The currently known variety of NK cells, depending on the microenvironment in the process of their differentiation, requires further study.

Список литературы / References

1. Ali A.K., Oh J.S., Vivier E., Busslinger M., Lee S.H. NK Cell-specific Gata3 ablation identifies the maturation program required for bone marrow exit and control of proliferation. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 4, pp. 1753-1767.
2. Aliahmad P., de la Torre B., Kaye J. Shared dependence on the DNA-binding factor TOX for the development of lymphoid tissue-inducer cell and NK cell lineages. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 10, pp. 945-952.
3. Ashkar A.A., Black G.P., Wei Q., He H., Liang L., Head J.R., Croy B.A. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 6, pp. 2937-2944.
4. Bernink J.H., Peters C.P., Munneke M., te Velde A.A., Meijer S.L., Weijer K., Hreggvidsdottir H.S., Heinsbroek S.E., Legrand N., Buskens C.J., Bemelman W.A., Mjosberg J.M., Spits H. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat. Immunol.*, 2013, Vol. 14, no. 3, pp. 221-229.
5. Billot K., Parizot C., Arrouss I., Mazier D., Debre P., Rogner U.C., Rebollo A. Differential aiolos expression in human hematopoietic subpopulations. *Leuk. Res.*, 2010, Vol. 34, no. 3, pp. 289-293.
6. Boulenuar S., Doisne J.M., Sferruzzi-Perri A., Gaynor L.M., Kieckbusch J., Balmas E., Yung H.W., Javadzadeh S., Volmer L., Hawkes D.A., Phillips K., Brady H.J., Fowden A.L., Burton G.J., Moffett A., Colucci F. The residual innate lymphoid cells in NFIL3-deficient mice support suboptimal maternal adaptations to pregnancy. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 43.
7. Budagian V., Bulanova E., Paus R., Bulfone-Paus S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2006, Vol. 17, no. 4, pp. 259-280.
8. Caligiuri M.A., Murray C., Robertson M.J., Wang E., Cochran K., Cameron C., Schow P., Ross M.E., Klumpp T.R., Soiffer R.J., Smith K.A., Ritz J. Selective modulation of human natural killer cells *in vivo* after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J. Clin. Invest.*, 1993, Vol. 91, no. 1, pp. 123-132.
9. Cerdeira A.S., Rajakumar A., Royle C.M., Lo A., Husain Z., Thadhani R.I., Sukhatme V.P., Karumanchi S.A., Kopcow H.D. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 8, pp. 3939-3948.
10. Chen X., Allan D.S., Krzewski K., Ge B., Kopcow H., Strominger J.L. CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 27, pp. 10346-10351.
11. Constantinides M.G., McDonald B.D., Verhoef P.A., Bendelac A. A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature*, 2014, Vol. 508, no. 7496, pp. 397-401.
12. Cortez V.S., Ulland T.K., Cervantes-Barragan L., Bando J.K., Robinette M.L., Wang Q., White A.J., Gilfillan S., Cella M., Colonna M. SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing non-canonical TGF-beta signaling. *Nat. Immunol.*, 2017, Vol. 18, no. 9, pp. 995-1003.
13. Crellin N.K., Trifari S., Kaplan C.D., Satoh-Takayama N., di Santo J.P., Spits H. Regulation of cytokine secretion in human CD127(+) LTi-like innate lymphoid cells by Toll-like receptor 2. *Immunity*, 2010, Vol. 33, no. 5, pp. 752-764.
14. Debierre-Grockiego F. Anti-apoptotic role of STAT5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies. *Apoptosis*, 2004, Vol. 9, no. 6, pp. 717-728.
15. Delconte R.B., Kolesnik T.B., Dagley L.F., Rautela J., Shi W., Putz E.M., Stannard K., Zhang J.G., Teh C., Firth M., Ushiki T., Andoniou C.E., Degli-Esposti M.A., Sharp P.P., Sanvitale C.E., Infusini G., Liao N.P., Linossi E.M., Burns C.J., Carotta S., Gray D.H., Seillet C., Hutchinson D.S., Belz G.T., Webb A.I., Alexander W.S., Li S.S., Bullock A.N., Babon J.J., Smyth M.J., Nicholson S.E., Huntington N.D. CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity. *Nat. Immunol.*, 2016, Vol. 17, no. 7, pp. 816-824.

16. Delconte R.B., Shi W., Sathe P., Ushiki T., Seillet C., Minnich M., Kolesnik T.B., Rankin L.C., Mielke L.A., Zhang J.G., Busslinger M., Smyth M.J., Hutchinson D.S., Nutt S.L., Nicholson S.E., Alexander W.S., Corcoran L.M., Vivier E., Belz G.T., Carotta S., Huntington N.D. The Helix-Loop-Helix protein ID2 governs NK cell fate by tuning their sensitivity to interleukin-15. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 1, pp. 103-115.
17. Deng Y., Kerdiles Y., Chu J., Yuan S., Wang Y., Chen X., Mao H., Zhang L., Zhang J., Hughes T., Deng Y., Zhang Q., Wang F., Zou X., Liu C.G., Freud A.G., Li X., Caligiuri M.A., Vivier E., Yu J. Transcription factor Foxo1 is a negative regulator of natural killer cell maturation and function. *Immunity*, 2015, Vol. 42, no. 3, pp. 457-470.
18. Diefenbach A., Colonna M., Koyasu S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity*, 2014, Vol. 41, no. 3, pp. 354-365.
19. Doisne J.M., Balmas E., Boulenouar S., Gaynor L.M., Kieckbusch J., Gardner L., Hawkes D.A., Barbara C.F., Sharkey A.M., Brady H.J., Brosens J.J., Moffett A., Colucci F. Composition, development, and function of uterine innate lymphoid cells. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 8, pp. 3937-3945.
20. Erick T.K., Brossay L. Phenotype and functions of conventional and non-conventional NK cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2016, Vol. 38, pp. 67-74.
21. Fu B., Zhou Y., Ni X., Tong X., Xu X., Dong Z., Sun R., Tian Z., Wei H. Natural killer cells promote fetal development through the secretion of growth-promoting factors. *Immunity*, 2017, Vol. 47, no. 6, pp. 1100-1113 e6.
22. Fu Q., Sun Y., Tao Y., Piao H., Wang X., Luan X., Du M., Li D. Involvement of the JAK-STAT pathway in collagen regulation of decidual NK cells. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 78, no. 6. doi: 10.1111/aji.12769.
23. Gabrielli S., Ortolani C., del Zotto G., Luchetti F., Canonico B., Buccella F., Artico M., Papa S., Zamai L. The Memories of NK cells: Innate-adaptive immune intrinsic crosstalk. *J. Immunol. Res.*, 2016, Vol. 2016, 1376595. doi: 10.1155/2016/1376595.
24. Gordon S.M., Chaix J., Rupp L.J., Wu J., Madera S., Sun J.C., Lindsten T., Reiner S.L. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 1, pp. 55-67.
25. Gotthardt D., Putz E.M., Grundschober E., Prchal-Murphy M., Straka E., Kudweis P., Heller G., Bago-Horvath Z., Witalisz-Siepracka A., Kumaraswamy A.A., Gunning P.T., Strobl B., Muller M., Moriggl R., Stockmann C., Sexl V. STAT5 is a key regulator in NK cells and acts as a molecular switch from tumor surveillance to tumor promotion. *Cancer Discov.*, 2016, Vol. 6, no. 4, pp. 414-429.
26. Gotthardt D., Putz E.M., Straka E., Kudweis P., Biaggio M., Poli V., Strobl B., Muller M., Sexl V. Loss of STAT3 in murine NK cells enhances NK cell-dependent tumor surveillance. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 15, pp. 2370-2379.
27. Gotthardt D., Sexl V. STATs in NK-Cells: the good, the bad, and the ugly. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 694.
28. Hazenberg M.D., Spits H. Human innate lymphoid cells. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 5, pp. 700-709.
29. Holmes M.L., Huntington N.D., Thong R.P., Brady J., Hayakawa Y., Andoniou C.E., Fleming P., Shi W., Smyth G.K., Degli-Esposti M.A., Belz G.T., Kallies A., Carotta S., Smyth M.J., Nutt S.L. Peripheral natural killer cell maturation depends on the transcription factor Aiolos. *EMBO J.*, 2014, Vol. 33, no. 22, pp. 2721-2734.
30. Hoorweg K., Peters C.P., Cornelissen F., Aparicio-Domingo P., Papazian N., Kazemier G., Mjosberg J.M., Spits H., Cupedo T. Functional differences between human NKp44(-) and NKp44(+) RORC(+) innate lymphoid cells. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, p. 72.
31. Jamil K.M., Hydes T.J., Cheent K.S., Cassidy S.A., Traherne J.A., Jayaraman J., Trowsdale J., Alexander G.J., Little A.M., McFarlane H., Heneghan M.A., Purbhoo M.A., Khakoo S.I. STAT4-associated natural killer cell tolerance following liver transplantation. *Gut*, 2017, Vol. 66, no. 2, pp. 352-361.
32. Jiang K., Zhong B., Gilvary D.L., Corliss B.C., Vivier E., Hong-Geller E., Wei S., Djeu J.Y. Syk regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 7, pp. 3155-3164.
33. Judge C.J., Kostadinova L., Sherman K.E., Butt A.A., Falck-Ytter Y., Funderburg N.T., Landay A.L., Lederman M.M., Sieg S.F., Sandberg J.K., Anthony D.D. CD56^{bright} NK IL-7R α expression negatively associates with HCV level, and IL-7-induced NK function is impaired during HCV and HIV infections. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, Vol. 102, no. 1, pp. 171-184.
34. King A., Allan D.S., Bowen M., Powis S.J., Joseph S., Verma S., Hiby S.E., McMichael A.J., Loke Y.W., Braud V.M. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur. J. Immunol.*, 2000, Vol. 30, no. 6, pp. 1623-1631.
35. Kovalenko E.I., Streltsova M.A. Adaptive features of natural killer cells, lymphocytes of innate immunity. *Russ. J. Bioorganic Chem.*, 2016, Vol. 42, no. 6, pp. 590-605.
36. Kucuk C., Jiang B., Hu X., Zhang W., Chan J.K., Xiao W., Lack N., Alkan C., Williams J.C., Avery K.N., Kavak P., Scuto A., Sen E., Gaulard P., Staudt L., Iqbal J., Zhang W., Cornish A., Gong Q., Yang Q., Sun H., d'Amore F., Leppa S., Liu W., Fu K., de Leval L., McKeithan T., Chan W.C. Activating mutations of STAT5B and STAT3 in lymphomas derived from gammadelta-T or NK cells. *Nat. Commun.*, 2015, Vol. 6, p. 6025.
37. Lee J.C., Lee K.M., Ahn Y.O., Suh B., Heo D.S. A possible mechanism of impaired NK cytotoxicity in cancer patients: down-regulation of DAP10 by TGF-beta1. *Tumori*, 2011, Vol. 97, no. 3, pp. 350-357.
38. Li C., Ge B., Nicotra M., Stern J.N., Kopcow H.D., Chen X., Strominger J.L. JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, Vol. 105, no. 8, pp. 3017-3022.

39. Lohoff M., Duncan G.S., Ferrick D., Mittrucker H.W., Bischof S., Prechtel S., Rollinghoff M., Schmitt E., Pahl A., Mak T.W. Deficiency in the transcription factor interferon regulatory factor (IRF)-2 leads to severely compromised development of natural killer and T helper type 1 cells. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 3, pp. 325-336.
40. Male V., Brady H.J. Transcriptional control of NK cell differentiation and function. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 2014, Vol. 381, pp. 173-187.
41. Male V., Nisoli I., Kostrzewski T., Allan D.S., Carlyle J.R., Lord G.M., Wack A., Brady H.J. The transcription factor E4bp4/Nfil3 controls commitment to the NK lineage and directly regulates Eomes and Id2 expression. *J. Exp. Med.*, 2014, Vol. 211, no. 4, pp. 635-642.
42. Mao Y., van Hoef V., Zhang X., Wennerberg E., Lorent J., Witt K., Masvidal L., Liang S., Murray S., Larsson O., Kiessling R., Lundqvist A. IL-15 activates mTOR and primes stress-activated gene expression leading to prolonged antitumor capacity of NK cells. *Blood*, 2016, Vol. 128, no. 11, pp. 1475-1489.
43. Matsumoto J., Kawana K., Nagamatsu T., Schust D.J., Fujii T., Sato H., Hyodo H., Yasugi T., Kozuma S., Taketani Y. Expression of surface CD1d in the extravillous trophoblast cells of early gestational placenta is down-regulated in a manner dependent on trophoblast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, Vol. 371, no. 2, pp. 236-241.
44. Mikhailova V.A., Belyakova K.L., Selkov S.A., Sokolov D.I. Peculiarities of NK cells differentiation: CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells at pregnancy and in non-pregnant state. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 19-26. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-19-26.
45. Mikhaylova V.A., Selkov S.A., Sokolov D.I. Phenotypic and functional characteristics of NK cells in pregnancy. *Scientific and Practical Journal "Obstetrics and Gynecology"*, 2011, Vol. 5, pp. 4-9.
46. Mishra A., Sullivan L., Caligiuri M.A. Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2014, Vol. 20, no. 8, pp. 2044-2050.
47. Montaldo E., Vacca P., Chiossone L., Croxatto D., Loiaco F., Martini S., Ferrero S., Walzer T., Moretta L., Mingari M.C. Unique eomes(+) NK cell subsets are present in uterus and decidua during early pregnancy. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, p. 646.
48. Ogasawara K., Hida S., Azimi N., Tagaya Y., Sato T., Yokochi-Fukuda T., Waldmann T.A., Taniguchi T., Taki S. Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature*, 1998, Vol. 391, no. 6668, pp. 700-703.
49. Park S.Y., Yun S., Ryu B.J., Han A.R., Lee S.K. Trophoblasts regulate natural killer cells via control of interleukin-15 receptor signaling. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 78, no. 2. doi: 10.1111/aji.12628.
50. Peng J., Monsivais D., You R., Zhong H., Pangas S.A., Matzuk M.M. Uterine activin receptor-like kinase 5 is crucial for blastocyst implantation and placental development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 36, E5098-107. doi: 10.1073/pnas.1514498112.
51. Pinho M.J., Marques C.J., Carvalho F., Punzel M., Sousa M., Barros A. Genetic regulation on *ex vivo* differentiated natural killer cells from human umbilical cord blood CD34⁺ cells. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 2012, Vol. 32, no. 5, pp. 238-249.
52. Ramirez K., Chandler K.J., Spaulding C., Zandi S., Sigvardsson M., Graves B.J., Kee B.L. Gene deregulation and chronic activation in natural killer cells deficient in the transcription factor ETS1. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 6, pp. 921-932.
53. Rautela J., Huntington N.D. IL-15 signaling in NK cell cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.*, 2017, Vol. 44, pp. 1-6.
54. Redhead M.L., Portillo N.A., Felker A.M., Mohammad S., Mara D.L., Croy B.A. The transcription factor NFIL3 is essential for normal placental and embryonic development but not for uterine natural killer (UNK) cell differentiation in mice. *Biol. Reprod.*, 2016, Vol. 94, no. 5, p. 101.
55. Robbins S.H., Tessmer M.S., van Kaer L., Brossay L. Direct effects of T-bet and MHC class I expression, but not STAT1, on peripheral NK cell maturation. *Eur. J. Immunol.*, 2005, Vol. 35, no. 3, pp. 757-765.
56. Robinette M.L., Fuchs A., Cortez V.S., Lee J.S., Wang Y., Durum S.K., Gilfillan S., Colonna M. Immunological Genome C. Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 3, pp. 306-317.
57. Rouce R.H., Shaim H., Sekine T., Weber G., Ballard B., Ku S., Barese C., Murali V., Wu M.F., Liu H., Shpall E.J., Bollard C.M., Rabin K.R., Rezvani K. The TGF-beta/SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2016, Vol. 30, no. 4, pp. 800-811.
58. Schilling B., Yeh J. Transforming growth factor-beta(1), -beta(2), -beta(3) and their type I and II receptors in human term placenta. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 2000, Vol. 50, no. 1, pp. 19-23.
59. Scoville S.D., Freud A.G., Caligiuri M.A. Modeling human natural killer cell development in the era of innate lymphoid cells. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, p. 360.
60. Seillet C., Belz G.T., Huntington N.D. Development, homeostasis, and heterogeneity of NK cells and ILC1. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 2016, Vol. 395, pp. 37-61.
61. Seillet C., Huntington N.D., Gangatirkar P., Axelsson E., Minnich M., Brady H.J., Busslinger M., Smyth M.J., Belz G.T., Carotta S. Differential requirement for Nfil3 during NK cell development. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 6, pp. 2667-2676.
62. Sharma S., Godbole G., Modi D. Decidual control of trophoblast invasion. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 75, no. 3, pp. 341-350.

63. Shwetank, Date O.S., Carbone E., Manjunath R. Inhibition of ERK and proliferation in NK cell lines by soluble HLA-E released from Japanese encephalitis virus infected cells. *Immunol. Lett.*, 2014, Vol. 162, no. 1, Pt A, pp. 94-100.
64. Sim G.C., Wu S., Jin L., Hwu P., Radvanyi L.G. Defective STAT1 activation associated with impaired IFN-gamma production in NK and T lymphocytes from metastatic melanoma patients treated with IL-2. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 24, pp. 36074-36091.
65. Simonetta F., Pradier A., Bosshard C., Masouridi-Levrat S., Chalandon Y., Roosnek E. NK cell functional impairment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with reduced levels of T-bet and eomesodermin. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 10, pp. 4712-4720.
66. Simoni Y., Newell E.W. Dissecting human ILC heterogeneity: more than just three subsets. *Immunology*, 2018, Vol. 153, no. 3, pp. 297-303.
67. Song H., Hur D.Y., Kim K.E., Park H., Kim T., Kim C.W., Bang S., Cho D.H. IL-2/IL-18 prevent the down-modulation of NKG2D by TGF-beta in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Cell Immunol.*, 2006, Vol. 242, no. 1, pp. 39-45.
68. Spits H., Artis D., Colonna M., Diefenbach A., di Santo J.P., Eberl G., Koyasu S., Locksley R.M., McKenzie A.N., Mebius R.E., Powrie F., Vivier E. Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 2, pp. 145-149.
69. Spits H., Bernink J.H., Lanier L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat. Immunol.*, 2016, Vol. 17, no. 7, pp. 758-764.
70. Spits H., Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 30, pp. 647-675.
71. Sun J.C., Madera S., Bezman N.A., Beilke J.N., Kaplan M.H., Lanier L.L. Proinflammatory cytokine signaling required for the generation of natural killer cell memory. *J. Exp. Med.*, 2012, Vol. 209, no. 5, pp. 947-954.
72. Tait Wojno E.D., Artis D. Innate lymphoid cells: balancing immunity, inflammation, and tissue repair in the intestine. *Cell Host Microbe*, 2012, Vol. 12, no. 4, pp. 445-457.
73. Tanriver Y., Diefenbach A. Transcription factors controlling development and function of innate lymphoid cells. *Int. Immunol.*, 2014, Vol. 26, no. 3, pp. 119-128.
74. Tayade C., Fang Y., Black G.P., V A.P., Jr., Erlebacher A., Croy B.A. Differential transcription of Eomes and T-bet during maturation of mouse uterine natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, Vol. 78, no. 6, pp. 1347-1355.
75. Townsend M.J., Weinmann A.S., Matsuda J.L., Salomon R., Farnham P.J., Biron C.A., Gapin L., Glimcher L.H. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity*, 2004, Vol. 20, no. 4, pp. 477-494.
76. Trotta R., Dal Col J., Yu J., Ciarlariello D., Thomas B., Zhang X., Allard J., 2nd, Wei M., Mao H., Byrd J.C., Perrotti D., Caligiuri M.A. TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 6, pp. 3784-3792.
77. Urlaub D., Bhat R., Messmer B., Watzl C. Co-activation of cultured human natural killer cells: enhanced function and decreased inhibition. *J. Toxicol. Environ Health A*, 2016, Vol. 79, no. 22-23, pp. 1078-1084.
78. Vacca P., Vitale C., Montaldo E., Conte R., Cantoni C., Fulcheri E., Darretta V., Moretta L., Mingari M.C. CD34⁺ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, Vol. 108, no. 6, pp. 2402-2407.
79. van de Walle I., Dolens A.C., Durinck K., de Mulder K., van Looocke W., Damle S., Waegemans E., de Medts J., Velghe I., de Smedt M., Vandekerckhove B., Kerre T., Plum J., Leclercq G., Rothenberg E.V., van Vlierberghe P., Speleman F., Taghon T. GATA3 induces human T-cell commitment by restraining Notch activity and repressing NK-cell fate. *Nat. Commun.*, 2016, Vol. 7, 11171. doi: 10.1038/ncomms11171.
80. van Helden M.J., Goossens S., Daussy C., Mathieu A.L., Faure F., Marcais A., Vandamme N., Farla N., Mayol K., Viel S., Degouve S., Debien E., Seuntjens E., Conidi A., Chaix J., Mangeot P., de Bernard S., Buffat L., Haigh J.J., Huylebroeck D., Lambrecht B.N., Berx G., Walzer T. Terminal NK cell maturation is controlled by concerted actions of T-bet and Zeb2 and is essential for melanoma rejection. *J. Exp. Med.*, 2015, Vol. 212, no. 12, pp. 2015-2025.
81. Vargas-Hernandez A., Mace E.M., Zimmerman O., Zerbe C.S., Freeman A.F., Rosenzweig S., Leiding J.W., Torgerson T., Altman M.C., Schussler E., Cunningham-Rundles C., Chinn I.K., Carisey A.F., Hanson I.C., Rider N.L., Holland S.M., Orange J.S., Forbes L.R. Ruxolitinib partially reverses functional NK cell deficiency in patients with STAT1 gain-of-function mutations. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 141, no. 6, pp. 2142-2155.
82. Viel S., Marcais A., Guimaraes F.S., Loftus R., Rabilloud J., Grau M., Degouve S., Djebali S., Sanlaville A., Charrier E., Bienvenu J., Marie J.C., Caux C., Marvel J., Town L., Huntington N.D., Bartholin L., Finlay D., Smyth M.J., Walzer T. TGF-beta inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci. Signal.*, 2016, Vol. 9, no. 415, ra19. doi: 10.1126/scisignal.aad1884.
83. Vong Q.P., Leung W.H., Houston J., Li Y., Rooney B., Holladay M., Oostendorp R.A., Leung W. TOX2 regulates human natural killer cell development by controlling T-BET expression. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 26, pp. 3905-3913.
84. Wagner J.A., Rosario M., Romee R., Berrien-Elliott M.M., Schneider S.E., Leong J.W., Sullivan R.P., Jewell B.A., Becker-Hapak M., Schappe T., Abdel-Latif S., Ireland A.R., Jaishankar D., King J.A., Vij R., Clement D., Goodridge J., Malmberg K.J., Wong H.C., Fehniger T.A. CD56^{bright} NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming. *J. Clin. Invest.*, 2017, Vol. 127, no. 11, pp. 4042-4058.

85. Wang K.S., Ritz J., Frank D.A. IL-2 induces STAT4 activation in primary NK cells and NK cell lines, but not in T cells. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 162, no. 1, pp. 299-304.
86. Wang S., Xia P., Huang G., Zhu P., Liu J., Ye B., Du Y., Fan Z. FoxO1-mediated autophagy is required for NK cell development and innate immunity. *Nat. Commun.*, 2016, Vol. 7, 11023. doi: 10.1038/ncomms11023.
87. Yamamoto K., Shibata F., Miyasaka N., Miura O. The human perforin gene is a direct target of STAT4 activated by IL-12 in NK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, Vol. 297, no. 5, pp. 1245-1252.
88. Yang B., Liu H., Shi W., Wang Z., Sun S., Zhang G., Hu Y., Liu T., Jiao S. Blocking transforming growth factor-beta signaling pathway augments antitumor effect of adoptive NK-92 cell therapy. *Int. Immunopharmacol.*, 2013, Vol. 17, no. 2, pp. 198-204.
89. Yokota Y., Mansouri A., Mori S., Sugawara S., Adachi S., Nishikawa S., Gruss P. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature*, 1999, Vol. 397, no. 6721, pp. 702-706.
90. Yu T.K., Caudell E.G., Smid C., Grimm E.A. IL-2 activation of NK cells: involvement of MKK1/2/ERK but not p38 kinase pathway. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, no. 12, pp. 6244-6251.

Авторы:

Михайлова В.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; кафедра иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

Mikhailova V.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

Белякова К.Л. — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

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

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

Belyakova K.L., Junior Research Associate, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Поступила 30.03.2018
Принята к печати 05.04.2018

Received 30.03.2018
Accepted 05.04.2018

ВОСПАЛЕНИЕ И ИММУНИТЕТ: РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТЕОАРТРИТА

Ширинский В.С., Казыгашева Е.В., Ширинский И.В.

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

Резюме. В обзоре анализируются данные литературы, свидетельствующие об участии воспаления синовиальной ткани, субхондральной кости, гуморального и клеточного иммунного ответа к различным аутоантигенам хряща в инициации и прогрессировании первичного остеоартрита (ОА). В большинстве работ показано, что воспаление в синовиальной ткани у больных ОА менее выражено, чем у больных РА, но выше, чем у здоровых людей. Среди клеток воспалительного инфильтрата синовиальной оболочки больных ОА преобладают макрофаги и Т-лимфоциты. Некоторые авторы обнаружили в синовиальной оболочке больных ОА тучные клетки, причем содержание этих клеток было больше, чем у здоровых людей, и значимо больше, чем у больных РА.

Большинство исследователей выявили в синовиальной ткани больных ОА значительное число цитокинов, связанных с клетками как врожденного, так и приобретенного иммунитета, в ряде исследований источник цитокинов не был идентифицирован. Регистрировались как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины: IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-4, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18. Кроме того, некоторые исследователи выявили IL-5, IL-13, IL-19, IL-21, IL-26, IL-32, а также TGF- β . На участие адаптивного иммунного ответа в патогенезе ОА указывает наличие в синовиальной ткани, жидкости, сыворотке периферической крови больных ОА антител к антигенным детерминантам коллагенов II, IX, XI, агрекану, фрагментам фибронектина.

Результаты исследований убедительно свидетельствуют о роли хронического воспаления, изменений врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе ОА, что оправдывает замену прежнего названия болезни «остеоартроз» на современное «остеоартрит». Это новое понимание патогенеза ОА является принципиальным, поскольку обосновывает современные методы противовоспалительной терапии и поиск новых терапевтических мишеней. Приводятся результаты оценки эффективности и безопасности некоторых методов противовоспалительного лечения ОА. До настоящего времени терапия ОА, направленная на уменьшение воспаления, не была успешной. Так, результаты клинических испытаний применения анти-TNF α и анти-IL-1 β -терапии для лечения ОА не показали клинически значимого эффекта, несмотря на многочисленные работы, свидетельствующие о большом содержании TNF α и IL-1 β в синовиальной ткани, жидкости, субхондральной кости больных ОА и их предполагаемой роли в патогенезе. С другой стороны, клинический эффект был зарегистрирован при использовании ингибитора IL-1 диацереина, что, вероятно, обусловлено плеiotропным действием этого препарата.

Подчеркивается, что повышение эффективности противовоспалительной и иммуномодулирующей терапии может быть достигнуто за счет ее применения в начальной стадии болезни, что определяет необходимость разработки информативных маркеров «раннего» ОА.

Ключевые слова: остеоартрит, воспаление, иммунная система, синовиальная оболочка, противовоспалительные средства

Адрес для переписки:

Ширинский Валерий Степанович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630047, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (923) 107-51-00.
Факс: 8 (383) 228-25-47.
E-mail: valery.shirinsky@gmail.com

Address for correspondence:

Shirinsky Valery S.
Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630047, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevska str., 14.
Phone: 7 (923) 107-51-00.
Fax: 7 (383) 228-25-47.
E-mail: valery.shirinsky@gmail.com

Образец цитирования:

В.С. Ширинский, Е.В. Казыгашева, И.В. Ширинский
«Воспаление и иммунитет: роль в патогенезе
остеоартрита» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21,
№ 1. С. 39-48. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-39-48
© Ширинский В.С. и соавт., 2019

For citation:

V.S. Shirinsky, E.V. Kazygasheva, I.V. Shirinsky "Inflammation
and immunity: a role of pathogenesis of osteoarthritis", Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21,
no. 1, pp. 39-48. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-39-48
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-39-48

INFLAMMATION AND IMMUNITY: A ROLE OF PATHOGENESIS OF OSTEOARTHRITIS

Shirinsky V.S., Kazygasheva E.V., Shirinsky I.V.

Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. In this review we analyze literature data concerning participation of synovial inflammation, subchondral bone, humoral and cellular immune responses towards various cartilage autoantigens in the initiation and progression of primary osteoarthritis (OA). The vast majority of studies showed that the synovial inflammation in OA is less pronounced than in RA but is more pronounced than in healthy people. In OA synovial tissue, macrophages and T-cells predominate in the inflammatory infiltrate. Some authors detected mast cells in the OA synovium in quantities higher than in healthy control and significantly higher than in RA patients.

Most of researchers found many cytokines related to innate and adaptive immune cells in the OA synovial tissue, while in some studies the cells producing those cytokines were not identified. Among the cytokines there were both pro-inflammatory and anti-inflammatory ones: IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-4, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18. In addition, some authors detected IL-5, IL-13, IL-19, IL-21, IL-26, IL-32, and TGF β . A role of adaptive immune response in OA is supported by the presence of autoantibodies against antigen determinants of collagens type II, IX, XI, aggrecan, fibronectin fragments, in the synovial tissue, synovium fluid, and peripheral blood serum.

The research data clearly support a role of chronic inflammation and changes in innate and adaptive immune response in the pathogenesis of OA thus justifying the change of the disease name from “osteoarthrosis” to “osteoarthritis”. This novel understanding of OA pathogenesis is paramount as it provides a rationale for modern anti-inflammatory treatments and discovery of new therapeutic targets. We discuss the results of studies evaluating efficacy and safety of some types of anti-inflammatory treatment of OA. Until now, treatment of OA directed on inflammation control was not successful. Thus, clinical trials of anti-TNF α anti-IL-1 β strategies for the treatment of OA did not show clinically significant improvement in spite of multiple studies demonstrating elevated concentrations of TNF α and IL-1 β in synovial fluid and subchondral bone in OA thus suggesting the role of these cytokines in the OA pathogenesis. On the other side, treatment with IL-1 inhibitor diacerein was found to be effective which can be explained by pleiotropic effects of this drug.

It should be stressed out that in order to increase the efficacy of anti-inflammatory treatments of OA they should be initiated at early disease stages, thus necessitating the use of new informative biomarkers of early OA.

Keywords: *osteoarthritis, inflammation, immune system, synovial membrane, anti-inflammatory drugs*

Введение

Остеоартрит (ОА) — одно из наиболее распространенных ревматических заболеваний, особенно у лиц старшей возрастной группы. По данным Всемирной организации здравоохранения, ОА болеет около 4% населения земного шара, а в 10% случаев он является причиной инвалидизации [3]. ОА занимает второе место после сердечно-сосудистых заболеваний в ряду основных причин нетрудоспособности пожилых. В России, по данным официальной статистики, распространенность ОА за последние годы возросла на 48%, ежегодная первичная заболеваемость — более чем на 20% [3]. Количество зарегистрированных в стране больных ОА уже превысило 2 657 000 человек, и каждый год впервые выявляется более 600 000 случаев заболевания. Однако в реальности больных с различными формами ОА в популяции гораздо больше, чем обращающихся за медицинской помощью в государственные лечебно-профилактические учреждения [3].

Его распространенность увеличивается в связи с постарением населения и высокой частотой

той ожирения в популяции. В последние годы проблема ОА привлекает все большее внимание специалистов разного профиля вследствие выявления сложных и разнообразных механизмов его развития, возрастания частоты встречаемости, высокого уровня инвалидизации больных [4].

Пораженный сустав при ОА рассматривается не как простое сочетание измененных костных суставных поверхностей, хрящевых структур, синовиальной жидкости, суставной капсулы и периапартулярного аппарата, а как единый орган с присущими ему патофизиологическими нарушениями: воспалительными, нейротрофическими, иммунными, метаболическими и функциональными. Поэтому ОА относят сегодня к органным заболеваниям, а с учетом поражения различных суставных групп — к полиорганной патологии [12].

ОА не является уникальной болезнью. Он представляет собой разнородную группу с различными клинико-патогенетическими фенотипами, которые постоянно изменяются, гетерогенно и независимо прогрессируют, что

в конечном итоге приводит к общим клиническим проявлениям [15]. Считается, что остеоартрит — это группа патогенетически близких заболеваний, имеющих различную этиологию, которая вызывает сходные патофизиологические и клинические последствия, характеризующиеся прогрессирующей потерей гиалинового хряща и патологическим ремоделированием субхондральной кости [4].

Кроме того, ОА рассматривают как коморбидное заболевание, наиболее часто сочетающееся с сердечно-сосудистой патологией, ожирением, сахарным диабетом, остеопорозом и др. [6]. Эти сопутствующие заболевания не являются исключительными и характерными только для ОА, однако они могут возникнуть у одного и того же пациента одновременно или последовательно, значительно модулируя течение и прогрессирование ОА.

Долгое время ОА считался болезнью «износа» хряща вследствие нарушения конгруэнтности суставных поверхностей при действии механических факторов, приводящих к разрушению хрящевой ткани [21]. Прогресс в молекулярной биологии в 90-е годы прошлого столетия глубоко изменил эту парадигму. Открытие того, что многие растворимые провоспалительные медиаторы могут увеличивать продукцию матричных металлопротеиназ, коллагеназ хондроцитами, стало первым шагом в формировании «воспалительной» теории развития ОА, участия иммунной системы в патогенезе болезни [11]. Настоящее сообщение посвящено анализу данных литературы о роли воспаления, врожденного и адаптивного иммунитета в инициации и прогрессии первичного ОА.

Синовит у больных ОА: морфологическая характеристика и клеточный состав инфильтрата воспаленной синови

Синовит — воспаление синовиальной оболочки, приводящее к скоплению выпота в выстилаемой ею суставной полости. При ОА синовит характеризуется избыточной пролиферацией различных клеток-резидентов синовиальной ткани (СТ) и клеток-мигрантов, участвующих в образовании многочисленных медиаторов воспаления, которые способствуют не только его персистенции, но и усиливают катаболизм в хряще и субхондральной кости [40, 45]. При синовите появляется постоянная боль, связанная с длительной сенситизацией ноцицепторов в процессе воспаления и малосвязанная с механическими нагрузками на сустав [43]. Эту боль, которой сопутствуют утренняя скованность, припухлость сустава, локальное повышение кожной температуры, можно трактовать как хроническую, которая в сочетании с вегетативными, психологи-

ческими и эмоциональными факторами теряет приспособительное биологическое значение [40].

Houli J. и соавт. были одними из первых исследователей, которые описали особенности воспаления в СТ у пациентов с ОА [23]. В последующем были разработаны различные оценочные системы для объективной оценки степени выраженности синовита [26, 27], которые использовались на протяжении многих лет. В 2002 году Krenn V. и соавт. предложили универсальную систему оценки синовита для всех ревматических заболеваний, включая ОА [28]. Эта система была основана на морфологическом анализе гиперплазии синовиальных выстилающих клеток, маркерах активации клеток-резидентов и инфильтрации провоспалительными клетками [28]. С помощью этой системы стало возможным оценивать синовит от легкого до умеренного (градация 0-9 баллов). В ряде исследований, обобщенных в обзоре de Lange-Brokaar B.J. и соавт., было показано, что у больных ОА выраженность синовита колебалась от легкого до умеренного (средний балл 2) против 1,4 у здоровых и 5,7 у больных ревматоидным артритом (РА) [18]. Некоторые исследователи выявляли в синовии морфологические признаки фиброза и детрита, чаще у пациентов с давним ОА [32]. В целом большинство авторов подчеркивают, что воспаление в синовиальной ткани у больных ОА менее выражено, чем у больных РА, но выше, чем у здоровых людей [18, 37].

В 2012 году в журнале *Osteoarthritis and Cartilage* был опубликован систематизированный обзор, посвященный изучению роли воспаления, иммунных нарушений при ОА [18]. Авторы обзора, используя различные базы данных за период с 1946 по 2011 год, обобщили результаты исследований, представленных в 100 статьях, посвященных анализу фенотипа клеток воспалительного инфильтрата при ОА. Некоторые фрагменты обзора будут рассмотрены ниже.

Среди клеток воспалительного инфильтрата синовии больных ОА преобладают макрофаги и Т-лимфоциты. По данным Pessler F. и соавт., макрофаги составляют примерно 65%, Т-лимфоциты — 22%, В-лимфоциты — 5%, плазматические клетки менее 1% клеток инфильтрата [34]. Макрофаги располагаются в основном в выстилающем слое синовии, субпопуляционная структура макрофагов не изучена. Патогенетическая роль макрофагов заключается в контроле продукции металлопротеиназ хондроцитами, синтезе провоспалительных медиаторов и факторов роста (IL-1, TNF α , металлопротеиназ, IL-10, IL-12, TGF- β) хемокинов, участвующих в реализации воспаления, образовании остеофи- [24, 37].

Т-лимфоциты обнаружены в субповерхностном слое синовиальной оболочки и, в меньшей степени, в глубоком слое, преобладали активированные CD4⁺T-клетки [37]. Выявлены различные субпопуляции Т-клеток, экспрессирующих активационные антигены: CD69, CD25, CD38, CD45RO, CD60, CD83, HLA II класса [39]. Ряд авторов указывает, что соотношение CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов равнялось 5:1, оно было больше, чем у здоровых людей, и меньше, чем у больных РА [38].

Популяция Th-лимфоцитов представлена субпопуляциями Th1, Th2, Th3, Th17, Th9, Th22, соотношение Th1/Th2 было 1,5 в сравнении с РА — 6,1 [43, 54]. Показано наличие в синовиальной ткани больных ОА Treg, регуляторных Tr1 лимфоцитов — продуцентов IL-10 и TGF-β [34].

Содержание В-лимфоцитов, плазматических клеток в синовиальной ткани больных ОА было больше, чем у здоровых людей, и меньше, чем у больных РА. Считается, что В-лимфоциты инфильтрата являются олигоклональными и играют существенную роль в развитии ОА [44].

Некоторые авторы обнаружили в синовии больных ОА тучные клетки, причем содержание этих клеток было больше, чем у здоровых людей, и значимо больше, чем у больных РА [19, 20]. Тучные клетки локализовались преимущественно периваскулярно в субповерхностном слое синовии, многие из них были дегранулированы [19].

Большинство исследователей выявили в синовиальной ткани больных ОА большое число цитокинов, связанных с клетками как врожденного, так и приобретенного иммунитета, в ряде исследований источник цитокинов не был идентифицирован. Регистрировались как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины: IL-1β, TNFα, IFNγ, IL-4, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18 [37, 45, 51]. Кроме того, некоторые исследователи выявили IL-5, IL-13, IL-19, IL-21, IL-26, IL-32, а также TGF-β [18, 51]. В целом большинство авторов приходит к мнению о том, что содержание цитокин-позитивных клеток, продуцентов провоспалительных цитокинов, в образцах синовии больных ОА меньше, чем у больных РА, но выше, чем в синовиальной ткани здоровых людей [37, 45, 51]. Это указывает на то, что синовиальная ткань больных ОА характеризуется вялотекущим воспалением, что отличает его от РА [18, 22].

В результате воспаления в синовиальной ткани провоспалительные медиаторы попадают в синовиальную жидкость и затем в хрящ, содействуя катаболической функции хондроцитов [9] и способствуя их гибели. Помимо провоспалительных медиаторов синовиальной ткани и жидкости, вызывающих нарушение процессов ремоделиро-

вания хрящевой ткани, важная роль в процессах катаболизма принадлежит субхондральной кости [9]. Напомним, что хрящ и субхондральная кость в норме представляют собой единую биокomпозицию, адаптированную к действию механических нагрузок и осуществляющую тесные молекулярно-клеточные взаимодействия, направленные на физиологическое ремоделирование как хрящевой, так и костной ткани. При ОА, в результате воспаления хряща и субхондральной кости, в процессе ремоделирования катаболические механизмы начинают преобладать над анаболическими. Этому способствует наличие между хрящевой и костной тканью особых сигнальных путей [9], обеспечивающих обмен провоспалительными медиаторами и персистенцию воспаления.

Итак, ОА характеризуется морфологическими признаками воспаления в синовиальной ткани, однако о соотношении воспаления с клиническими характеристиками ОА известно мало. Неясно, имеется ли связь персистирующего воспаления с различными клиническими фазами ОА (ранние и поздние проявления болезни), прогрессией рентгенологических изменений, уровнем боли, выраженностью функциональных изменений суставов и др. Предстоит большая работа по изучению патогенетической роли воспаления в развитии различных клинических проявлений ОА, поскольку первые исследования в этом направлении не внесли ожидаемой ясности. Так, в 2011 году опубликована статья, посвященная изучению связи биомаркеров системного воспаления и рентгенологической прогрессией ОА [49]. Авторы работы на большой выборке больных ОА при оценке 17 показателей воспаления в сыворотке периферической крови, включая определение СРБ и ряда провоспалительных цитокинов, не нашли доказательств связи между исследуемыми биомаркерами и наличием рентгенологических проявлений ОА. Авторы объясняют полученные результаты дизайном исследования. Оно было поперечным, и, по их мнению, в продольных исследованиях могут быть получены другие данные. В некоторых исследованиях выявлено, что у больных ОА с клиническими проявлениями синовита в сыворотке ПК регистрируются маркеры системного воспаления, в частности СРБ, ассоциированный с уровнем боли [42, 47].

Нами было показано, что в сыворотке ПК больных особым субтипом ОА — диабетассоциированный ОА — повышен уровень провоспалительных (IL-1, IL-18) и снижено содержание противовоспалительных цитокинов (адипонектина, IL-10), а уровень IL-6 прямо коррелировал с рядом функциональных показателей тяжести болезни [7].

Врожденный и адаптивный иммунитет в патогенезе ОА

Считается, что врожденный и адаптивный иммунитет участвуют в патогенезе ОА, но особый интерес представляет роль врожденной иммунной системы в развитии раннего ОА [22, 24, 45]. Необходимо напомнить, что различные факторы риска ОА формируют определенные фенотипы ОА, которые отличаются патогенезом и клиническими проявлениями [4]. Факторы риска условно подразделяются на немодифицируемые (генетические факторы, пол, возраст) и модифицируемые (избыточная масса тела, курение, интенсивные физические нагрузки или хроническая микротравматизация суставов, сопутствующие заболевания и ряд других [4, 6]. Наиболее распространенными субтипами ОА являются возраст-ассоциированный, эстрогензависимый, генетически детерминированный и посттравматический [12]. Факторы риска, действующие комплексно, инициируют изменения физиологического соотношения анаболических и катаболических процессов в хряще, субхондральной кости (СК), про- и противовоспалительных адипокинов суставными жировыми подушечками [2, 11, 22, 24, 25].

На ранних стадиях ОА зарегистрировано повышение метаболизма СК, выражающееся в появлении новых локусов остеогенеза. Результатом этого является истончение СК [5, 9], которое сопровождается повреждением матрикса хряща и снижением скорости синтеза гликозаминогликанов. Так, обнаружена высокая активность маркеров резорбции кости (С-терминальные и N-терминальные телопептиды) у молодых пациентов и пациентов среднего возраста (27–56 лет) с начальной стадией ОА, но без признаков прогрессирования болезни [5]. Таким образом, на ранних этапах ОА определяются основные признаки усиленного ремоделирования СК, скорее всего, появляющиеся до начала деградации хряща [5, 9, 24].

Клетки субхондральной кости начинают продуцировать различные биологические агенты, включая провоспалительные цитокины, а жировые подушечки — адипокины (лептин, резистин, адипонектин, висфатин, хемерин и др.) [9, 11, 22, 24]. Эти первичные молекулярные механизмы усиливают катаболические процессы, способствуют повреждению хондроцитов и клеток субхондральной кости, вовлекают в процесс формирования воспаления семейство белков ADAMTS, матриксные металлопротеиназы (ММП), синтазу окиси азота. Появляются продукты разрушения матрикса хряща: коллагены II, IX, XI, агрекан, фрагменты фибронектина и др. [25, 53]. Последние стимулируют

экспрессию различных TLR (Toll-like receptor) на хондроцитах, клетках-мигрантах: макрофагах, нейтрофилах [45, 47].

Взаимодействие появившихся продуктов деградации матрикса хряща с TLR хондроцитов [41], фагоцитирующих клеток приводит к дополнительному стимулированию образования медиаторов воспаления (ММП-1, ММП-3, ММП-9, ММП-13, IL-6, IL-8, моноцитарный хемотактический белок 1, IL-1 β , TNF α) [24]. Воспаление приобретает персистирующий характер [22] и делает TLR хондроцитов высокочувствительными к продуктам разрушения матрикса хряща [41].

Помимо этого, в развитие воспаления вовлекаются компоненты системы комплемента. Так, Wang O. и соавт. показали, что активация компонентов системы комплемента была аномально высокой в синовиальной оболочке больных ОА, особенно в ранней стадии [50].

В частности, установлено, что MAC (Membrane attack complex — C5b-9) формировался вокруг мембраны хондроцитов при раннем и позднем ОА [50]. MAC способен не только непосредственно повреждать мембрану клеток хряща, но и стимулировать синтез ММП, ADAMTS, хемокинов, что приводит к увеличению гибели хондроцитов, катаболизму матрикса хряща, его лейкоцитарной инфильтрации. Для оценки роли компонентов комплемента в развитии ОА было использовано несколько экспериментальных моделей на животных. Wang O. и соавт. «нокаутировали» компонент C5 у мышей с ОА и показали, что по сравнению с контрольной группой C5⁺ у мышей C5⁻ не было выявлено существенного снижения синовиита или убыли хряща в течение 8–12 недель наблюдения [50]. «Нокаут» CD59 ингибитора MAC в другой модели ОА у мышей показал, что у «нокаутированных» мышей развился более тяжелый ОА по сравнению с контрольными [50]. В исследовании Busby W.H. и соавт. установлено, что ингибирование C1s сериновой протеазы, вовлеченной в инициирование классического пути активации комплемента, предупреждало развитие экспериментального ОА у собак [13].

В синовиальной оболочке пациентов с ОА были обнаружены НК-клетки с фенотипом CD16⁺CD56⁺ как с гранзимами А и В, так и без них [29]. Причем экспрессия гранзимов А и В коррелировала с цитолитической активностью НК-клеток *in vitro* [29]. В другом исследовании в синовиальной ткани и жидкости у пациентов с ОА обнаружены растворимые гранзимы А и В [48]. Эти данные позволяют считать, что в синовиальной ткани больных ОА НК-клетки могут выполнять цитолитические функции и быть еще одним фактором персистенции воспаления.

Таким образом, эти немногочисленные данные свидетельствуют о том, что у больных ОА на ранней стадии развития болезни существенная роль в инициации воспаления в синовиальной ткани и хряще, субхондральной кости принадлежит клеточным и внеклеточным факторам врожденного иммунитета: TLR фагоцитирующих клеток и хондроцитов, NK-клеткам, компонентам системы комплемента. Далее в процесс поддержания воспаления неизбежно вовлекаются факторы адаптивного иммунитета, благодаря наличию в синовиальной оболочке и жидкости больных ОА клеток, участвующих в гуморальном и клеточном иммунном ответе с одной стороны и появлению большого числа аутоантигенов из разрушающегося хряща с другой. Необходимо напомнить, что у здоровых людей потенциальные аутоантигены хряща, находящегося в асептических условиях, изолированы от клеток иммунной системы. При ОА в результате действия различных факторов риска, усилении катаболических процессов, развитии воспаления многочисленные высвобождающиеся антигенные детерминанты матрикса хряща могут инициировать и поддерживать гуморальный и клеточный иммунный ответ, способствуя хронизации воспаления в хряще и синовиальной ткани [53]. Действительно, в синовиальной ткани, жидкости, сыворотке периферической крови больных ОА, в отличие от здоровых людей, выявлены антитела к антигенным детерминантам коллагенов II, IX, XI, агрекану, фрагментам фибронектина [53]. Эти антигены входят в состав иммунных комплексов, обнаруженных в матриксе хряща больных ОА [53], они обладают артритогенными свойствами и способны индуцировать артрит у экспериментальных животных. Помимо гуморального иммунного ответа, формируется и клеточный иммунный ответ [53] к фрагментам мембраны хондроцитов, ядерным белкам, коллагенам и протеогликанам матрикса. Ситуация осложняется тем, что в условиях хронического воспаления, иммунного ответа к различным аутоантигенам хряща организм использует резервные возможности элиминации аутоантигенов. Поэтому у больных ОА свойства профессиональных антигенпрезентирующих клеток, способных фагоцитировать фрагменты коллагена, протеогликанов и взаимодействовать с Т-лимфоцитами, проникающими в поврежденный хрящ из синовиального экссудата [8, 53], приобретают хондроциты. Хондроциты начинают экспрессировать антигены HLA-II, DP, DQ, DR, а также костимуляторные молекулы CD80, CD86 [8], в результате чего происходит усиление пролиферации Т-лимфоцитов и их провоспалительного потенциала.

Следует особо подчеркнуть, что TNF α и IL-1 β являются доминирующими и наиболее рас-

пространенными цитокинами, вовлеченными в ОА [18, 51]. Они действуют независимо друг от друга и аддитивно усиливают катаболизм хряща [8, 51], включая повышенную резорбцию и ингибирование синтеза протеогликанов в хряще, продукцию ММП и хемокинов, активацию эндотелия и индукцию апоптоза в хондроцитах [18, 51]. Это приводит к увеличению инфильтрации макрофагов и CD4⁺T-клеток, образованию кровеносных сосудов путем увеличения сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и повышению уровня циклооксигеназы-2 [11]. Макрофаги и Т-клетки, в частности фенотип CD4⁺Th1 [10], являются распространенной субпопуляцией клеток, обнаруженной в синовиальной оболочке пациентов с ОА [11]. Их активация инициирует повторяющийся каскад событий, связанных с клеточными и внеклеточными компонентами врожденной и адаптивной иммунной системы. В результате персистирующее воспаление разрушает все большее количество хряща, ухудшает функцию суставов и усиливает прогрессию болезни.

Итак, анализ данных литературы, посвященных результатам исследования роли хронического воспаления, врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе ОА, убедительно свидетельствует о том, что изменение прежнего названия болезни «остеоартроз» на современное «остеоартрит» оправданно [11]. Это новое понимание патогенеза ОА является, на первый взгляд, принципиальным, поскольку не только оправдывает современную терапию нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВС), локальное применение глюкокортикостероидов, но и позволяет надеяться на эффективное применение антицитокиновых агентов в лечении ОА и открытие новых терапевтических мишеней. В реальной клинической практике и в исследовательской работе все оказалось намного сложнее. В частности, эффективность и безопасность применения различных НПВС индивидуальна, терапия приносит лишь временное облегчение, что вынуждает больных принимать препараты этой группы практически пожизненно, а иногда отказываться от лечения вследствие развития нежелательных явлений или неэффективности.

Локальная терапия глюкокортикоидами имеет известные ограничения. В 2016 году были опубликованы результаты сетевого мета-анализа [17] рандомизированных, плацебо-контролируемых исследований эффективности использования различных НПВС в лечении ОА. Авторы показали, что лишь три препарата — диклофенак, целекоксиб, напроксен — статистически значимо уменьшают боль и улучшают функцию коленных суставов у больных гонартрозом в сравнении с плацебо и парацетамолом. Эффект дозави-

симый и более выражен при приеме диклофенака 150 мг/сутки. Эффективность монотерапии парацетамолом не превышала эффективность плацебо. Эти примеры свидетельствуют о том, что выбор эффективного и безопасного НПВС у пожилого, как правило, больного ОА невелик. Поскольку ранние этапы развития ОА протекают с вовлечением СК, были предприняты попытки использовать в лечении антирезорбтивные, противоостеопоретические препараты. Результаты клинических исследований эффективности применения бифосфонатов как антирезорбтивных агентов показали отсутствие влияния на изменение СК и профилактику прогрессирования ОА у больных [1, 52]. Весьма противоречивые результаты получены при назначении других противоостеопоретических средств: эстрогенов и модуляторов рецепторов к эстрогенам [5, 16].

Данные о применении еще одного противоостеопоретического препарата — стронция ранелата (СР) — в лечении ОА дает повод для оптимизма. Результаты 3-летнего рандомизированного контролируемого исследования 1371 пациента с ОА (SEKOIA — Strontium ranelate Efficacy in Knee Osteoarthritis trial — СР) показали, что СР оказывает клинически значимый структурно-модифицирующий эффект, замедляет прогрессирование ОА [35]. Прием СР 2 г/сутки также сопровождался более низкими значениями индекса WOMAC и глобальной оценки боли в коленном суставе к 3-му году лечения в сравнении с группой плацебо. Важно отметить, что обоснованием этого исследования послужили результаты фундаментальных работ о влиянии СР на процессы ремоделирования и воспаления в СК, хряще при ОА в условиях *in vitro* и *in vivo* [5]. Появление в ряду средств лечения ОА первого препарата с доказанным структурно-модифицирующим действием и одновременно влияющего на основные клинические проявления ОА, замедляющего прогрессирование заболевания, обнадеживает и специалистов, и больных.

Что касается потенциальных терапевтических мишеней из числа клеток и медиаторов воспаления, то первые исследования оказались разочаровывающими. Так результаты клинических испытаний применения анти-TNF α и анти-IL-1 β -терапии для лечения ОА не показали клинически значимого эффекта [14, 31]. И это несмотря на многочисленные работы, свидетельствующие о большом содержании TNF α и IL-1 β в синовиальной ткани, жидкости, субхондральной кости больных ОА и их предполагаемой роли в патогенезе [11, 18, 51]. Следует отметить, что прошедшие клинические испытания, возможно, потерпели неудачу вследствие вмешательства на далеко зашедших стадиях заболевания.

Ингибирующим влиянием на выработку и активность IL-1 обладает препарат диацереин (артродарин, ТРБ Кемедика Интернешнл С.А., Швейцария), основные фармакодинамические свойства которого и результаты клинических испытаний представлены в обзоре Балабановой Р.М. [2]. При пероральном приеме диацереин быстро абсорбируется с последующим деацетилированием и превращением в активный метаболит-реин. Патогенетическое действие диацереина и его активного метаболита реина при ОА заключается в ингибировании синтеза IL-1, подавлении экспрессии рецепторов к нему на мембране хондроцитов. Помимо этого, препарат опосредованно повышает концентрацию антагониста рецептора IL-1. Метаболит блокирует активацию и транслокацию NF- κ B в ядро, снижая экспрессию ряда NF- κ B-зависимых генов провоспалительных медиаторов: TNF α , IL-1, IL-6, оксида азота и ММП. Реин ингибирует и «восходящий» путь сигнального киназа — MEK/ERK. Анаболическое действие препарата на хрящ обусловлено повышением экспрессии тканевых факторов роста (TGF): TGF- β 1 и TGF- β 2, усиливающих продукцию хондроцитами протеогликанов и коллагенов, что способствует восстановлению матрикса хряща.

Метаанализ рандомизированных клинических испытаний эффективности и безопасности диацереина у 2637 больных гонартрозом и коксартрозом, в 9 из которых контролем служило плацебо, в 12 — НПВП, провели Leeb B.F. и Rintelen B. [30, 36]. К концу лечения снижение выраженности боли было более значимым, чем при терапии НПВП.

Важно отметить, число побочных явлений при приеме диацереина было сходным с таковым при использовании НПВП, причем в последнем случае побочные явления были более тяжелыми.

Структурно-модифицирующий эффект диацереина изучали в 3-летнем рандомизированном, плацебоконтролируемом исследовании у 507 больных первичным коксартрозом [33]. Достоверно реже выявляли рентгенологическое прогрессирование у больных, получавших диацереин, по сравнению с группой плацебо (47,3 и 62,3% соответственно, $p = 0,007$). Необходимость эндопротезирования тазобедренных суставов в процессе лечения и через 3 месяца после его завершения возникла у 14,5% больных основной группы и 19,8% группы плацебо [33]. Важно отметить, что симптом-модифицирующий и структурно-модифицирующий эффекты диацереина у больных ОА обусловлены, вероятно, его плеiotропным действием, а не только его ингибирующим влиянием на продукцию IL-1.

Накапливаются данные о том, что при раннем посттравматическом экспериментальном ОА

наиболее эффективны методы лечения, направленные на модуляцию врожденного иммунитета. Так, показано, что блокада ряда компонентов каскада комплемента значительно снижает частоту ОА у мышей [50]. Эта новая стратегия лечения раннего ОА вселяет оптимизм и должна быть дополнительно исследована. Эффективность противовоспалительных методов лечения, назначаемых вскоре после травмы при ОА, подчеркивает важность максимально раннего вмешательства в патогенез болезни [24]. Это положение, которое поддерживается многими специалистами, занимающимися проблемой ОА, касается не только посттравматического, но и других субтипов болезни [4, 5, 6, 24]. В этом случае мы сталкиваемся с другими трудностями – поиском информативных маркеров начальной, дорентгенологической стадии ОА и новых терапевтических мишеней. Обсуждение этих актуальных вопросов выходит за рамки настоящего обзора.

Заключение

Последние достижения в изучении патогенетической роли воспаления, иммунного ответа к аутоантигенам хрящевой ткани у больных ОА обосновали пока еще немногочисленные попыт-

ки модуляции воспаления. С скромными результатами клинических испытаний таких вмешательств позволяют, однако, надеяться на решение загадки самого распространенного и обременительного заболевания суставов. Согласно известным положениям общей патологии, воспаление и иммунный ответ формируются после действия повреждающих агентов, определяемых как факторы риска. Чем глубже мы будем понимать природу факторов риска у больных ОА и механизмы их иницирующего, повреждающего действия на структуры сустава, патогенез неизбежного воспаления, тем больше появляется шансов эффективно помочь пациентам на ранней стадии болезни. Важность идентификации ранней стадии до появления рентгенологических изменений в суставах у пациентов с высоким риском приобретает сегодня первостепенное значение. Проблема поиска информативных маркеров раннего ОА тесно связана с проблемой выявления новых терапевтических мишеней в начале болезни, в том числе среди большого числа клеток и медиаторов воспаления и иммунного ответа. Путь поиска – долгий и затратный, и надо быть готовым к тому, что на этом пути нас будут ждать не только радости, но и разочарования.

Список литературы / References

1. Алексеева Л.И., Зайцева Е.М. Перспективные направления терапии остеоартроза // Научно-практическая ревматология, 2014. Т. 52, № 3. С. 247-250. [Alekseeva L.I., Zaitseva E.M. Perspective direction of osteoarthritis therapy. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2014, Vol. 52, no. 3, pp. 247-250. (In Russ.)]
2. Балабанова Р.М. Роль иммунного воспаления в патогенезе остеоартроза, возможности коррекции иммунных нарушений // Современная ревматология, 2011. Т. 5, № 4. С. 74-78. [Balabanova R.M. Role of immune inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis and possibilities of correction of immune impairments. *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology Journal*, 2011, Vol. 5, no. 4, pp. 74-78. (In Russ.)]
3. Галушко Е.А. Медико-социальная значимость ревматических заболеваний: дис. ... докт. мед. наук. М.: ФГБУ «НИИР» РАМН, 2011. [Galushko E.A. Medico-social importance of rheumatic diseases: Dr. Diss. (Med. Sci.). Moscow: Scientific and Research Institute of Rheumatology, RAMS, 2011.]
4. Головач И.Ю. Остеоартрит: фундаментальные и прикладные аспекты этиопатогенеза заболевания – ничего не стоит на месте // Украинский ревматологический журнал, 2014. № 56. С. 4-10. [Golovach I.Yu., Osteoarthritis: fundamental and applied aspects of the etiopathogenesis of the disease – nothing stands still. *Ukrainskiy revmatologicheskii zhurnal = Ukrainian Journal of Rheumatology*, 2014, no. 56, pp. 4-10. (In Russ.)]
5. Дубиков А.И. Остеоартроз: старая болезнь, новые подходы // Современная ревматология, 2013. Т. 7, № 2. С. 82-86. [Dubikov A.I. Osteoarthritis: An old disease, novel approaches. *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology Journal*, 2013, Vol. 7, no. 2, pp. 82-86. (In Russ.)]
6. Казыгашева Е.В., Ширинский В.С., Ширинский И.В. Диабет-ассоциированный остеоартрит – синтропия? // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 317-330. [Kazygasheva E.V., Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Diabetes-associated osteoarthritis: a syntropy? *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 317-330. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-317-330.
7. Ширинский И.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский В.С. Клинико-иммунологическая характеристика диабет-ассоциированного остеоартрита // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 87-92. [Shirinsky I.V., Kalinovskaya N.Yu., Shirinsky V.S. Clinico-immunological characteristics of diabetes – associated osteoarthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 87-92. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-87-92.
8. Alsalamah S., Jahn B., Krause A., Kalden J.R., Burmester G.R. Antigenicity and accessory cell function of human articular chondrocytes. *J. Rheumatol.*, 1991, Vol. 18, no. 3, pp. 414-421.

9. Ashish R.S., Supriya J., Sang-Soo L., Ju-Suk N. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, Vol. 14, no. 10, pp. 19805-19830.
10. Battaglia M., Gregori S., Bacchetta R., Roncarolo M.G. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin. Immunol.*, 2006, Vol. 18, no. 2, pp. 120-127.
11. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthritis!). *Osteoarth. Cartilage*, 2013, Vol. 21, no. 1, pp. 16-21.
12. Bijlsma J.W., Berenbaum F., Lafeber F.P. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*, 2011, no. 377, pp. 2115-2126.
13. Busby W.H., Yocum S.A., Rowland M. Complement 1s is the serine protease that cleaves IGFBP-5 in human osteoarthritic joint fluid. *Osteoarth. Cartilage*, 2009, Vol. 17, no. 4, pp. 547-555.
14. Calich A.L.G., Domiciano D.S., Fuller R. Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment. *Clin. Rheumatol.*, 2010, Vol. 29, no. 5, pp. 451-455.
15. Castaneda S., Roman-Blas J.A., Largo R., Herrero-Beaumont G. Osteoarthritis: a progressive disease with changing phenotypes. *Rheumatology*, 2014, Vol. 53, no. 6, pp. 1-3.
16. Cirillo D.J., Wallace R.B., Wu L., Yood R.A. Effect of hormone therapy on risk of hip and knee joint replacement in the Women's Health Initiative. *Arthritis Rheum.*, 2006, Vol. 54, no. 10, pp. 3194-3204.
17. da Costa B., Reichenbach S., Keller N., Nartey L., Wandel S., Jüni P., Trelle S. Effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of pain in knee and hip osteoarthritis: a network meta-analysis. *Lancet*, 2016, Vol. 387, no. 10033, pp. 2093-2105.
18. de Lange-Brokaar B.J., Ioan-Facsinay A., van Osch G.J., Zuurmond A.M., Schoones J., Toes R.E., Huizinga T.W., Kloppenburg M. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarth. Cartilage*, 2012, Vol. 20, no. 12, pp. 1484-1499.
19. de Lange-Brokaar B.J., Kloppenburg M., Andersen S.N., Dorjée A.L., Yusuf E., Herb-van Toorn L., Kroon H.M., Zuurmond A.M., Stojanovic-Susulic V., Bloem J.L., Nelissen R.G., Toes R.E., Ioan-Facsinay A. Characterization of synovial mast cells in knee osteoarthritis: association with clinical parameters. *Osteoarth. Cartilage*, 2016, Vol. 24, no. 4, pp. 664-671.
20. Dean G., Hoyland J.A., Denton J., Donn R.P., Freemont A.J. Mast cells in the synovium and synovial fluid in osteoarthritis. *Br. J. Rheumatol.*, 1993, Vol. 32, no. 8, pp. 671-675.
21. Felson D.T. Osteoarthritis as a disease of mechanics. *Osteoarth. Cartilage*, 2013, Vol. 21, no. 1, pp. 10-15.
22. Haseeb A., Haqqi T.M. Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 146, no. 3, pp. 185-196.
23. Houli J., Roimicher S., I. Paciornik I., de Paola D. Synovial tissue in osteoarthritis of the knee. *Acta Rheumatol. Scand.*, 1959, no. 5, pp. 122-135.
24. Kandahari A.M., Yang X., Dighe A.S., Pan D., Cui Q. Recognition of immune response for the early diagnosis and treatment of osteoarthritis. *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, 192415, 13 p. doi: 10.1155/2015/192415.
25. Kapoor M., Martel-Pelletier J., Lajeunesse D., Pelletier J.-P., Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2011, Vol. 7, no. 1, pp. 33-42.
26. Koizumi F., Matsuno H., Wakaki K., Ishii Y., Kurashige Y., Nakamura H. Synovitis in rheumatoid arthritis: scoring of characteristic histopathological features. *Pathol. Int.*, 1999, no. 49, pp. 298-304.
27. Kraan M.C., Haringman J.J., Post W.J., Versendaal J., Breedveld F.C., Tak P.P. Immunohistological analysis of synovial tissue for differential diagnosis in early arthritis. *Rheumatology*, 1999, no. 38, pp. 1074-1080.
28. Krenn V., Morawietz L., Burmester G.R., Kinne R.W., Mueller-Ladner U., Muller B., Haupl T. Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology*, 2006, Vol. 49, no. 4, pp. 358-364.
29. Kummer J.A., Tak P.P., Brinkman B.M. Expression of granzymes A and B in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1994, Vol. 73, no. 1, pp. 88-95.
30. Leeb B.F., Rintelen B. Systematic meta-analysis trials with Diacerhein in osteoarthritis. *Osteoarth. Cartilage*, 2005, no. 13, S 68.
31. Malemud C.J. Anticytokine therapy for osteoarthritis: evidence to date. *Drugs and Aging*, 2010, Vol. 27, no. 2, pp. 95-115.
32. Oehler S., Neureiter D. Subtyping of osteoarthritic synoviopathy. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2002, no. 20, pp. 633-640.
33. Pavelka K., Trc T., Karpas K. The efficacy and safety of Diacerhein in the treatment of painful osteoarthritis of the knee: a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled study with primary end points at two months after the end of a three month treatment period. *Arthr. Rheum.*, 2007, no. 56, pp. 4055-4064.
34. Pessler F., Chen L.X., Dai L., Gomez-Vaquero C., Diaz-Torne C. A histomorphometric analysis of synovial biopsies from individuals with Gulf War Veterans Illness and joint pain compared to normal and osteoarthritis synovium. *Clin. Rheumatol.*, 2009, Vol. 27, no. 9, pp. 1127-1134.
35. Reginster J.Y., Badurski J., Bellamy N., Bensen W., Chapurlat R., Chevalier X., Christiansen C., Genant H., Navarro F., Nasonov E., Sambrook P.N., Spector T.D., Cooper C. Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of knee osteoarthritis: results of a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013, Vol. 72, no. 2, pp. 179-186.

36. Rintelen B., Neumann K., Leeb B.F. A meta-analysis of controlled clinical studies with Diacerhein in the treatment osteoarthritis. *Arch. Intern. Med.*, 2006, no. 166, pp. 1899-1906.
37. Robinson W.H., Lepus C.M., Wang Q., Raghu H., Mao M., Lindstrom T.M., Sokolove J. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2016, Vol. 12, no. 10, pp. 580-592.
38. Saito I., Koshino T., Nakashima K., Uesugi M., Saito T. Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. *Osteoarth. Cartilage*, 2002, Vol. 10, no. 2, pp. 156-162.
39. Sakkas L.I., Platsoucas C.D. The role of T cells in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 2007, Vol. 56, no. 2, pp. 409-424.
40. Scanzello C.R., Goldring S.R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*, 2012, Vol. 51, no. 2, pp. 249-257.
41. Schelbergen R.F.P., Blom A.B. Alarmins S100A8 and S100A9 elicit a catabolic effect in human osteoarthritic chondrocytes that is dependent on toll-like receptor 4. *Arthritis Rheum.*, 2012, Vol. 64, no. 5, pp. 1477-1487.
42. Schulze-Koops H., Kalden J.R. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2001, Vol. 15, no. 5, pp. 677-691.
43. Sellam J., Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2010, Vol. 6, no. 11, pp. 625-635.
44. Shiokawa S., Matsumoto N., Nishimura J. Clonal analysis of B cells in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.*, 2003, Vol. 32, no. 1, pp. 12-18.
45. Sokolove J., Lepus Ch.M. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther. Adv. Musculoskel. Dis.*, 2013, Vol. 5, no. 2, pp. 77-94.
46. Stürmer T., Brenner H., Koenig W., Günther K.P. Severity and extent of osteoarthritis and low grade systemic inflammation as assessed by high sensitivity C reactive protein. *Ann. Rheum. Dis.*, 2004, Vol. 63, no. 2, pp. 200-205.
47. Su S.-L., Tsai C.-D., Lee C.-H., Salter D.M., Lee H.-S. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 by IL-1 β and fibronectin fragments in human articular chondrocytes. *Osteoarth. Cartilage*, 2005, Vol. 13, no. 10, pp. 879-886.
48. Tak P.P., Spaeny-Dekking L., Kraan M.C., Breedveld F.C., Froelich C.J., Hack C.E. The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.*, 1999, Vol. 116, no. 2, pp. 366-370.
49. Vlad S.C., Neogi T., Aliabadi P., Fontes J.D., Felson D.T. No association between markers of inflammation and osteoarthritis of the hands and knees. *J. Rheumatol.*, 2011, Vol. 38, no. 8, pp. 1665-1670.
50. Wang O., Rozelle A.L., Lepus C.M. Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 12, pp. 1674-1679.
51. Wojdasiewicz P., Poniatowski L. A., Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm.*, 2014, Vol. 2014, 561459, 19 p. doi: 10.1155/2014/561459.
52. Xing R.L., Zhao L.R., Wang P. M. Bisphosphonates therapy for osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *SpringerPlus*, 2016, Vol. 5, no. 1, p. 1704.
53. Yuan G.-H., Masuko-Hongo K., Kato T., Nishioka K. Immunologic intervention in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 2003, Vol. 48, no. 3, pp. 602-611.
54. Yudoh K., Matsuno H., Nakazawa F., Yonezawa T., Kimura T. Reduced expression of the regulatory CD4⁺ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2000, Vol. 43, no. 3, pp. 617-627.

Авторы:

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

Казыгашева Е.В. — лаборант-исследователь лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Ширинский И.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

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

Kazygasheva E.V., Laboratory Assistant, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shirinsky I.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 26.02.2018

Отправлена на доработку 06.03.2018

Принята к печати 07.03.2018

Received 26.02.2018

Revision received 06.03.2018

Accepted 07.03.2018

РОЛЬ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β 1-ГЛИКОПРОТЕИНА В РЕГУЛЯЦИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-КЛЕТОК ИММУННОЙ ПАМЯТИ

Раев М.Б.^{1,3}, Литвинова Л.С.², Юрова К.А.², Хазиахматова О.Г.²,
Тимганова В.П.¹, Бочкова М.С.¹, Храмцов П.В.^{1,2,3}, Заморина С.А.^{1,3}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук,
г. Пермь, Россия

² ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

³ ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Резюме. Изучали роль трофобластического β 1-гликопротеина (ТБГ) в регуляции молекулярно-генетических факторов, определяющих функциональную активность наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти в системе *in vitro*. ТБГ человека получали авторским запатентованным методом иммуноочистки с использованием биоспецифического сорбента с последующим освобождением от иммуноглобулиновой контаминации на колонке HiTrap™ Proten G HP. В экспериментах использовали физиологические концентрации ТБГ, соответствующие его уровню в периферической крови будущей матери в период беременности: 1, 10 и 100 мкг/мл (I, II, III триместр соответственно). Объектами исследования являлись монокультуры наивных Т-клеток (CD45RA⁺) и Т-клеток иммунной памяти (CD45R0⁺), полученные методом иммуномагнитной сепарации из периферической крови женщин репродуктивного возраста.

Установлено, что на уровне наивных Т-клеток ТБГ угнетал экспрессию CD28 (1, 10, 100 мкг/мл) и CD25 (100 мкг/мл), не влияя на продукцию этими клетками (IL-2). В то же время, на уровне Т-клеток иммунной памяти, ТБГ во всех используемых концентрациях подавлял экспрессию CD25, но повышал продукцию IL-2 этими клетками. Параллельно оценивали экспрессию генов *U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, кодирующего CD45. Установлено, что ТБГ снижал экспрессию генов *Gfi1* (1, 10, 100 мкг/мл), *hnRNPLL* (10, 100 мкг/мл), но повышал экспрессию гена *U2af114* (1, 10, 100 мкг/мл) наивными Т-клетками. Показано, что на уровне Т-клеток иммунной памяти эффекты были аналогичными, причем ТБГ оказывал их во всех используемых концентрациях. Выявленные изменения в транскрипции мРНК генов *U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL* в исследуемых субпопуляциях Т-клеток могут вести к снижению формирования «зрелой» изоформы CD45R0.

Адрес для переписки:

Заморина Светлана Анатольевна
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Address for correspondence:

Zamorina Svetlana A.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Goleva str., 13.
Phone: 7 (342) 280-77-94.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Образец цитирования:

М.Б. Раев, Л.С. Литвинова, К.А. Юрова,
О.Г. Хазиахматова, В.П. Тимганова,
М.С. Бочкова, П.В. Храмцов, С.А. Заморина
«Роль трофобластического β 1-гликопротеина
в регуляции молекулярно-генетических механизмов
дифференцировки Т-клеток иммунной памяти»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1.
С. 49-58. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-49-58
© Раев М.Б. и соавт., 2019

For citation:

M.B. Rayev, L.S. Litvinova, K.A. Yurova,
O.G. Khaziakhmatova, V.P. Timganova, M.S. Bochkova,
P.V. Khramtsov, S.A. Zamorina "The role of pregnancy-specific
glycoprotein in regulation of molecular genetic differentiation
mechanisms of immune memory T cells", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1,
pp. 49-58. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-49-58

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-49-58

Таким образом, ТБГ снижает функциональную активность наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти, связанную с экспрессией молекул костимуляции/активации CD25 и CD28, и участвует в регуляции альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, определяющего соотношение вариантов рецептора CD45. По-видимому, при помощи указанных механизмов ТБГ регулирует функциональную активность циркулирующего пула Т-клеток памяти, потенциально способных к осуществлению антиген-специфических цитотоксических реакций в отношении антигенов эмбрионального происхождения в ситуации *in vivo*. В целом полученные данные расширяют представления о роли ТБГ в регуляции молекулярно-генетических механизмов дифференцировки наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти.

Ключевые слова: ТБГ, иммунная память, наивные Т-клетки, Т-клетки памяти, альтернативный сплайсинг, ген *Ptprc*, CD45RA, CD45R0, CD25, CD28, IL-2

THE ROLE OF PREGNANCY-SPECIFIC GLYCOPROTEIN IN REGULATION OF MOLECULAR GENETIC DIFFERENTIATION MECHANISMS OF IMMUNE MEMORY T CELLS

Rayev M.B.^{a, c}, Litvinova L.S.^b, Yurova K.A.^b, Khaziakhmatova O.G.^b, Timganova V.P.^a, Bochkova M.S.^a, Khramtsov P.V.^{a, b, c}, Zamorina S.A.^{a, c}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^b Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

^c Perm State University, Perm, Russian Federation

Abstract. The role of pregnancy-specific β 1-glycoprotein (PSG) in the regulation of molecular genetic factors determining the functional activity of naïve T cells and T cells of immune memory *in vitro* was studied. Human PSG was isolated with a proprietary immuno-purification method using a biospecific sorbent followed by removing of immunoglobulin contamination with a HiTrapTM Protein G HP column. Physiological concentrations of PSG were used in the experiments. They corresponded to PSG levels in the peripheral blood of pregnant woman: 1, 10 and 100 μ g/ml (I, II, III trimester, respectively). The objects of study were monocultures of naïve T cells (CD45RA⁺) and memory T cells (CD45R0⁺), obtained by immunomagnetic separation from the peripheral blood of women of reproductive age.

It was established that at the level of naïve T cells (CD45RA⁺) PSG inhibited the expression of CD28 (1, 10, 100 μ g/ml) and CD25 (100 μ g/ml), without affecting the interleukin-2 (IL-2) production by these cells. At the same time, PSG in all concentrations studied suppressed the expression of CD25 at the immune memory T-cell (CD45R0⁺) surface but increased the IL-2 production. Expression of *U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL* genes regulating the alternative splicing of the *Ptprc* gene encoding CD45 was also evaluated. It was found, that PSG reduced the expression of the *Gfi1* (1, 10, 100 μ g/ml), *hnRNPLL* (10, 100 μ g/ml) genes, but increased the expression of the *U2af114* gene (1, 10, 100 μ g/ml) in the naïve T cells. It was shown that at the immune memory T-cells' level the effects were similar, with PSG rendering them in all concentrations used. The revealed changes in the mRNA transcription of *U2af114*, *Gfi1* and *hnRNPLL* genes in the studied T cell subsets may lead to the inhibition of CD45 "mature" isoform formation – CD45R0.

Thus, PSG reduces the functional activity of naïve T cells and immune memory T cells associated with the expression of costimulation/activation molecules CD25 and CD28 and is involved in the regulation of *Ptprc* gene alternative splicing, which determines the ratio of CD45 molecule variants. Apparently, using these mechanisms, PSG regulates the functional activity of the memory T cell circulating pool, which is potentially capable of carrying out antigen-specific cytotoxic reactions against fetal antigens *in vivo*. In general, the data obtained broadens the notion of the PSG role in the regulation of molecular-genetic mechanisms of naïve T cells and immune memory T cells differentiation.

Keywords: PSG, immune memory, naïve T cells, memory T cells, alternative splicing, *Ptprc* gene, CD45RA, CD45R0, CD25, CD28, IL-2

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-44-0049 и программой повышения конкурентоспособности (5-100) и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» БФУ им. И. Канта.

Список сокращений

CD45 — общелейкоцитарный рецептор; CD45R0 — низкомолекулярная изоформа рецептора CD45; CD45RA — высокомолекулярная изоформа рецептора CD45; Gfi1 (*Gfi1*) — фактор транскрипции (growth factor independent 1); МНС — главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex); Ptprc — белок тирозиновая фосфатаза, рецепторный тип (Protein Tyrosine-Phosphatase, Receptor Type), кодируется геном *Ptprc*; STAT — фактор транскрипции эукариот; TCR — Т-клеточный рецептор (T cell receptor); Th — Т-хелперы; U2AF26 (*U2af114*) — вспомогательный фактор сплайсинга (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 4); АПК — антигенпрезентирующая клетка; кДНК — копия дезоксирибонуклеиновой кислота; мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота; ПЦР — полимеразная цепная реакция; РНК — рибонуклеиновая кислота; ТБГ — трофобластический $\beta 1$ -гликопротеин.

Введение

Трофобластический $\beta 1$ -гликопротеин (ТБГ) является одним из наиболее информативных маркеров формирования и функционирования фетоплацентарной системы [4]. На уровне иммунной системы ТБГ участвует в регуляции как врожденного, так и адаптивного иммунного ответов [1, 10, 12]. Невзирая на очевидный иммунорегуляторный потенциал ТБГ, его роль в регуляции Т-клеток иммунной памяти остается неизвестной. В то же время присутствие фетоплацентарных антигенов в период беременности модулирует Т-клеточную память, что имеет значение для формирования иммунной толерантности, а также для последующей беременности [8]. Можно предположить, что ТБГ регулирует функциональную активность циркулирующего пула Т-клеток памяти, потенциально способных к осуществлению антиген-специфических цитотоксических реакций в отношении антигенов эмбрионального происхождения.

Во время беременности иммунная система матери претерпевает изменения, направленные на формирование иммунной толерантности к полуаллогенному эмбриону. Изучение дифференцировки Т-клеток памяти в настоящее время связано с оценкой экспрессии различных изоформ молекулы CD45, экспрессия которой на иммунокомпетентных клетках является критическим регулятором сигнализации, опосредованной

Т-клеточным рецептором (TCR) [11]. В процессе дифференцировки Т-клеток изменяется структура внеклеточного домена CD45: так, в наивных клетках это полная форма (CD45RA, 220 кДа), по мере антигензависимой дифференцировки ряд доменов теряется, а продукт конечной модификации обозначают как CD45R0 (180 кДа). Т-лимфоциты, экспрессирующие CD45RA⁺, рассматриваются как «наивные» Т-клетки, а экспрессирующие CD45R0⁺ — как «примированные» Т-клетки иммунной памяти [2].

CD45 является трансмембранной тирозиновой протеинфосфатазой, которую кодирует ген *Ptprc* [17]. С помощью механизма альтернативного сплайсинга, в результате дифференциального использования трех экзонов (4, 5 и 6) внеклеточного домена гена *Ptprc*, возможна генерация восьми различных изоформ молекулы CD45, пять из которых присутствуют на лимфоцитах (R0, RA, RB, RBC и RABC изоформы) и определяют этапы их дифференцировки [6]. После активации Т-клеток пропуск вариативных экзонов CD45 приводит к гомодимеризации рецептора на клеточной поверхности и образованию неактивной формы фосфатазы со снижением сигнализации через TCR. В настоящее время выявлено три гена (*U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*), продукты которых, взаимодействуя, модулируют процесс альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, сопряженный с дифференцировкой иммунокомпетентных клеток [7].

Известно, что функциональная активность Т-лимфоцитов тесно связана с экспрессией поверхностных маркеров, таких как CD28 и CD25 [3, 14]. Молекула CD28 является первичным корецептором, опосредующим позитивную костимуляцию Т-клеток, участвуя в формировании иммунного синапса через взаимодействие с CD80/86 (B7) на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК). CD25 (α -цепь рецептора для IL-2) представляет собой ранний маркер активации, функционально связанный с продукцией IL-2 [3] и отражающий способность клеток к дифференцировке и пролиферации.

Мы предполагаем, что ТБГ принимает непосредственное участие в дифференцировке и созревании Т-лимфоцитов посредством регуляции альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, что в конечном итоге может определить исход как первичных, так и вторичных иммунных реакций. В связи с вышесказанным, целью исследования явилось определение роли ТБГ в регуляции молекулярно-генетических процессов, определяющих дифференцировку и созревание наивных Т-клеток в Т-клетки иммунной памяти. В задачи входила оценка влияния ТБГ на мембранную экспрессию молекул костимуляции/активации

(CD28, CD25) наивными Т-клетками (CD45RA⁺) и Т-клетками иммунной памяти (CD45R0⁺) с одновременной оценкой уровней относительной экспрессии генов *U2af1l4*, *Gfi1*, и *hnRNPLL*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc* в исследуемых субпопуляциях Т-клеток и продукции IL-2 этими клетками.

Материалы и методы

Исследование проводилось согласно Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., получено разрешение этического комитета «ИЭГМ УрО РАН» (IRB00010009) от 12.06.2016.

Получение препарата ТБГ

ТБГ человека получали авторским запатентованным методом иммуноочистки с использованием биоспецифического сорбента с последующим освобождением от иммуноглобулиновой контаминации на колонке HiTrapTM Proten G HP (Amersham Biosciences, Швеция) [5]. Чистоту препарата подтверждали электрофоретически, молекулярную гетерогенность — методом LC/MS. Препарат, полученный по этой методике, содержал как минимум 5 молекулярных форм белка: ТБГ-1, ТБГ-3, ТБГ-4, ТБГ-7, ТБГ-9. Полученный таким образом ТБГ имеет очевидные преимущества перед рекомбинантными формами белка и максимально приближен по своему составу к ТБГ беременной женщины в ситуации *in vivo*. В экспериментах использовали физиологические концентрации ТБГ, соответствующие его уровню в периферической крови матери в период беременности: 1, 10 и 100 мкг/мл (I, II, III триместр соответственно) [4].

Объекты исследования

В работе использовали фракционированные мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) практически здоровых доноров, которыми являлись небеременные женщины репродуктивного возраста ($n = 10$). МПК получали центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (1,077 г/см³) (Pharmacia, Швеция).

Сепарирование CD45RA⁺ и CD45R0⁺ клеток

Монокультуры наивных Т-клеток (CD45RA⁺) и Т-клеток памяти (CD45R0⁺) получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS[®] (Miltenyi Biotec, Германия) из суспензии МПК. В эксперименте использовали клеточные культуры, содержание CD3⁺CD45RA⁺CD14[−]CD19[−] и CD3⁺CD45R0⁺CD14[−]CD19[−] Т-клеток в которых составляло в среднем $98,5 \pm 1,5\%$. Выделенные клетки с фенотипом CD45RA⁺ или CD45R0⁺ (1×10^6 кл/мл) культивировали в 48-луночных

планшетах в полной питательной среде (ППС): RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), с добавлением 10% ЭТС (Sigma, США), 10 мМ Hepes (ICN Ph., США), 2 мМ L-глутамина (ICN Ph., США) 5×10^{-5} М β-меркаптоэтанола (Acros Organics, США) и 30 мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения) в течение 48 ч при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. В качестве контроля использовали образец, где вместо гормона добавляли ППС.

В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали Т-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) (Miltenyi Biotec, Германия) — антибиотинные частицы MACSiBeadTM с биотинилированными антителами против CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺ человека. Определение поверхностных молекул костимуляции и активации (CD25 PE-Cy 5.5, CD28PE-Cy7, Miltenyi Biotec, Германия) на CD45RA⁺ и CD45R0⁺ Т-клетках проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). Результаты проточной цитометрии были проанализированы с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

Мультиплексный ПЦР-анализ

Выделение тотальной РНК из полученных образцов проводили с использованием реагента ExtractRNA kit (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием праймера oligo(dT)23-primer (20 мкМоль) (Beagle, Россия) и обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия). Мультиплексный анализ ПЦР проводили с использованием реагентов qPCRMixHS («Евроген», Россия), специфических зондов TaqMan и праймеров в концентрации 10 пМоль (Beagle, Россия). В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена — ген GAPDH. Последовательности олигонуклеотидных праймеров представлены в таблице 1. ПЦР была проведена в трех повторах с использованием амплификатора LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche, Швейцария) в следующем режиме: 95 °С, 5 мин; 95 °С, 20 с; 60 °С, 30 с; 72 °С, 60 с — 45 циклов, 72 °С, 5 мин. Уровень экспрессии мРНК в контрольных и опытных пробах определяли относительно экспрессии референсного гена с использованием метода $2^{-\Delta Ct}$, вычисляя значение $2^{-(Ct \text{ целевого гена} - Ct \text{ референсного гена})}$, где Ct — пороговый цикл реакции [9].

Оценка концентрации IL-2

Содержание IL-2 в культуральных супернатантах оценивали иммуноферментным методом при помощи тест-систем «Вектор-Бест» (Россия). Измерение оптической плотности производили на многоканальном спектрофотометре Biohit BP 800 (Финляндия).

ТАБЛИЦА 1. НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ

TABLE 1. NUCLEOTIDE SEQUENCE OF PRIMERS AND PROBES

GFI1_for 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3'
GFI1_rev 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3'
U2af114_for 5'-CTTCACAACAAGCCGACATTC-3'
U2af114_rev 5'-CAAGGTTGTCGCACACATTC-3'
hnRPLL_for 5'-CTCTCAATTCAGAATCCGCTTTATC-3'
hnRPLL_rev 5'-CCATTGCTTGTATCCCATTTCTC-3'
GAPDH_for 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
GAPDH_rev 5'-GAAGATGGTGTATGGGATTTTC-3'
GFI1_probe FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~BHQ-1
U2af114_probe FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAACTGCA-3'~BHQ-1
hnRPLL_probe FAM-5'-TATGCAACCCTGTTGGCAAAGTGC-3'~BHQ-1
GAPDH_probe HEX-5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'~BHQ-1

Статистическая обработка полученных результатов для иммуноферментного анализа проводилась с помощью парного t-критерия Стьюдента, данные представлены в виде $M \pm \sigma$. Данные, полученные методом проточной цитометрии и в мультиплексном ПЦР-анализе, представлены в виде медианы с нижним и верхним квартилем $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$, статистическая обработка проведена с помощью W-критерия Вилкоксона. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для оценки эффектов ТБГ на наивные Т-клетки и Т-клетки памяти использовали активационную модель, которая отражает процесс взаимодействия Т-лимфоцитов разной степени дифференцировки с АПК. Присутствие в культуре частиц, имитирующих АПК (Ac/Exp), активирует Т-клетки через молекулы CD2, CD3 и CD28. Вследствие этого формируется иммунный синапс, и регулируются такие процессы, как активация, дифференцировка и пролиферация лимфоцитов. Такой подход позволяет в контролируемых условиях исследовать разные аспекты функциональной деятельности Т-клеток памяти. Наличие интактных проб (без Ac/Exp) позволило нам оценить самостоятельный эффект TCR-активации клеток.

Известно, что функциональная активность Т-лимфоцитов тесно связана с экспрессией CD25 (α -цепь рецептора для IL-2), который представляет собой ранний маркер активации, отражающий способность клетки к дифференцировке и пролиферации. Показано, что самостоятельный эффект TCR-активации клеток заключался

в значительном повышении экспрессии CD25 на поверхности наивных Т-клеток и Т-клеток памяти (рис. 1), что свидетельствует о ранней активации этих клеток. В то же время TCR-активация клеток не влияла на уровень экспрессии CD28 (рис. 1).

Показано, что на уровне общего пула наивных Т-клеток (CD45RA⁺) ТБГ снижал экспрессию CD28 во всех используемых концентрациях (1, 10, 100 мкг/мл), а уровень экспрессии CD25 снижался только ТБГ в высокой концентрации. В то же время на уровне Т-клеток иммунной памяти (CD45RO⁺) эффекты ТБГ, сохраняя свою супрессивную направленность, были иными. Так, ТБГ снижал экспрессию CD25 (10 и 100 мкг/мл), но не влиял на уровень CD28 (рис. 1).

Известно, что молекула CD28 конститутивно экспрессируется на всех наивных (CD45RA⁺) Т-клетках и является первичным корецептором, опосредующим их позитивную костимуляцию, играя важную и сложную роль в контроле иммунного гомеостаза [3]. Снижение экспрессии CD28 может приводить к подавлению функциональной активности наивных Т-клеток, так как эта молекула участвует в формировании иммунного синапса, взаимодействуя с CD80/86 (B7) на поверхности АПК. Формирование полноценного иммунного синапса, в свою очередь, приводит к антиген-специфической клональной экспансии Т-лимфоцитов. В контексте полученных результатов можно предположить, что в ситуации *in vivo* снижение экспрессии CD28 на наивных Т-лимфоцитах под воздействием ТБГ приводит к подавлению иммунного ответа на фетоплацентарные антигены. В то же время «антигенпри-

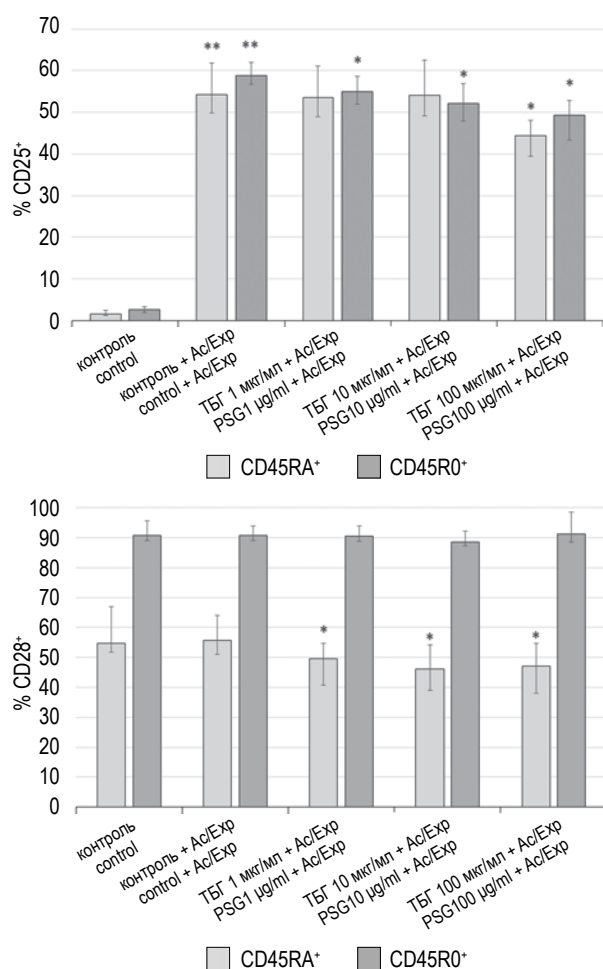


Рисунок 1. Влияние ТБГ на экспрессию CD25 и CD28 в TCR-активированных культурах CD45RA⁺ и CD45R0⁺ T-лимфоцитов (n = 10; Me (Q_{0.25}-Q_{0.75}))

Примечание. * – достоверные по W-критерию Вилкоксона (p < 0,05) различия с контролем + Ac/Exp; ** – достоверные по W-критерию Вилкоксона (p < 0,05) различия с контролем (без Ac/Exp).

Figure 1. The effect of PSG on the CD25 and CD28 expression on TCR-activated CD45RA⁺ and CD45R0⁺ T cells (n = 10; Me (Q_{0.25}-Q_{0.75}))

Note. *, p < 0.05 as compared with control + Ac/Exp, paired Wilcoxon test; **, p < 0.05 as compared with control (without Ac/Exp), paired Wilcoxon test.

мированные» T-клетки (CD45R0⁺) изначально экспрессировали высокие уровни CD28 и были устойчивы к действию ТБГ.

Таким образом, в целом на уровне наивных T-клеток (CD45RA⁺) ТБГ угнетал экспрессию CD28 и CD25, на уровне T-клеток иммунной памяти (CD45R0⁺) угнетая только экспрессию CD25.

Установлено, что добавление T-клеточного активатора способствовало значительному увеличению концентрации IL-2 в среде культивирования (рис. 2). Внесение ТБГ приводило к по-

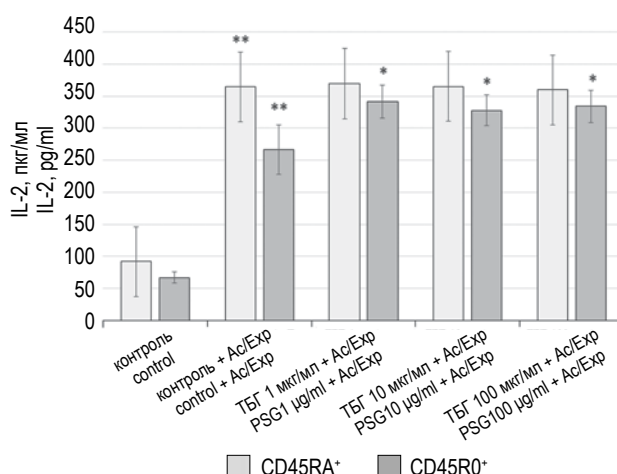


Рисунок 2. Влияние ТБГ на продукцию IL-2 изолированными CD45RA⁺ и CD45R0⁺ лимфоцитами (n = 9; M ± σ)

Примечание. * – достоверные по t-критерию Стьюдента (p < 0,05) различия с контролем + Ac/Exp; ** – достоверные по t-критерию Стьюдента (p < 0,05) различия с контролем (без Ac/Exp).

Figure 2. The effect of PSG on IL-2 production by isolated CD45RA⁺ and CD45R0⁺ lymphocytes (n = 9; M ± σ)

Note. *, p < 0.05 as compared with control + Ac/Exp, paired Student's t-test; **, p < 0.05 as compared with control (without Ac/Exp), paired Student's t-test.

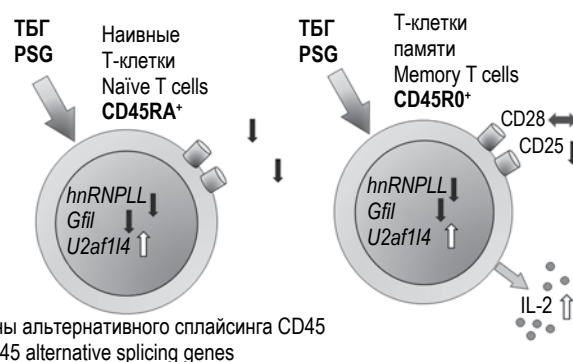


Рисунок 3. Влияние ТБГ на молекулярно-генетические характеристики дифференцировки T-клеток

Figure 3. PSG influence on the molecular genetic characteristics of T cell differentiation

вышению уровня IL-2 в супернатантах культур CD45R0⁺-клеток, однако не влияло на уровень IL-2, продуцируемый наивными T-клетками (CD45RA⁺) (рис. 2). Тот факт, что ТБГ повышает продукцию IL-2 примированными T-клетками памяти, свидетельствует о том, что гормон активно участвует в регуляции активности этих субпопуляций. В то же время повышение IL-2 в нашем исследовании ассоциировано со снижением экспрессии молекулы CD25 (α-цепь рецептора для IL-2) на этих клетках, что можно объяснить аутокринной регуляцией эффектов IL-2.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ТБГ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *hnRNPLL*, *Gfi1* И *U2af114* В КУЛЬТУРАХ ТСR-АКТИВИРОВАННЫХ CD45RA⁺ И CD45R0⁺Т-КЛЕТОК

TABLE 2. THE EFFECT OF PSG ON THE *hnRNPLL*, *Gfi1* AND *U2af114* GENES EXPRESSION IN CULTURES OF TCR-ACTIVATED CD45RA⁺ AND CD45R0⁺T CELLS

	Экспериментальное воздействие Experimental impact	CD45RA ⁺ Уровень экспрессии мРНК, отн. ед. Level of mRNA expression, relative units			CD45R0 ⁺ Уровень экспрессии мРНК, отн. ед. Level of mRNA expression, relative units		
		<i>Gfi1</i>	<i>U2af114</i>	<i>hnRNPLL</i>	<i>Gfi1</i>	<i>U2af114</i>	<i>hnRNPLL</i>
1	Контроль (без Ас/Ехр) Control (without Ac/Exp)	0,009 (0,001-0,011)	0,023 (0,011-0,030)	0,026 (0,010-0,033)	0,016 (0,008-0,027)	0,018 (0,007-0,029)	0,011 (0,002-0,019)
2	Контроль + Ас/Ехр Control + Ac/Exp	0,616 (0,346-0,762) $p_{2-1} < 0,05$	0,332 (0,243-0,412) $p_{2-1} < 0,05$	0,775 (0,587-0,976) $p_{2-1} < 0,05$	0,512 (0,422-0,631) $p_{2-1} < 0,05$	0,417 (0,335-0,563) $p_{2-1} < 0,05$	0,943 (0,802-1,022) $p_{2-1} < 0,05$
3	ТБГ-1 мкг/мл + Ас/Ехр PSG 1 µg/ml + Ac/Exp	0,414 (0,211-0,465) $p_{3-2} < 0,05$	0,612 (0,453-0,721) $p_{3-2} < 0,05$	0,701 (0,542-0,789) $p_{3-2} < 0,05$	0,313 (0,187-0,421) $p_{3-2} < 0,05$	0,611 (0,532-0,723) $p_{3-2} < 0,05$	0,675 (0,533-0,711) $p_{3-2} < 0,05$
4	ТБГ-10 мкг/мл + Ас/Ехр PSG 10 µg/ml + Ac/Exp	0,334 (0,252-0,378) $p_{4-2} < 0,05$	0,587 (0,443-0,711) $p_{4-2} < 0,05$	0,411 (0,345-0,587) $p_{4-2} < 0,05$	0,278 (0,203-0,365) $p_{4-2} < 0,05$	0,634 (0,508-0,785) $p_{4-2} < 0,05$	0,714 (0,665-0,837) $p_{4-2} < 0,05$
5	ТБГ-100 мкг/мл + Ас/Ехр PSG 100 µg/ml + Ac/Exp	0,353 (0,287-0,411) $p_{5-2} < 0,05$	0,623 (0,565-0,723) $p_{5-2} < 0,05$	0,454 (0,332-0,549) $p_{5-2} < 0,05$	0,328 (0,256-0,378) $p_{5-2} < 0,05$	0,621 (0,511-0,765) $p_{5-2} < 0,05$	0,697 (0,645-0,811) $p_{5-2} < 0,05$

Примечание. $n = 10$, $p < 0,05$ – достоверные по W-критерию Вилкоксона различия.

Note. $n = 10$, $p < 0.05$ according to Wilcoxon test are shown.

Несмотря на то, что присутствие ИЛ-2 является необходимым условием для развития долгоживущих клеток памяти [16], в нашем исследовании Т-клетки иммунной памяти под воздействием ТБГ снижают экспрессию CD25 и вследствие этого, по-видимому, относительно резистентны к ИЛ-2. Тем не менее известно, что ИЛ-2 необходим для развития Т-регуляторных лимфоцитов, увеличение количества которых ассоциировано с успешной беременностью, и, возможно, именно они являются «мишенью» для ИЛ-2, продуцируемого CD45RA⁺-клетками. Помимо этого, ИЛ-2 ингибирует дифференцировку провоспалительных Th17-клеток, что в контексте беременности оказывает фетопротекторный эффект [13].

Один из механизмов, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, основан на противоположном действии факторов: сплайсинга *U2af114* (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4, *U2af114*) и транскрипции *Gfi1* (growth

factor independent 1), что в конечном итоге определяет образование разных изоформ молекулы CD45 и активацию Т-клеток во время иммунного ответа [7]. В нашем исследовании присутствие ТСR-активатора приводило к существенному достоверному повышению экспрессии исследуемых генов (табл. 2).

Культивирование наивных Т-клеток с ТБГ способствовало значительному снижению уровня относительной экспрессии мРНК гена *Gfi1* и *hnRNPLL* по сравнению с активированной пробой. Противоположный эффект ТБГ оказывал на уровень относительной экспрессии мРНК гена *U2af114* (табл. 2). Важно отметить, что на уровне Т-клеток памяти эффекты ТБГ были аналогичными, что свидетельствует о неких общих механизмах регуляции альтернативного сплайсинга CD45 на уровне Т-клеток.

Известно, что продукты гена *hnRNPLL* (семейство гетерогенных ядерных рибонуклеопротеи-

нов (Heterogeneous 86 nuclear ribonucleoprotein, hnRNPLL-типа)) координируют работу множества транскрипционных факторов в процессе альтернативного сплайсинга Т-лимфоцитов. Функциональную активность гена *hnRNPLL* ассоциируют с экспрессией CD28, и предполагается, что эта взаимосвязь является дополнительным механизмом регуляции альтернативного сплайсинга CD45 [6]. В частности, повышенная экспрессия гена *hnRNPLL* вызывает пропуск 4 экзона, что приводит к формированию короткой изоформы CD45R0 [15]. В контексте нашей работы снижение экспрессии гена *hnRNPLL* под воздействием ТБГ, по-видимому, блокирует транскрипцию короткой изоформы CD45R0 в Т-клетки памяти (CD45R0⁺).

Помимо участия продуктов гена *hnRNPLL* в регуляции альтернативного сплайсинга молекулы CD45, важную роль в этом процессе отводят совместным действиям вспомогательного фактора сплайсинга U2AF26 (*U2af114*) и фактора транскрипции *Gfi1*. Считается, что антагонистические взаимодействия U2AF26 и *Gfi1* определяют соотношение изоформ CD45: U2AF26 способствует исключению 4 экзона, что приводит к формированию коротких изоформ — CD45R0, тогда как *Gfi1* способствует образованию более активной, высокомолекулярной формы рецептора — CD45RB или RA [7]. Таким образом, выявленные нами эффекты ТБГ, по-видимому, препятствуют генерации более активной, высокомолекулярной формы рецептора — CD45RB или RA за счет пониженной экспрессии *Gfi1*. В то же время повышение экспрессии *U2af114*, которое может способствовать формированию CD45R0, компенсируется сниженной экспрессией гена *hnRNPLL*, который оказывает противоположный эффект на формирование «зрелой» формы CD45R0.

Заключение

Резюмируя вышесказанное, следует заключить, что в ходе выполненного исследования получены данные, характеризующие эффекты ТБГ на молекулярно-генетические процессы дифференцировки наивных Т-клеток и Т-клеток памяти, ассоциированные с мембранной экспрессией молекул костимуляции/активации (CD28 и CD25), продукцией IL-2 и изменением уровней транскрипции мРНК генов *U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL* и *hTERT*, определяющих соотношение вариантов рецептора CD45.

Итоговая схема полученных эффектов представлена на рисунке 3. Так, установлено, что на уровне наивных Т-клеток (CD45RA⁺) ТБГ угнетал экспрессию CD28 и CD25, не влияя на продукцию этими клетками IL-2. В то же время на уровне Т-клеток иммунной памяти (CD45R0⁺) ТБГ подавлял экспрессию CD25 и продукцию IL-2 этими клетками. Параллельно оценивали экспрессию генов *U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, кодирующего CD45, поскольку именно по этому маркеру дифференцируются Т-клетки иммунной памяти. Установлено, что ТБГ снижал экспрессию генов *Gfi1*, *hnRNPLL*, но повышал экспрессию гена *U2af114* в исследуемых субпопуляциях Т-клеток, препятствуя, таким образом, формированию «зрелой» изоформы CD45R0.

В целом ТБГ снижает функциональную активность наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти, связанную с экспрессией CD25 и CD28. Полученные данные расширяют представления о роли ТБГ в регуляции молекулярно-генетических механизмов дифференцировки наивных Т-клеток и Т-клеток иммунной памяти.

Список литературы / References

1. Заморина С.А., Раев М.Б. Изучение иммуномодулирующих эффектов трофобластического β 1-гликопротеина человека // Физиология человека, 2015. Т. 41, № 1. С. 117-123. [Zamorina S.A., Rayev M.B. Immunomodulating effects of human pregnancy-specific β 1-glycoprotein. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology*, 2015, Vol. 41, no. 1, pp. 117-123. (In Russ.)]
2. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 4 (17). С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 4 (17), pp. 947-964. (In Russ.)]
3. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // Медицинская иммунология, 2014. Т. 6, № 1. С. 7-26. [Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sohoneyevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Kaigorodova E.V., Goncharov A.G. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 6, no. 1, pp. 7-26. (In Russ.)]. doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-7-26.

4. Посисеева Л.В., Назаров С.Б., Татаринов Ю.С. Трофобласт-специфический бета-гликопротеин в акушерстве и гинекологии. Иваново: ОАО «Издательство Иваново», 2004. 240 с. [Posiseeva L.V., Nazarov S.B., Tatarinov Yu.S. Trophoblast-specific beta-glycoprotein in obstetrics and gynecology]. Ivanovo: Ivanovo Publishing, 2004. 240 p.
5. Раев М.Б. Способ выделения и очистки трофобластического β -1-гликопротеина. Патент РФ № 2367449, опубликован 20.09.2009, Бюл. № 26. [Rayev M.B. A method for the isolation and purification of trophoblastic β -1-glycoprotein. Patent of the Russian Federation No. 2367449, published on September 20, 2009, Bul. No. 26].
6. Butte J.M., Lee J.S., Jesneck J. CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 6, e40032. doi: 10.1371/journal.pone.0040032.
7. Heyd F., ten Dam G., Mörry T. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfi1 cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing. *Nat. Immunol.*, 2006, Vol. 7, no. 8, pp. 859-867.
8. Kieffer T.E., Faas M.M., Scherjon S.A., Prins J.R. Pregnancy persistently affects memory T cell populations. *J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 119, pp. 1-8.
9. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-(Delta Delta C(T)). *Methods*. 2001, Vol. 25, pp. 402-408.
10. Martinez F.F., Cervi L., Knubel C.P., Panzetta-Dutari G.M., Motran C.C. The role of pregnancy-specific glycoprotein 1a (PSG1a) in regulating the innate and adaptive immune response. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 69, pp. 383-394.
11. McNeill L., Salmond R.J., Cooper J.C., Carret C.K., Cassady-Cain R.L., Roche-Molina M., Tandon P., Holmes N., Alexander D.R. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses. *Immunity*, 2007, Vol. 27, no. 3, pp. 425-437.
12. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Terentiev A.A. Pregnancy-specific β 1-Glycoproteins: combined biomarker roles, structure/function relationships and implications for drug design. *Curr. Med. Chem.*, 2016, Vol. 23, pp. 245-267.
13. Russell S.E., Moore A.C., Fallon P.G., Walsh P.T. Soluble IL-2R α (sCD25) exacerbates autoimmunity and enhances the development of Th17 responses in mice. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 10, e47748. doi: 10.1371/journal.pone.0047748.
14. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin. Chim. Acta*, 2012, Vol. 413, no. 17-18, pp. 1338-1349.
15. Topp J.D., Jackson J., Melton A.A., Lynch K.W. A cell-based screen for splicing regulators identifies hnRNP LL as a distinct signal-induced repressor of CD45 variable exon 4. *RNA*, 2008, Vol. 14, no. 10, pp. 2038-2049.
16. Williams M.A., Tyznik A.J., Bevan M.J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature*, 2006, Vol. 441, pp. 890-893.
17. Wu Z., Yates A.L., Hoyne G.F., Goodnow C.C. Consequences of increased CD45RA and RC isoforms for TCR signaling and peripheral T cell deficiency resulting from heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like mutation. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, pp. 231-238.

Авторы:

Раев М.Б. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Литвинова Л.С. — д.м.н., заведующая базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Юрова К.А. — к.м.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Хазиахматова О.Г. — к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Rayev M.B., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Head, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Yurova K.A., PhD (Medicine), Research Associate, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khaziakhmatova O.G., PhD (Biology), Research Associate, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Тимганова В.П. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Храмцов П.В. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия; научный сотрудник базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Заморина С.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Timganova V.P., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Bochkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Khramtsov P.V., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm; Research Associate, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Zamorina S.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Поступила 09.04.2018
Отправлена на доработку 10.05.2018
Принята к печати 22.05.2018

Received 09.04.2018
Revision received 10.05.2018
Accepted 22.05.2018

ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ К CTLA-4 И PD-1 НА СОДЕРЖАНИЕ ИХ РЕЦЕПТОРОВ МИШЕНЕЙ

Чикилева И.О.¹, Шубина И.Ж.¹, Самойленко И.В.¹, Караулов А.В.²,
Киселевский М.В.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»

Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»

Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Ингибиторные рецепторы CTLA-4 и PD-1 (модуляторы иммунного синапса) играют ключевую роль в регуляции иммунных реакций. Они подавляют чрезмерное развитие иммунного ответа в ответ на патогенные микроорганизмы и предотвращают аутоиммунные реакции. Модуляторы иммунного синапса представляют собой мишени современной эффективной противоопухолевой терапии на основе человеческих и гуманизированных моноклональных антител (ипилимумаб и ниволумаб, тремелимумаб, пембролизумаб и другие). При всей своей эффективности по сравнению с методами обычной химиотерапии терапия на основе блокаторов иммунных чек-пойнтов имеет существенные недостатки, а именно высокую стоимость и существенные побочные эффекты аутоиммунной природы, притом, что терапия помогает, к сожалению, не всем пациентам. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования с целью увеличения эффективности и безопасности данного метода и выработки критериев отбора пациентов для терапии. Один из возможных подходов к снижению побочных эффектов терапии блокаторами модуляторов иммунного синапса — это использование их не системно, а *ex vivo* при получении препаратов активированных иммунных клеток пациентов для противоопухолевой терапии. Целью нашей работы было проследить, каким образом воздействуют блокирующие антитела на экспрессию рецепторов CTLA-4 и PD-1 в подобной системе *in vitro*. Во-первых, было исследовано содержание данных ингибиторных рецепторов в клетках популяции лимфоцитов периферической крови здоровых добровольцев и пациентов с распространенной меланомой. Далее было определено воздействие добавления антител к модуляторам иммунного синапса на содержание клеток, несущих CTLA-4 и PD-1, в популяции лимфоцитов при их активации в присутствии фитогемагглютинаина. Наша работа показала, что присутствие терапевтических антител к любому из двух данных иммунных чек-пойнтов при активации клеток *in vitro* не только блокирует собственный рецептор-мишень, но и перекрестно понижает долю клеток, экспрессирующих другой ингибиторный рецептор. Таким образом, по всей видимости, введение антител либо к PD-1, либо к CTLA-4 в данных экспериментальных условиях может подавлять оба негативных сигнальных каскада одновременно. Причем ответ на антитела, блокирующие разные иммунные чек-пойнты, варьировал у разных доноров. Наши данные могут служить теоретической основой для отработки эффективных комбинаций активаторов лимфоцитов и ингибиторов иммунных чек-пойнтов *in vitro*.

Адрес для переписки:

Чикилева Ирина Олеговна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ
115211, Россия, Москва, Каширское ш., 24.
Тел./факс: 8 (499) 324-27-94.
E-mail: irinatchikileva@mail.ru

Address for correspondence:

Chikileva Irina O.
N. Blokhin Medical Research Center of Oncology
115211, Russian Federation, Moscow, Kashirskoe highway, 24.
Phone/Fax: 7 (499) 324-27-94.
E-mail: irinatchikileva@mail.ru

Образец цитирования:

И.О. Чикилева, И.Ж. Шубина, И.В. Самойленко, А.В. Караулов, М.В. Киселевский «Влияние антител к CTLA-4 и PD-1 на содержание их рецепторов мишеней» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 59-68. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-59-68

For citation:

I.O. Chikileva, I.Zh. Shubina, I.V. Samoylenko, A.V. Karaulov, M.V. Kiselevsky "Influence of antibodies against CTLA-4 and PD-1 upon quantities of their target receptors", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 59-68. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-59-68

© Чикилева И.О. и соавт., 2019

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-59-68

для адоптивной терапии опухолей, а также служить для прогноза возможного ответа на антитела к CTLA-4 и к PD-1 для подбора персонализированного метода иммунотерапии.

Ключевые слова: иммунные чек-пойнты, ингибиторные иммунные рецепторы, CTLA-4, PD-1, ипилимумаб, ниволумаб, иммунотерапия опухолей

INFLUENCE OF ANTIBODIES AGAINST CTLA-4 AND PD-1 UPON QUANTITIES OF THEIR TARGET RECEPTORS

Chikileva I.O.^a, Shubina I.Zh.^a, Samoylenko I.V.^a, Karaulov A.V.^b, Kiselevsky M.V.^a

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

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

Abstract. Inhibitory receptors CTLA-4 and PD-1 (immune checkpoints) play a key role in regulation of immune reactions. They suppress excessive immune response against pathogenic microbes and prevent autoimmune reactions. The immune checkpoints are targets of the modern effective therapy based on human and humanized monoclonal antibodies (ipilimumab and nivolumab, tremelimumab, pembrolizumab, etc). However, despite its high efficiency compared to standard chemotherapy, the therapy based on blocking immune check points is facing several problems, i.e., high therapy cost and severe negative autoimmune-related side effects. Unfortunately, this therapy helps to minority of the patients. Hence, further studies are required to improve its efficiency and safety, as well as to search for selection criteria of the patients who would benefit from the therapy. An appealing approach to reduce negative side effects from immune checkpoint inhibition is application of the blocking antibodies, aiming for ex vivo generation of patients' activated immune cells for cancer therapy, thus avoiding systemic drug administration. Our aim was to elucidate influence of immune checkpoint blocking antibodies on the expression of CTLA-4 and PD-1 in such an *in vitro* model. First of all, we have determined quantities of lymphocyte receptors in peripheral blood of healthy volunteers, or cancer patients with disseminated melanoma. Moreover, we defined effect from the addition of antibodies against immune checkpoints on proportions of cells expressing CTLA-4 and PD-1 in the population of phytohemagglutinin-activated lymphocytes. Our study demonstrated that, in presence of antibodies to either of the two checkpoints during *in vitro* cell activation, the blockade of specific target receptor is accompanied by reduced number of cells positive for another checkpoint. Hence, the antibodies directed against PD-1 or CTLA-4 seem to suppress both negative signal cascades at once, if tested under such experimental conditions. Noteworthy, the response to blocking antibodies for different immune checkpoints varied for different donors. Our data may be used for development of effective combinations of lymphocyte activators and immune check-point inhibitors, for *in vitro* generation of activated lymphocytes applied for adoptive cancer therapy, as well as for prediction of possible responses to antibodies against CTLA-4 or PD-1, aiming to select the best personalized cancer immunotherapy.

Keywords: immune checkpoints, inhibitory immune receptors, CTLA-4, PD-1, ipilimumab, nivolumab, cancer immunotherapy

Введение

Ингибиторные рецепторы CTLA-4 и PD-1 представляют собой ключевые молекулы в регуляции иммунного ответа, так как их активация отключает либо уменьшает иммунные реакции в зависимости от потребностей организма, что дало им название иммунных чек-пойнтов, то есть контрольных точек иммунитета. Блокирование иммунных чек-пойнтов при помощи специфических антител [25] либо удаление их генов путем генно-инженерных манипуляций (нокаутирование) [27] у подопытных животных ведет к иммунным нарушениям, которые классифицируют

как аутоиммунные реакции. Потеря гена CTLA-4 приводит к ранней гибели мышей (2-3 недели после рождения), сопровождающейся массивной инфильтрацией тканей активированными лимфоцитами, которая влечет фатальное разрушение тканей ряда органов [12, 27]. Потеря функционального гена PD-1 не вызывает гибели подопытных мышей [19]. Кроме того, необходимы дополнительные провоцирующие генетические факторы, чтобы нарушение данного гена привело к развитию аутоиммунных заболеваний, что указывает на различную специализацию данных ингибиторных рецепторов в регуляции развития и протекания иммунных реакций [19].

Существенным прорывом в лечении онкологических заболеваний, в особенности метастатической меланомы, оказалась разработка метода лечения на основе моноклональных антител, блокирующих иммунные чек-пойнты [17, 18]. Основная гипотеза о механизме действия данного подхода лечения заключается в том, что, ослабляя негативную регуляцию иммунного ответа, можно сделать эффективными противоопухолевые иммунные реакции, которые якобы «выключены» данными иммунными чек-пойнтами. К сожалению, при высокой стоимости и зачастую выраженных и даже фатальных побочных эффектах аутоиммунной природы данный метод лечения помогает далеко не всем пациентам. Так, при использовании препарата ипилимумаб для лечения злокачественной меланомы объективный ответ наблюдается приблизительно у 10% пациентов [18]. Эффективность терапевтических антител ниволумаб оказалась выше при менее выраженных аутоиммунных эффектах. Объективный ответ наблюдался у 30-35% пациентов со злокачественной меланомой [13]. Причем в течение 12 месяцев не наблюдалось рецидивов также у большего числа пациентов, которых лечили препаратом ниволумаб, а не ипилимумаб (70,5 и 60,8% соответственно) [31]. Последние данные показывают, что ниволумаб оказался не эффективен для лечения множественной миеломы в монорежиме, но, предположительно, способствовал успешности последовавшей терапии на основе иммуномодулирующих препаратов (талидомид, леналидомид) [21]. Недавно проведенное сравнительное исследование также показало сравнительно низкую эффективность ипилимумаба по сравнению с ниволумабом и пембролизумабом (блокаторами PD-1) [15]. Ряд научных коллективов во всем мире, в том числе и наш, ведет разработки с целью увеличить эффективность и безопасность метода лечения онкологических пациентов при помощи блокаторов иммунных чек-пойнтов и выработать критерии отбора пациентов для терапии. Для этого важно понять, какие процессы идут в организме пациентов в ходе терапии: какие гены включаются, а какие, наоборот, какие сигнальные пути задействованы. Разумеется, в первую очередь следует обратить внимание на сами мишени терапии, ингибиторные корецепторы.

Оба рецептора принадлежат к семейству CD28 и функционируют как гомодимеры [24]. Они имеют единственный внеклеточный домен, схожий с варибельным доменом иммуноглобулинов. Однако, в отличие от CD28, необходимого для индукции эффективного иммунного ответа через Т-клеточный рецептор (ТКР), иммунные чек-пойнты ему препятствуют, хотя и разными

способами, и в разных пространственных и временных точках его развития [24].

CTLA-4 имеет общие лиганды с CD28, молекулы костимуляции В7-1 и В7-2. Причем взаимодействует с ними с более высокой аффинностью. Этот рецептор преимущественно локализован внутри клеток, как в покоящихся, так и в активированных Т-лимфоцитах, хотя при активации клеток увеличивается его содержание в клетках, а также интенсифицируется обмен его молекул между плазматической мембраной и эндосомально-лизосомальным внутриклеточным компартментом [16, 29]. Исключительно во время активации клеток рецептор выходит на ограниченный период времени в область иммунного синапса с антигенпрезентирующей клеткой (АПК), где, вероятно, оказывает свое ингибирующее действие на функционирование Т-клетки, взаимодействуя со своими лигандами, молекулами В-7, конкурируя с CD28 и, предположительно, индуцируя некоторые негативные сигнальные события, подавляющие развитие эффективного иммунного ответа. Далее иммунный синапс нарушается и клетки расходятся. Однако именно в этот момент происходит событие, которое многими авторами считается сейчас ключевым в функционировании рецептора CTLA-4. Белок осуществляет процесс транс-эндоцитоза, связывая молекулы В-7 на поверхности АПК и направляя их в комплексе с собой внутрь Т-клетки, в лизосомально-эндосомальный компартмент, где они подвергаются протеолизу [23]. Таким образом, способность индуцировать иммунный ответ к презентруемому антигену у АПК после взаимодействия с данным иммунным чек-пойнтом в значительной степени снижается. Этот уникальный процесс обуславливает возможность негативного воздействия CTLA-4 не только на клетки, которые его несут, но и на другие лимфоциты со схожей антигенной специфичностью, но нокаутированные по данному гену [6, 30]. Таким образом, первоначальная гипотеза о прямой конкуренции между CD28 и CTLA-4 за общие лиганды в данный момент была в значительной степени пересмотрена. Механизм его действия оказался более сложным.

PD-1 присутствует на клеточной поверхности, а также в сети Гольджи [20]. В отличие от CTLA-4, PD-1 имеет свои собственные лиганды PD-L1 и PD-L2, которые могут находиться на поверхности как АПК, так и других клеток организма. Таким образом, если ингибиторное воздействие CTLA-4 ограничено лимфоидными тканями, где инициируется иммунный ответ, то PD-1 может действовать дополнительно в тканях, осуществляя контроль над его осуществлением [9]. Взаимодействие рецептора PD-1 с его лигандами

ведет к ингибированию активационных процессов, осуществляемых через ТКР и CD28. Так же как и в случае CTLA-4, экспрессия PD-1 стимулируется при активации Т-клеток [11]. Действие обоих чек-пойнтов сокращает пролиферацию Т-клеток, метаболизм глюкозы, продукцию цитокинов, выживание клеток [8, 11]. Существенно, что как CTLA-4, так и PD-1 экспрессируются как Т-клетками, так и натуральными киллерами (НК) [2, 26].

Блокирование столь важных иммунных регуляторов, как CTLA-4 и PD-1, приводит не только к изменению в клеточных сигнальных каскадах, но и в профиле экспрессии генов. Причем, судя по имеющимся данным, мы имеем дело с крайне сложной регуляторной системой. Это ярко демонстрируется значительным отличием воздействия на экспрессию генов комбинированного или последовательного введения ингибиторов иммунных чек-пойнтов [7]. Основным результатом блокирования рецептора CTLA-4 в популяции моноклеарных клеток периферической крови (МНК) оказывается увеличение у них уровня экспрессии генов, ответственных за клеточный цикл и пролиферацию [6, 7]. Причем это было показано, как в экспериментальной системе на Т-клетках мышей, дефективных по экспрессии гена CTLA-4 [6], так и у людей, проходящих терапию антителами к CTLA-4 [7]. Интересно отметить, что экспрессия гена CTLA-4 увеличивалась под воздействием блокаторов данного рецептора [7]. Это позволяет предположить присутствие компенсаторных механизмов, восстанавливающих негативную регуляцию через CTLA-4 в случае его блокирования. Авторы другой работы отметили, что терапия блокаторами CTLA-4 (ипилимумаб) ведет также к некоторому увеличению фракции CD4⁺Т-хелперных клеток, экспрессирующих PD-1, что предполагает также параллельную активацию негативной регуляции через другой сигнальный каскад [4].

Блокирование PD-1 у МНК ведет, в отличие от CTLA-4, к активации генов, ответственных за функционирование натуральных киллеров (НК), важнейших эффекторов врожденного иммунитета, способных лизировать некоторые опухоли [7]. В то же время комбинация антител к CTLA-4 и PD-1, хотя и ведет к изменению экспрессии значительно более широкого спектра генов, но слабо пересекается с профилями воздействия индивидуальных блокаторов, что говорит о сложной системе регуляции, в которой участвуют иммунные чек-пойнты, и о возможном синергизме в их действии [7].

Был идентифицирован широкий спектр транскрипционных и эпигенетических факторов, регулирующих экспрессию PD-1 в ходе нор-

мального иммунного ответа и при хронической инфекции [1]. Как в регуляции экспрессии PD1, так и CTLA-4 участвуют транскрипционные факторы семейства NFAT (nuclear factor of activated T cells – ядерный фактор активированных Т-клеток) [1, 5, 10]. Однако следует отметить, что знания о деталях регуляции экспрессии CTLA-4 и PD-1, в особенности в присутствии их блокаторов, достаточно ограничены.

Следует подчеркнуть, что наше знание о природе данных ингибиторных рецепторов еще далеко не полное, и многие данные мы получаем лишь только сейчас, когда терапия блокаторами CTLA-4 и PD-1 уже была одобрена для широкой клинической практики. Особо ярко это было продемонстрировано в прекрасном обзоре Lucy S.K. Walker and David M. Sansom, показавшем противоречивость и недостаточность практически всех данных о функционировании корцептора CTLA-4 [28]. Согласно анализу работ, проведенному авторами, на данный момент практически нет достоверных, непротиворечивых сведений ни о механизмах ингибиторного воздействия CTLA-4 на клетки, ни о сигнальных каскадах, запускаемых данным иммунным чек-пойнтом, ни о его воздействии на «стоп-сигнал» во время взаимодействия Т-клеток с антигенпрезентирующими клетками (АПК), необходимым для эффективной активации иммунного ответа. Поэтому изучение механизмов воздействия специфических блокирующих антител на данные иммунные чек-пойнты представляет огромный интерес для медицины и для фундаментальной биологии.

В своей работе мы изучали содержание ингибиторных рецепторов PD-1 и CTLA-4 (долю позитивных клеток и относительную экспрессию) у пациентов, проходящих терапию антителами к PD-1 и в популяции моноклеарных клеток периферической крови (МНК) человека. Кроме теоретического аспекта, касающегося механизмов регуляции иммунных чек-пойнтов, данное исследование актуально, в первую очередь, в рамках оценки систем генерации *ex vivo* лимфоцитов, активированных в присутствии ингибиторов иммунных чек-пойнтов для последующей адоптивной терапии пациентов со злокачественными опухолями.

Материалы и методы

В ходе исследования были протестированы образцы периферической венозной крови здоровых добровольцев и пациентов со злокачественной метастатической меланомой, проходящих терапию антителами к PD-1 на базе РОНЦ им. Н.Н. Блохина (приводятся данные для 10 пациентов и 4-х добровольцев). Образцы крови па-

циентов анализировали до начала терапии и спустя 2-3 месяца перед началом следующего курса терапии.

Из стабилизированной гепарином периферической крови выделяли мононуклеарные клетки (МНК) на одноступенчатом градиенте фикола-урографина плотностью 1,077 г/см³ (ПанЭко, Россия). МНК пациентов и доноров немедленно обрабатывали конъюгатами антител к CTLA-4 и PD-1 с фикоэритрином (PE) (eBioscience, США) в концентрациях, рекомендованных производителем. Окрашивание антителами к PD-1 проводили в фосфатно-солевом буфере с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина. Для оценки внутриклеточного содержания CTLA-4 клетки предварительно пермеабилizировали при помощи набора FoxP3-staining buffer set (eBioscience, США) и далее проводили окрашивание, как рекомендовано производителем. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACS Cantoo II (Becton Dickinson, США). Анализ осуществляли среди лимфоцитов, определяя их популяцию на основании параметров прямого и поперечного светорассеяния.

Часть МНК здоровых доноров предварительно активировали 3 суток в полной среде с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки в присутствии 1 мкг/мл фитогемагглютинаина (ФГА) (ПанЭко, Россия) отдельно или в комбинации с блокирующими антителами к PD-1 (ни-

волумаб, Bristol-Myers Squibb, США) и CTLA-4 (50 мкг/мл) (ипилимумаб, Bristol-Myers Squibb, США). Далее образцы культивированных МНК обрабатывали для проточной цитометрии так же, как и для исходных клеток.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакетов FACSDiva v. 6.1.3 и Microsoft Excel 2010, Statistica v. 10. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Характер экспрессии рецепторов PD-1 и CTLA-4 у здоровых доноров и пациентов с распространенной меланомой

Рецептор CTLA-4 присутствует внутри клеток подавляющего большинства лимфоцитов как больных распространенной меланомой (84-91%), так и здоровых доноров (81-99%). На поверхности клеток данный модулятор иммунного синапса не был детектирован ни в одном из обследованных образцов.

Рецептор PD-1 был детектирован на значительно варьирующей у разных индивидуумов части лимфоцитов больных (от 2 до 36%, рис. 1А). У здоровых доноров также отмечался разброс показателя в значительных пределах (от 2 до 46%, рис. 1Б).

Таким образом, не было выявлено существенных различий в экспрессии иммунных чек-

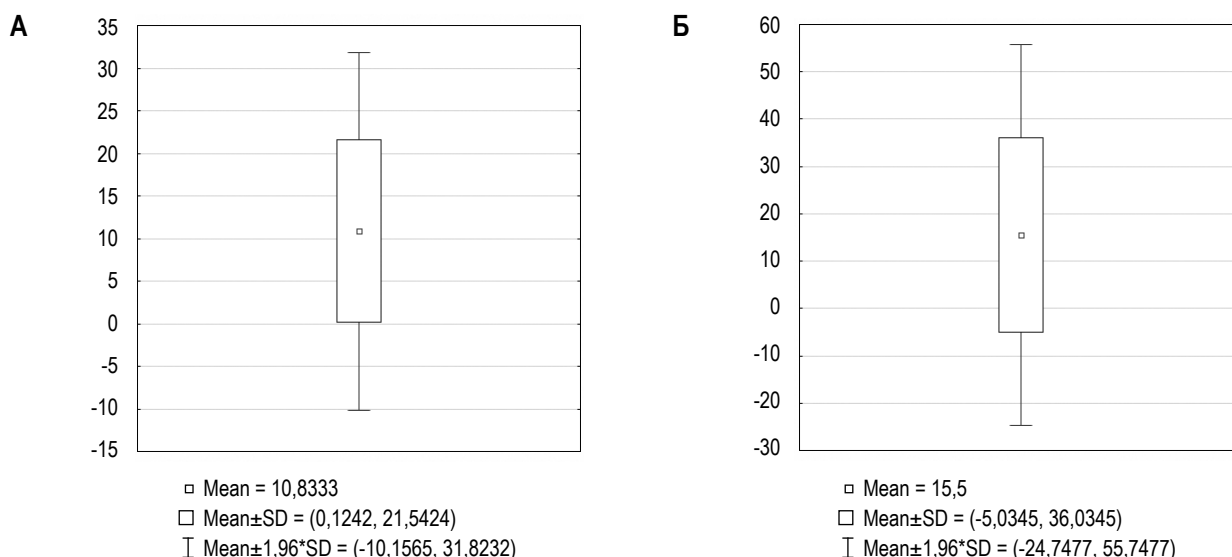


Рисунок 1. Характер экспрессии PD-1 лимфоцитами периферической крови здоровых доноров и пациентов с распространенной меланомой до начала лечения

Примечание. Диаграмма «ящик с усами», характеризующая долю PD-1⁺ клеток среди лимфоцитов пациентов с распространенной меланомой до начала лечения (А) или здоровых доноров (Б).

Figure 1. PD-1 expression by peripheral blood lymphocytes of healthy volunteers and patients with disseminated melanoma before treatment

Note. Box & whisker plot presents proportions of PD-1⁺ cells within lymphocytes (A) of patients with disseminated melanoma before treatment and (B) of healthy volunteers.

пойнтов между здоровыми донорами и пациентами с распространенной меланомой.

Поведение модуляторов иммунного синапса в ходе терапии антителами к PD-1

Данные предварительных исследований показали незначительную конкуренцию между используемыми терапевтическими антителами и антителами детекции к PD-1. Поэтому даже при отсутствии колебаний содержания рецептора его оккупация детектировалась бы нами как некоторое его снижение. У 3 из 4-х пациентов, обследованных как до, так и после курса терапии, не было отмечено статистически достоверных изменений в доле клеток, детектируемых как позитивные по данному иммунному чек-пойнту, но лишь тенденция к подобному снижению. У одного из пациентов было отмечено статистически достоверное снижение доли клеток, детектируемых как позитивные по PD-1 (рис. 2).

Данные по изменению содержания CTLA-4 доступны только для двух пациентов. Достоверных изменений содержания клеток, несущих CTLA-4, не было выявлено у обследованных пациентов (рис. 3).

Влияние терапевтических антител к CTLA-4 и PD-1 на содержание иммунных чек-пойнтов при активации лимфоцитов *in vitro*

Грубым приближением к модели стимуляции иммунного ответа можно считать активацию лимфоцитов *in vitro* в присутствии ФГА. Сочетание ФГА с ингибиторами иммунных чек-пойнтов

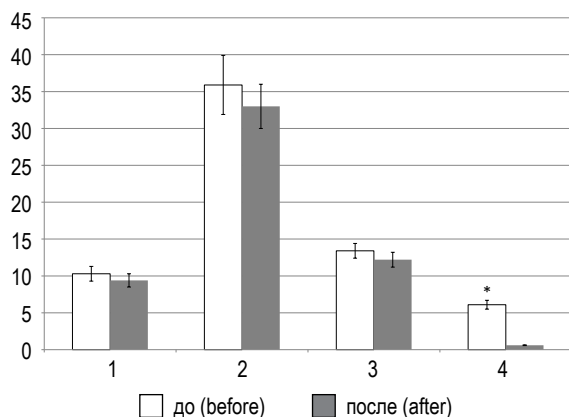


Рисунок 2. Воздействие терапии моноклональными антителами к PD-1 на содержание в периферической крови пациентов лимфоцитов, выявляемых как позитивные по PD-1

Примечание. В качестве планок погрешности использован доверительный интервал. * – статистически достоверное отличие по сравнению с уровнем до терапии при $p < 0,05$.

Figure 2. Effect of anti-PD-1 monoclonal antibody therapy on contents of peripheral blood lymphocytes, which are determined as PD-1-positive

Note. Confidence interval is taken for error bars. *, significant difference from the level before the therapy at $p < 0.05$.

может дать некоторое, очень приближенное представление о возможном их воздействии не на тотальную популяцию лимфоцитов, а конкретно на Т-клетки, отвечающие на антигенную стимуляцию.

Эксперименты показали значительное увеличение содержания рецепторов PD-1 и CTLA-4 в присутствии ФГА в культуре клеток здоровых доноров (рис. 4). Добавление терапевтических антител к PD-1 вело к тому, что доля клеток, выявляемых как позитивные по PD-1, значительно понижалась. Конкуренция между антителами детекции и терапевтическими значительно затрудняет интерпретацию данных. Можно предполагать как оккупацию рецептора терапевтическими антителами и их конкуренцию с антителами детекции, так и реальное снижение доли клеток, несущих PD-1 на поверхности.

Более примечателен следующий факт: присутствие антител к PD-1 во время активации лимфоцитов также существенно препятствовало нарастанию экспрессии рецептора CTLA-4 (рис. 5). Как было отмечено ранее, даже неактивированные лимфоциты в значительной степени содержат внутри клеток рецептор CTLA-4, поэтому мы исследовали именно относительный уровень экспрессии белка по средней интенсивности флуоресценции клеток.

Предварительные эксперименты не показали конкуренции между терапевтическими антителами к CTLA-4, присутствующими во время

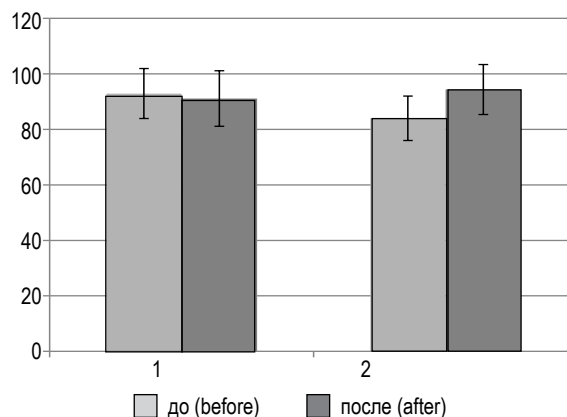


Рисунок 3. Воздействие терапии моноклональными антителами к PD-1 на содержание лимфоцитов, несущих внутри клеток CTLA-4

Примечание. В качестве планок погрешности использован доверительный интервал.

Figure 3. Effect of anti-PD-1 monoclonal antibody therapy on contents of peripheral blood lymphocytes, which express CTLA-4 intracellularly

Note. Confidence interval is taken for error bars.

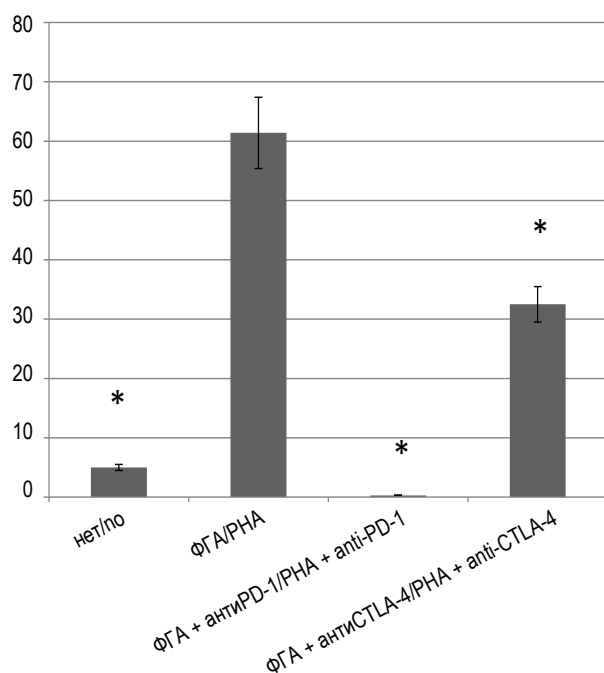


Рисунок 4. Как антитела к PD-1, так и к CTLA-4 препятствуют увеличению содержания Т-клеток, несущих функциональный ингибиторный рецептор PD-1, в популяции МНК здоровых доноров при их активации ФГА *in vitro*

Примечание. В качестве планок погрешности использован доверительный интервал. * – статистически достоверное отличие по сравнению с долей клеток в присутствии только ФГА при $p < 0,05$.

Figure 4. Both anti-PD-1 and anti-CTLA-4 monoclonal antibodies prevent increase of percentages of healthy volunteer peripheral blood T cells, which possess functional PD-1 inhibitory receptor, after activation *in vitro* with PHA

Note. Confidence interval is taken for error bars. *, significant difference from the proportion of cells activated solely with PHA at $p < 0.05$.

активации клеток, с антителами детекции при последующем окрашивании пермебиализированных МНК. Терапевтические антитела к CTLA-4 также препятствовали увеличению содержания лимфоцитов, несущих как собственный рецептор-мишень, так и PD-1, в присутствии ФГА (рис. 4, рис. 5). То есть, отключая негативную регуляцию иммунного ответа через CTLA-4, мы одновременно препятствовали регуловке через другой ингибиторный рецептор, а именно PD-1. Интересно отметить, что из рисунка 5 следует, что антитела к PD-1 имели более выраженный эффект на экспрессию CTLA-4, чем, собственно, антитела к CTLA-4.

Следует отметить, что общая тенденция к снижению содержания обоих функциональных рецепторов чек-пойнтов под воздействием антител лишь к одному из них наблюдалась у всех обследованных доноров. Однако характер воздействия был различным. То есть на кого-то сильнее

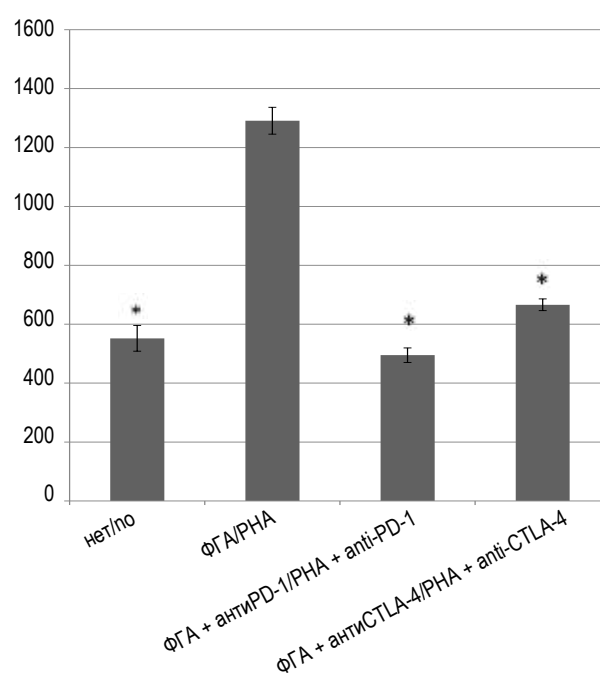


Рисунок 5. Как антитела к CTLA-4, так и к PD-1 препятствуют увеличению уровня экспрессии рецептора CTLA-4 внутри Т-клеток в популяции МНК здоровых доноров при их активации ФГА *in vitro*

Примечание. В качестве планок погрешности использован доверительный интервал. * – статистически достоверное отличие по сравнению с долей клеток в присутствии только ФГА при $p < 0,05$.

Figure 5. Both anti-PD-1 and anti-CTLA-4 monoclonal antibodies prevent increase of CTLA-4-expression level in healthy volunteer peripheral blood T cells after *in vitro* activation with PHA

Note. Confidence interval is taken for error bars. *, significant difference from the proportion of cells activated solely with PHA at $p < 0.05$.

воздействовали антитела к PD-1, на кого-то – к CTLA-4. Наблюдались индивидуальные особенности реакции на терапевтические антитела к иммунным чек-пойнтам.

Аналогичные результаты были получены также для пациента с метастатической меланомой.

Обсуждение

По нашим сведениям мы представляем здесь первые результаты, показавшие перекрестное воздействие терапевтических антител к PD-1 и CTLA-4 на содержание их рецепторов мишеней в клеточной популяции при активации. Отключая одно из негативных звеньев регуляции иммунного ответа при помощи моноклональных антител, мы парадоксальным образом подавляли также и второе. Наблюдение было проведено исключительно в момент активации ФГА в системе *in vitro*. Таким образом, остается открытым вопрос о возможности варьирования ответа при ис-

пользовании других активаторов и его действительности *in vivo*.

Как было показано ранее, длительная терапия ипилимумабом стимулирует экспрессию гена CTLA4 [7], а также несколько стимулирует содержание лимфоцитов, несущих ингибиторный рецептор PD-1 [3, 7]. Таким образом, блокирование рецептора CTLA-4, действительно, ведет к модулированию обеих ингибиторных сигнальных цепей как через CTLA-4, так и через PD-1. Однако авторы, в отличие от нас, наблюдали типичную картину компенсаторных механизмов, часто включающихся в природе при ингибировании какого-либо процесса. Впрочем, следует учитывать, что мы отслеживали рецептор на белковом уровне, причем в момент краткосрочной активации *in vitro*, что, вероятно, объясняет кажущееся противоречие. Исследование первых моментов воздействия ингибиторов иммунных чек-пойнтов на иммунную систему пациентов не проводилось, хотя и с большой вероятностью играет ключевую роль в дальнейшем ответе на терапию.

Исследование Das R. и соавт. показало, что рецептор PD-1 на лимфоцитах периферической крови пациентов оказывался полностью блокированным терапевтическими антителами (ниволумабом) и не взаимодействовал с антителами детекции [7]. Это тоже не соответствует нашим данным, но мы использовали другие антитела детекции, которые конкурируют с ниволумабом крайне слабо. Кроме того, не совпадают точки забора образцов крови.

С точки зрения получения максимального противоопухолевого иммунного ответа со стороны разных звеньев иммунной системы целесообразно комбинировать антитела к модуляторам иммунного синапса PD-1 и CTLA-4, так как таким образом можно достигнуть максимального эффекта как в активации Т-, так и НК-клеточных звеньев противоопухолевого иммунитета [7, 13]. К сожалению, подобная терапия сопровождается и более выраженными аутоиммунными побочными эффектами по сравнению с отдельными блокаторами [14]. Поэтому нам представляется целесообразным проведение активации лимфоцитов в присутствии отдельных терапевтических антител и, в особенности, их комбинации

и активаторов лимфоцитов *in vitro* для последующего адоптивного введения пациентам. Подобный подход, по нашим предположениям, должен значительно снизить негативное побочное действие препаратов терапевтических моноклональных антител, блокирующих CTLA-4 и PD-1. Кроме того, подавление негативных регуляторов иммунного ответа, вероятно, позволит получить препараты более активных форм лимфоцитов с лучшим противоопухолевым действием. Как было показано недавно, блокирующие антитела к CTLA-4 и PD-1 могут оказывать дополнительное активирующее воздействие на противоопухолевую активность CIK (cytokine-induced killer cells – клеток-киллеров, индуцированных цитокинами), действие которых в значительной степени определяется НК [22].

Наши данные позволяют предположить синергизм действия антител к CTLA-4 и к PD-1 в отключении ингибиторных функций в регуляции иммунного ответа в лимфоцитах. Действительно, данные клинических исследований показали, что комбинация блокирующих антител к PD-1 и CTLA-4 имеет эффективность, превосходящую сумму терапевтических воздействий каждого из блокаторов по отдельности [7, 32]. Наше исследование может служить одним из объяснений подобного синергичного действия блокаторов.

Наряду с общими закономерностями в перекрестном ингибировании своих и чужих рецепторов мишеней со стороны терапевтических антител к CTLA-4 и PD-1, мы отметили индивидуальные особенности доноров в отношении чувствительности к различным ингибиторам иммунных чек-пойнтов по степени снижения содержания функциональной формы того или иного рецептора. Зачастую антитела к PD-1 в большей степени подавляли содержание CTLA-4, чем, собственно, антитела к нему. Однако встречалась и противоположная картина, когда более выраженное действие оказывали антитела к CTLA-4. По нашим предположениям, подобный тест *in vitro* может служить предиктором чувствительности иммунной системы отдельного пациента к тому или иному ингибитору иммунных чек-пойнтов и способствовать выбору персонализированного метода лечения.

Список литературы / References

1. Bally A.P., Austin J.W., Boss J.M. Genetic and epigenetic regulation of PD-1 expression. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 6, pp. 2431-2437.
2. Beldi-Ferchiou A., Lambert M., Dogniaux S., Vély F., Vivier E., Olive D., Dupuy S., Levasseur F., Zucman D., Lebbé C., Sène D., Hivroz C., Caillat-Zucman S. PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 45, pp. 72961-72977.
3. Bjoern J., Juul Nitschke N., Zeeberg Iversen T., Schmidt H., Fode K., Svane I.M. Immunological correlates of treatment and response in stage IV malignant melanoma patients treated with Ipilimumab. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 4, e1100788. doi: 10.1080/2162402X.2015.1100788.

4. Buchbinder E., Hodi F.S. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and immune checkpoint blockade. *J. Clin. Invest.*, 2015, Vol. 125, pp. 3377-3383.
5. Chan D.V., Gibson H.M., Aufiero B.M., Wilson A.J., Hafner M.S., Mi Q.S., Wong H.K. Differential CTLA-4 expression in human CD4⁺ versus CD8⁺ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4⁺ proliferation. *Genes Immun.*, 2014, Vol. 15, no. 1, pp. 25-32.
6. Corse E., Allison J.P. Cutting edge: CTLA-4 on effector T cells inhibits in trans. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, pp. 1123-1127.
7. Das R., Verma R., Sznol M., Boddupalli C.S., Gettinger S.N., Kluger H., Callahan M., Wolchok J.D., Halaban R., Dhodapkar M.V., Dhodapkar K.M. Combination therapy with anti-CTLA4 and anti-PD1 leads to distinct immunologic changes *in vivo*. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 3, pp. 950-959.
8. Fallarino F., Fields P.E., Gajewski T.F. B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 188, no. 1, pp. 205-210.
9. Fife B.T., Guleria I., Gubbels Bupp M., Eagar T.N., Tang Q., Bour-Jordan H., Yagita H., Azuma M., Sayegh M.H., Bluestone J.A. Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, pp. 2737-2747.
10. Gibson H.M., Hedgcock C.J., Aufiero B.M., Wilson A.J., Hafner M.S., Tsokos G.C., Wong H.K. Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 6, pp. 3831-3840.
11. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 26, pp. 677-704.
12. Khattry R., Auger J.A., Griffin M.D., Sharpe A.H., Bluestone J.A. Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 162, pp. 5784-5791.
13. Larkin J., Lao C.D., Urba W.J., McDermott D.F., Horak C., Jiang J., Wolchok J.D. Efficacy and safety of nivolumab in patients with BRAF V600Mutant and BRAF wild-type advanced melanoma: pooled analysis of 4 clinical trials. *JAMA Oncol.*, 2015, Vol. 1, no. 4, pp. 433-440.
14. Larkin J., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Grob J.J., Cowey C.L., Lao C.D., Schadendorf D., Dummer R., Smylie M., Rutkowski P., Ferrucci P.F., Hill A., Wagstaff J., Carlino M.S., Haanen J.B., Maio M., Marquez-Rodas I., McArthur G.A., Ascierto P.A., Long G.V., Callahan M.K., Postow M.A. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2015, Vol. 373, no. 1, pp. 23-34.
15. Li X., Wang J., Yao Y., Yang L., Li Z., Yu C., Zhao P., Yu Y., Wang L. Comparative efficacy and safety of immune checkpoint inhibitor-related therapies for advanced melanoma: a Bayesian network analysis. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 48, pp. 83637-83649.
16. Linsley P.S., Bradshaw J., Greene J., Peach R., Bennett K.L., Mittler R.S. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*, 1996, Vol. 4, no. 6, pp. 535-543.
17. Mahoney K.M., Freeman G.J., McDermott D.F. The next immune-checkpoint inhibitors: PD-1/PD-L1 blockade in melanoma. *Clin. Ther.*, 2015, Vol. 37, pp. 764-782.
18. Niezgoda A., Niezgoda P., Czajkowski R. Novel approaches to treatment of advanced melanoma: a review on targeted therapy and immunotherapy. *Biomed. Res. Int.*, 2015, Vol. 2015, 851387. doi: 10.1155/2015/851387.
19. Okazaki T., Tanaka Y., Nishio R., Mitsuiye T., Mizoguchi A., Wang J., Ishida M., Hiai H., Matsumori A., Minato N., Honjo T. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat. Med.*, 2003, Vol. 9, pp. 1477-1483.
20. Pentcheva-Hoang T., Chen L., Pardoll D.M., Allison J.P. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *PNAS*, 2007, Vol. 104, no. 45, pp. 17765-17770.
21. Pianko M.J., Funt S.A., Page D.B., Cattray D., Scott E.C., Ansel S.M.I., Borrello I.M., Gutierrez M., Lendvai N., Hassoun H., Landgren C.O., Lesokhin A.M. Efficacy and toxicity of therapy immediately after treatment with nivolumab in relapsed multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma*, 2018, Vol. 59, no. 1, pp. 221-224.
22. Poh S.L., Linn Y.C. Immune checkpoint inhibitors enhance cytotoxicity of cytokine-induced killer cells against human myeloid leukaemic blasts. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016, Vol. 65, no. 5, pp. 525-536.
23. Qureshi O.S., Zheng Y., Nakamura K., Attridge K., Manzotti C., Schmidt E.M., Baker J., Jeffery L.E., Kaur S., Briggs Z., Hou T.Z., Futter C.E., Anderson G., Walker L.S., Sansom D.M. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*, 2011, Vol. 332, no. 6029, pp. 600-603.
24. Riley J.L., June C.H. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 1, pp. 13-21.
25. Salama A.D., Chitnis T., Imitola J., Ansari M. J., Akiba H., Tushima F., Azuma M., Yagita H., Sayegh M.H., Khoury S.J. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, pp. 71-78.
26. Stojanovic A., Fiegler N., Brunner-Weinzierl M., Cerwenka A. CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK Cell IFN- γ production in response to mature dendritic cells. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 9, pp. 4184-4191.
27. Tivol E.A., Borriello F., Schweitzer A.N., Lynch W.P., Bluestone J.A., Sharpe A.H. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 1995, Vol. 3, pp. 541-547.

28. Walker L.S.K., Sansom D.M. Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 2, pp. 63-70.
29. Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B., Bluestone J.A. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1994, Vol. 1, no. 5, pp. 405-413.
30. Wang C.J., Kenefeck R., Wardzinski L., Attridge K., Manzotti C., Schmidt E.M., Qureshi O.S., Sansom D.M., Walker L.S.K. Cutting edge: cell extrinsic immune regulation by CTLA-4 expressed on conventional T cells. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, pp. 1118-1120.
31. Weber J., Mandala M., del Vecchio M., Gogas H.J., Arance A.M., Cowey C.L., Dalle S., Schenker M., Chiarion-Sileni V., Marquez-Rodas I., Grob J.J., Butler M.O., Middleton M.R., Maio M., Atkinson V., Queirolo P., Gonzalez R., Kudchadkar R.R., Smylie M., Meyer N. Adjuvant nivolumab versus ipilimumab in resected stage III or IV melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2017, Vol. 377, no. 19, pp. 1824-1835.
32. Wolchok J.D., Kluger H., Callahan M.K., Postow M.A., Rizvi N.A., Lesokhin A.M., Segal N.H., Ariyan C.E., Gordon R.A., Reed K., Burke M. M., Caldwell A., Kronenberg S.A., Agunwamba B.U., Zhang X., Lowy I., Inzunza H.D., Feely W., Horak C.E. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2013, Vol. 369, no. 2, pp. 122-133.

Авторы:

Чикилева И.О. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Шубина И.Ж. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Самойленко И.В. — к.м.н., отделение биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Караулов А.В. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФGAOU BO «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Киселевский М.В. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Chikileva I.O., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Cell Immunity, Research Institute of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors, N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Shubina I.Zh., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Cell Immunity, Research Institute of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors, N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Samoylenko I.V., PhD (Medicine), Department of Tumor Biotherapy, N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

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

Kiselevsky M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Cell Immunity, Research Institute of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors, N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Поступила 16.04.2018
Отправлена на доработку 10.05.2018
Принята к печати 21.05.2018

Received 16.04.2018
Revision received 10.05.2018
Accepted 21.05.2018

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА

Барило А.А., Смирнова С.В., Смольникова М.В.

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

Резюме. Псориатический артрит является хроническим системным прогрессирующим воспалительным заболеванием суставов и позвоночника, которое приводит к развитию эрозивного артрита, костной резорбции, множественных энтезитов и спондилоартрита. Тяжелое клиническое течение, резистентность к проводимой терапии, высокая распространенность инвалидизации, увеличение смертности больных обуславливают необходимость дальнейшего изучения заболевания. Псориатический артрит является мультифакториальным заболеванием, иммунопатогенез которого представляет собой сложный процесс взаимодействия клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы. Важнейшим фактором активации пролиферации клеток эпидермиса и синовиальной оболочки при псориатическом артрите является дисбаланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Отмечено, что псориатический процесс имеет особенности клинического течения в зависимости от возраста. Изучение показателей иммунореактивности при псориатическом артрите в различных возрастных группах позволит выявить особенности прогрессирования патологии.

Цель исследования — изучить концентрацию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета и провести сравнительный анализ у больных псориатическим артритом в молодом и зрелом возрасте.

В исследование включены больные псориатическим артритом ($n = 101$), которые на основании возрастной классификации ВОЗ были разделены на 2 группы: 1 группа — в возрасте от 18 до 44 лет ($n = 43$), 2 группа — старше 44 лет ($n = 58$). Контрольные группы (3 и 4 группы) составили практически здоровые люди ($n = 103$), сопоставимые по полу и возрасту с больными. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 (ТОО «Сорбент», Москва, Россия). Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови оценивали микроскопически по поглощению латексных частиц. Концентрации иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG), циркулирующих иммунных комплексов, цитокинов (IL-4, IL-6, IL-10, TNF α) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием прикладных программ Statistica 6.0.

Во всех возрастных группах больных псориатическим артритом установлены общие по отношению к контролю статистически значимые различия: повышенное относительное и абсолютное количество CD3⁺CD16⁺ лимфоцитов в периферической крови, повышенная концентрация ЦИК-C1q, сниженная концентрация IgA, IgM, IgG в сыворотке крови. При анализе основных показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета в группах больных псориатическим артритом в зависимости от возраста выявлены статистически значимые межгрупповые различия. Так, в группе больных псориатическим артритом в молодом возрасте концентрация IL-10 ниже в сравнении с группой больных псориатическим артритом в зрелом возрасте. В группе больных псориатическим артритом в зрелом

Адрес для переписки:

Барило Анна Александровна
Научно-исследовательский институт медицинских
проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел./факс: 8 (391) 228-06-83.
E-mail: annomsk@yandex.ru

Address for correspondence:

Barilo Anna A.
Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zheleznyak str., 3g.
Phone/Fax: 7 (391) 228-06-83.
E-mail: annomsk@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Барило, С.В. Смирнова, М.В. Смольникова
«Показатели иммунитета у больных псориатическим
артритом в зависимости от возраста»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1.
С. 69–76. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-69-76
© Барило А.А. и соавт., 2019

For citation:

A.A. Barilo, S.V. Smirnova, M.V. Smolnikova “Age-dependent
indexes of immunity in the patients with psoriatic arthritis”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 1, pp. 69–76.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-69-76
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-69-76

возрасте фагоцитарное число и концентрация IgG в сыворотке крови статистически значимо ниже в сравнении с группой больных псориазическим артритом в молодом возрасте.

Выявленные изменения в иммунологических показателях при псориазическом артритe в молодом и зрелом возрасте указывают на наличие как общих по отношению к контролю, так и межгрупповых различий. Проведенные ранее нами исследования не выявили статистически значимых межгрупповых различий в иммунологических показателях при псориазическом артритe в молодом и зрелом возрасте, что свидетельствует о наличии иммунных нарушений, связанных с псориазическим процессом, а не с возрастом больных. Однако с увеличением возраста больных псориазическим артритом и формированием тяжелых форм заболевания наблюдаются характерные нарушения иммунологической реактивности и в качестве маркеров прогрессирования псориазической болезни могут служить: повышенная концентрация IL-10 и сниженная концентрация IgG в сыворотке крови, сниженное фагоцитарное число.

Ключевые слова: псориаз, псориазический артрит, псориазическая болезнь, цитокины, иммунопатогенез

AGE-DEPENDENT INDEXES OF IMMUNITY IN THE PATIENTS WITH PSORIATIC ARTHRITIS

Barilo A.A., Smirnova S.V., Smolnikova M.V.

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

Abstract. Psoriatic arthritis is a chronic progressive systemic inflammatory disease of joints and spine, which leads to the development of erosive arthritis, bone resorption, multiple enthesitis and spondylitis. Severe clinical course, resistance to therapy, high prevalence of disability, increased mortality of patients determine a need for further study of the disease. Psoriatic arthritis is a multifactorial disease including immune pathogenic factors representing a complex process of interaction between cellular and humoral components of immune system. The most important way of activating epidermal cells and synovial membrane proliferation in psoriatic arthritis is an imbalance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. It is noted that the features of clinical course in psoriasis are age-dependent. The study of immune response indices in different age groups allows to reveal distinct progression features of the psoriatic pathology.

The purpose of this study was to compare concentrations of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, cellular and humoral immunity, and to conduct a comparative analysis in young and adult patients with psoriatic arthritis.

The study included a group of patients with psoriatic arthritis ($n = 101$) who were divided by their age: group 1, from 18 to 44 years ($n = 43$); group 2, over 44 years ($n = 58$). The control groups (3 and 4) included virtually healthy people ($n = 103$) matched for sex and age with the patients. Populational and subpopulation profiling of blood lymphocytes was performed by flow-cytometry using monoclonal antibodies to CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 (LLC "Sorbent", Moscow, Russia). Phagocytic activity of peripheral blood neutrophils was assessed microscopically by uptake of latex particles. Concentrations of IgA, IgM, and IgG immunoglobulins, circulating immune complexes, cytokines (IL-4, IL-6, IL-10, TNF α) in blood serum was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Statistical evaluation of the results obtained was performed using applied "Statistica 6.0" software.

In all the age subgroups of patients with psoriatic arthritis, we have revealed statistically significant differences against controls, i.e., increased relative and absolute number of CD3⁺CD16⁺ lymphocytes in peripheral blood, higher concentration of CIC-C1q, with decreased concentrations of IgA, IgM, IgG in blood serum. The analysis of the main cellular and humoral indicators of immunity in psoriatic arthritis patients revealed a statistically significant differences for psoriatic arthritis in young and adulthood. E.g., the serum concentration of IL-10 was statistically significantly lower in psoriatic arthritis at a young age in comparison with adult psoriatic arthritis. Phagocytic number and IgG concentration in serum were statistically significantly lower in adults with psoriatic arthritis adulthood than in young patients.

In conclusion, The revealed changes in immunological indices in psoriatic arthritis in young and adult patients indicate to differences against healthy controls, as well as intergroup differences. Previous studies have not revealed statistically any significant differences in immunological parameters between young and adult patients with psoriatic arthritis in, thus suggesting a presence of immune disorders associated with psoriatic pathology, but not with the age of patients. However, changes of immunological reactivity are observed with increasing age of patients with psoriatic arthritis and development of severe clinical forms, and they can be considered as markers of psoriatic disease progression, such as increased concentrations of IL-10 and lower IgG amounts in blood serum, a decreased phagocytic number.

Keywords: psoriasis, psoriatic arthritis, psoriatic disease, cytokines, immunopathogenesis

Введение

Псориаз (ПС) является распространенным хроническим воспалительным заболеванием кожи, популяционная частота которого, по данным различных авторов, составляет 57,6-60,4 случаев на 100 000 населения [20, 23]. Псориаз — системное иммуно-ассоциированное заболевание мультифакториальной природы, характеризующееся гиперпролиферацией и нарушением дифференцировки кератиноцитов [13, 15]. В патологический процесс при ПС вовлекается не только кожа, но и различные органы и системы организма (костно-суставная, нервная, гепатобилиарная, сердечно-сосудистая), что позволяет рассматривать данную патологию как полисистемное заболевание — так называемая псориатическая болезнь [5].

На сегодняшний день одной из самых актуальных проблем современной дерматологии является псориатический артрит. Псориатический артрит (ПсА) — хроническое системное прогрессирующее воспалительное заболевание суставов и позвоночника, которое приводит к развитию эрозивного артрита, костной резорбции, множественных энтезисов и спондилоартрита [16, 18]. Отсутствие своевременного лечения у больных ПсА приводит к необратимому поражению суставов, ведущему к инвалидизации [9]. Кроме того, отмечено, что при ПсА увеличена смертность больных в сравнении с популяционной: у мужчин на 59% и у женщин на 65% [13, 22]. Тяжелое клиническое течение, резистентность к проводимой терапии, высокая распространенность инвалидизации, увеличение смертности больных ПсА обуславливают необходимость дальнейшего изучения патологии, в том числе с позиций иммунопатогенеза заболевания [13, 18, 22].

Псориатический артрит является мультифакториальным заболеванием, иммунопатогенез которого представляет собой сложный процесс взаимодействия клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы. Доказана приоритетная роль иммунных нарушений с активацией клеточного звена иммунитета при ПсА [6, 13]. Активация Т-лимфоцитов в коже при ПсА сопровождается выбросом различных цитокинов, приводящих к гиперпролиферации и нарушению дифференцировки клеток эпидермиса и синовиальной оболочки. Важнейшим фактором активации пролиферации клеток эпидермиса и синовиальной оболочки при ПсА является дисбаланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [13, 18]. Псориатическая болезнь является моделью Th1- и Th17-опосредованного аутоиммунного заболевания, при котором активация Th1- и Th17-лимфоцитов является одним из ключевых моментов его патогенеза [13]. Т-лимфоциты на фоне стимуляции кератиноцитами продуцируют провоспалительные цитоки-

ны Th1-профиля (IFN γ , TNF α , IL-2, IL-8, IL-17, IL-23), которые приводят к гиперпролиферации и нарушению дифференцировки кератиноцитов эпидермиса и клеток синовиальной оболочки. Преобладание TNF α , IL-2 в сыворотке крови способствует угнетению Th2-иммунного ответа наряду с низкой концентрацией противовоспалительных цитокинов Th2-профиля (IL-4, IL-10) [12, 15]. В результате девиации иммунного ответа в сторону Th1-клеток, псориаз и псориатический артрит относят к «Th1-зависимым заболеваниям» [10]. Однако в литературе описаны примеры повышения концентрации цитокинов Th2-профиля в сыворотке крови при тяжелых формах заболевания, таких как псориатическая эритродермия и пустулезный генерализованный псориаз [23]. Отмечено, что псориатический процесс имеет особенности клинического течения в зависимости от возраста [21]. Значительный интерес представляет изучение показателей иммунореактивности при ПсА в различных возрастных группах, что позволит выявить особенности прогрессирования патологии.

Цель исследования — изучить концентрацию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета и провести сравнительный анализ у больных псориатическим артритом в молодом и зрелом возрасте.

Материалы и методы

Обследованы больные псориатическим артритом ($n = 101$), которые, на основании классификации ВОЗ, были разделены по возрасту на 2 группы: 1 группа — ПсА в молодом возрасте от 18 до 44 лет ($n = 43$), 2 группа — ПсА в зрелом возрасте старше 44 лет ($n = 58$). Средний возраст больных псориатическим артритом в 1 группе составил $34,0 \pm 1,2$ года, во 2 группе — $55,0 \pm 0,7$ лет. Контрольную группу составили практически здоровые люди ($n = 103$), сопоставимые по полу и возрасту с больными. Контроль с учетом возраста был разделен на две группы: 3 группа — до 44 лет ($n = 84$), 4 группа — старше 44 лет ($n = 19$). Средний возраст в 3 группе составил $29,0 \pm 0,7$ лет, в 4 группе — $52,0 \pm 1,2$ года. Исследования одобрены на заседании этического комитета НИИ медицинских проблем Севера обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН (НИИ МПС). Протокол обследования больных и практически здоровых людей соответствовал этическим стандартам и был разрешен комитетом по биомедицинской этике НИИ МПС (Протокол № 12 от 10.12.2013 г.). Право на проведение обследования юридически закреплялось информированным согласием пациента.

Критерии включения больных в исследование: наличие клинически подтвержденного псориатического артрита, информированного со-

гласия на участие в исследовании, возраст от 18 до 66 лет. Критерии исключения из исследования: наличие сопутствующих декомпенсированных заболеваний, обострение сопутствующих хронических заболеваний, указание в анамнезе на терапию цитостатиками и системными глюкокортикостероидами, наличие доброкачественных и злокачественных опухолей, сахарного диабета, системных и психических заболеваний, беременность и лактация, алкоголизм и/или наркомания. Больные псориазическим артритом обследованы в прогрессирующую стадию псориаза до начала проведения симптоматической и патогенетической терапии. Степень тяжести псориаза и распространенность кожного процесса оценивалась по индексу PASI (Psoriasis Area and Severity Index). Среднее значение индекса PASI в 1 группе составило 18,7 усл. ед. (9,6; 26,4), во 2 группе — 17,8 усл. ед. (16,2; 23,1). Диагноз псориазического артрита устанавливался на основании классификационных критериев CASPAR (Classification Criteria for Psoriatic Arthritis).

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови определяли методом проточной цитофлуориметрии на проточном 5-параметровом цитометре Cytomics™ FC 500 (США) с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 (ОО «Сорбент», Москва, Россия). Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови изучали микроскопически по поглощению латексных частиц. Концентрацию иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG), цитокинов (IL-4, IL-6, IL-10, TNFα) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем АО «Вектор-Бест», (г. Новосибирск, Россия). Исследование циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем DIA.METRA CIC-C1 и CIC-C3D (Италия). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью прикладных программ Statistica 6.0. Полученные результаты представлены в виде: Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Для всех видов статистического анализа различия считались статистически значимыми при достигнутом уровне $p < 0,05$.

Результаты

Дебют псориазического артрита рассматривается как важный показатель заболеваемости. Так, возраст дебюта заболевания у обследованных больных варьировал от 4 до 57 лет. Средний возраст дебюта появления псориазических элементов на коже в 1 группе больных псориазическим артритом составил $20,0 \pm 1,3$ лет, во 2 группе — $32,0 \pm 1,9$ года. Средний возраст дебюта суставного синдрома в 1 группе больных — $31,0 \pm 1,5$ год,

во 2 группе — $40,0 \pm 1,6$ лет. Средняя продолжительность заболевания в 1 группе составила $10 \pm 1,2$ лет, во 2 группе — $22 \pm 1,9$ года.

При сравнительном анализе количественных характеристик Т-лимфоцитов в периферической крови, концентрации IgA, IgM, IgG, ЦИК-C1q в сыворотке крови в группах больных различных возрастных периодов установлены общие по отношению к контролю статистически значимые различия. Так, относительное и абсолютное количество CD3-CD16⁺ клеток периферической крови больных ПсА в обеих возрастных группах статистически значимо выше в сравнении с контрольной группой (табл. 1).

В ходе исследования было определено, что в группах больных ПсА независимо от возраста отмечена статистически значимо высокая концентрация ЦИК-C1q в сыворотке крови в сравнении с контрольной группой.

Существенные изменения отмечались в гуморальном звене иммунитета. Концентрация IgA, IgM, IgG была статистически значимо ниже в обеих возрастных группах больных ПсА в сравнении с контрольной группой.

При изучении концентрации цитокинов TNFα, IL-4, IL-6, IL-10 в сыворотке крови установлена статистически значимо высокая концентрация IL-6 у больных псориазическим артритом всех возрастных групп.

Установлено, что количество фагоцитирующих нейтрофилов статистически значимо выше в 1 группе больных ПсА в сравнении с контрольной группой.

Концентрация ЦИК, связанных с C3d и вызывающих на активацию комплемента, как по классическому, так и по альтернативному пути, статистически значимо выше в сыворотке крови больных 1 группы в сравнении с контрольной группой.

В группе больных ПсА в возрасте от 18 до 44 лет (1 группа) концентрация IL-4 в сыворотке крови статистически значимо выше, а IL-10 статистически значимо ниже в сравнении с контрольной группой.

Анализ основных иммунологических показателей у больных ПсА в зрелом возрасте выявил ряд различий в сравнении с контрольной группой. Так, относительное содержание CD3⁺ лимфоцитов в сыворотке крови больных ПсА старше 44 лет статистически значимо выше в сравнении с контрольной группой, однако по абсолютному содержанию данных клеток значения статистической достоверности не достигли.

Выявлено, что относительное и абсолютное количество CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в периферической крови статистически значимо выше во 2 группе больных ПсА в сравнении с контрольной группой.

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. IMMUNOLOGICAL INDICATORS IN PSORIATIC ARTHRITIS PATIENTS IN VARIOUS AGE GROUPS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	ПсА (1) PsA (n = 43)	ПсА (2) PsA (n = 58)	Контроль (3) Control (n = 84)	Контроль (4) Control (n = 76)	p
CD3 ⁺ , %	77,0 (70,0-81,0)	75,0 (74,0-80,0)	75,6 (69,4-79,4)	68,0 (64,6-73,3)	p _{2,4} = 0,01
CD3⁺, кл/мкл CD3 ⁺ , cells/mkl	1298 (918-1833)	1397 (1134-1581)	1438 (1174-1619)	1197 (1006-1392)	—
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	43,0 (36,0-49,0)	44,0 (39,0-48,0)	43,9 (36,3-48,8)	36,7 (34,0-51,2)	—
CD3⁺CD4⁺, кл/мкл CD3 ⁺ CD4 ⁺ , cells/mkl	732 (504-968)	789 (680-916)	861 (659-1034)	700 (602-798)	—
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	30,0 (23,0-33,0)	29,0 (25,0-34,0)	29,2 (22,6-34,7)	21,8 (17,1-26,0)	p _{2,4} = 0,007
CD3⁺CD8⁺, кл/мкл CD3 ⁺ CD8 ⁺ , cells/mkl	528 (459-610)	546 (477-632)	482 (411-634)	314 (266-510)	p _{2,4} = 0,004
CD3 ⁺ CD16 ⁺ , %	9,0 (7,0-13,0)	9,0 (7,0-12,0)	4,7 (2,4-7,7)	4,2 (1,4-9,3)	p _{1,3} < 0,001 p _{2,4} = 0,02
CD3⁺CD16⁺, кл/мкл CD3 ⁺ CD16 ⁺ , cells/mkl	169 (114-248)	151 (124-197)	98 (45-134)	78 (24-191)	p _{1,3} < 0,001 p _{2,4} = 0,005
CD3 ⁺ CD19 ⁺ , %	11,0 (7,0-13,0)	13,0 (9,0-15,0)	11,9 (8,5-15,4)	13,7 (9,6-15,9)	—
CD3⁺CD19⁺, кл/мкл CD3 ⁺ CD19 ⁺ , cells/mkl	206 (154-232)	225 (197-247)	215 (139-273)	213 (167-229)	—
Иммунорегуляторный индекс, CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ ratio	1,4 (1,1-2,0)	1,4 (1,2-1,9)	1,6 (1,1-2,2)	1,8 (1,9-2,9)	—
Количество фагоцитирующих нейтрофилов, % Phagocyte percentage of neutrophils, %	40,0 (36,0-46,0)	46,0 (38,0-56,0)	32,0 (29,0-35,0)	40,0 (35,5-41,5)	p _{1,3} < 0,001
Фагоцитарное число Phagocyte number	5,0 (4,4-6,0)	4,5 (3,9-5,0)	5,5 (4,9-5,9)	5,4 (5,1-5,9)	p _{2,4} < 0,001 p _{1,2} = 0,02
IgA, г/л IgA, g/l	1,8 (1,3-2,3)	2,0 (1,7-2,5)	2,9 (1,7-3,8)	3,1 (1,8-3,9)	p _{1,3} = 0,004 p _{2,4} = 0,003
IgM, г/л IgM, g/l	1,3 (0,8-1,8)	0,9 (0,4-1,4)	3,3 (2,0-3,6)	3,4 (3,3-4,8)	p _{1,3} < 0,001 p _{2,4} < 0,001
IgG, г/л IgG, g/l	11,8 (9,8-13,5)	9,6 (6,1-10,6)	24,7 (10,6-33,1)	26,2 (20,5-34,0)	p _{1,3} = 0,002 p _{2,4} < 0,001 p _{1,2} = 0,003
ЦИК-C1q, мгIgG/мл Circulating immune complexes-C1q, mgIgG/ml	1,9 (1,5-3,3)	2,0 (1,5-2,8)	1,5 (1,3-1,8)	1,7 (1,5-1,8)	p _{1,3} = 0,002 p _{2,4} = 0,01
ЦИК-C3d, мгIgG/мл Circulating immune complexes-C3d, mgIgG/ml	29,2 (21,3-42,4)	21,8 (13,9-36,2)	18,4 (15,0-21,6)	20,4 (18,1-23,0)	p _{1,3} < 0,001
TNFα, пг/мл TNFα, pg/ml	16,7 (7,6-27,8)	14,6 (8,3-26,5)	8,8 (3,5-24,6)	7,8 (3,4-28,2)	—
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	5,3 (4,3-7,6)	5,5 (2,4-13,3)	3,7 (1,5-7,8)	4,5 (1,7-8,6)	p _{1,3} = 0,02
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	4,0 (3,1-4,9)	3,4 (2,6-4,4)	1,6 (0,2-3,7)	1,0 (0,0-1,4)	p _{1,3} < 0,001 p _{2,4} < 0,001
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	1,1 (0,0-1,8)	1,9 (0,0-2,7)	2,0 (0,6-4,6)	1,9 (1,3-3,1)	p _{1,3} = 0,003 p _{1,2} = 0,03

Примечание. Достоверность различий (p) – критерий Манна–Уитни. Значения p указаны только при p < 0,05.

Note. Significance of differences (p), Mann–Whitney test. p-value is indicated only if p < 0.05.

В группе больных ПсА в зрелом возрасте фагоцитарное число статистически значимо ниже в сравнении с контрольной группой.

При сравнении основных иммунологических показателей клеточного звена иммунитета и цитокинового профиля в группах больных ПсА в зрелом возрасте относительно контроля не выявлено статистически значимых различий относительного и абсолютного количества $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD19^+$ лимфоцитов, концентрации $TNF\alpha$.

При анализе основных показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета в группах больных ПсА в зависимости от возраста выявлены статистически значимые межгрупповые различия. Так, с увеличением возраста больных ПсА определено увеличение концентрации $IL-10$ в сыворотке крови. В группе больных ПсА в зрелом возрасте фагоцитарное число и концентрация IgG в сыворотке крови статистически значимо ниже в сравнении с группой больных ПсА в молодом возрасте и группой контроля.

Обсуждение

Проведенные нами исследования подтверждают роль дисбаланса цитокинового профиля, изменений клеточного и гуморального звеньев иммунитета в иммунопатогенезе псориатического артрита. Однако при сравнительном анализе количественных характеристик иммунологических показателей у больных ПсА различных возрастных периодов определяются преимущественно общие по отношению к контрольной группе статистически значимые различия.

Так, общими чертами иммунологических изменений при ПсА всех возрастных групп является увеличение содержания $CD3^+CD16^+$ лимфоцитов в периферической крови относительно контрольной группы. Повышенное количество $CD3^+CD16^+$ лимфоцитов, которые оказывают цитотоксическое действие на клетки-мишени, ускоряют процессы апоптоза, дифференцировки и пролиферации синовиальных клеток и кератиноцитов, при ПсА отражает неспецифическую клеточную резистентность с формированием аутоиммунного воспаления с преобладанием $Th1$ -зависимых цитотоксических механизмов в патогенезе заболевания [7, 12].

Также для псориатического артрита вне зависимости от возраста установлена сниженная концентрация IgA , IgM , IgG в сыворотке, которая может свидетельствовать об угнетении гуморального звена иммунитета либо является следствием депонирования иммуноглобулинов в составе ЦИК в пораженных псориатическим процессом тканях кожи и суставов [4].

Важную роль иммунных нарушений в патогенезе псориатической болезни подтверждает наличие повышенной концентрации циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови.

ЦИК, фиксируясь в стенках сосудов, приводят к нарушению крово- и лимфообращения в сосудах микроциркуляторного русла с развитием характерного для псориатического артрита повреждения опорно-двигательного аппарата в результате активации комплемента. При изучении уровня ЦИК во всех возрастных группах больных ПсА выявлена статистически значимо повышенная концентрация ЦИК- $C1q$ в сыворотке крови относительно контрольной группы, что свидетельствует об активации комплемента по классическому пути [2].

Общим изменением цитокинового профиля при псориатическом артрите вне зависимости от возраста является повышенная концентрация $IL-6$ в сыворотке крови в сравнении с контрольной группой, что подтверждает важную роль воспалительного процесса в формировании псориатических очагов повреждения кожи и суставов [8]. В патогенезе псориатического артрита $IL-6$ способствует костной резорбции, дегенерации суставного хряща и развитию синовита и отражает участие данного цитокина в механизмах пролиферативного воспаления в суставах в результате стимуляции митотической активности Т-лимфоцитов и кератиноцитов [19].

Определены статистически значимые различия в иммунологических показателях у больных ПсА в молодом возрасте в сравнении с контрольной группой: повышенное количество фагоцитирующих нейтрофилов в периферической крови, повышенная концентрация $IL-4$ и ЦИК- $C3d$ в сыворотке крови. Повышенное количество фагоцитирующих нейтрофилов в периферической крови у больных ПсА в молодом возрасте свидетельствует об увеличении функциональной активности фагоцитов и подтверждает важную роль моноцитарно-макрофагальной системы в процессе инициации псориатической болезни, а также может быть следствием увеличения концентрации ЦИК- $C3d$ в сыворотке крови [17]. Являясь важным компонентом $Th2$ -иммунного ответа, $IL-4$ в патогенезе Пс и ПсА ингибирует экспрессию $TNF\alpha$ и $IFN\gamma$ кератиноцитами [12]. Есть данные, что повышение концентрации $IL-4$ приводит к развитию тяжелой формы заболевания — псориатической эритродермии — и коррелирует с уровнем лейкоцитов и С-реактивного белка в сыворотке, а также тяжестью патологического процесса [23]. Повышенная концентрация $IL-4$ при ПсА в молодом возрасте, обладающего противовоспалительными свойствами, может являться отражением его протективной роли в отношении прогрессирования патологии. Высокая концентрация $IL-4$, вероятно, способствует стимуляции продукции иммуноглобулинов с формированием иммунных комплексов, отложение которых в тканях опорно-двигательного аппарата способствует костно-деструктивным изменениям в суставах при ПсА в молодом возрасте [11].

Повышенная концентрация ЦИК-С3d в сыворотке крови у больных ПсА в молодом возрасте отражает активацию комплемента, как по классическому, так и по альтернативному пути в иммунопатогенезе заболевания [2, 3]. Повышенная концентрация ЦИК-С3d при ПсА в молодом возрасте, вероятно, связана с развитием патологического «иммунокомплексного» синдрома, способствующего раннему повреждению опорно-двигательного аппарата.

Псориатический артрит в зрелом возрасте относительно контрольной группы характеризуется повышенным содержанием $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов в периферической крови, которое может свидетельствовать о преобладании цитотоксических иммунных механизмов псориатического повреждения кожи и суставов в данной возрастной группе больных [6, 12, 23]. Кроме того, снижение фагоцитарного числа у больных ПсА в зрелом возрасте может быть связано с наличием приобретенного иммунодефицита, для которого характерно истощение иммунологических резервов организма [3]. Отсутствие повышенной концентрации ЦИК-С3d в сыворотке крови больных псориатическим артритом в зрелом возрасте может свидетельствовать о преобладании клеточных механизмов повреждения либо является следствием депонирования иммунных комплексов в органах-мишенях в процессе прогрессирования патологии.

Следует отметить, что в результате проведенных нами исследований статистически значимые межгрупповые различия у больных псориатическим артритом в молодом и зрелом возрасте выявлены лишь по некоторым иммунологическим показателям. Так, фагоцитарное число и концентрация IgG в сыворотке крови статистически значимо ниже в группе больных ПсА в зрелом возрасте в сравнении с группой больных ПсА в молодом возрасте, что может быть связано с хроническим

длительным рецидивирующим течением заболевания. IL-10 оказывает супрессивное воздействие на макрофаги и цитотоксические лимфоциты, что приводит к торможению гиперпролиферации кератиноцитов и клеток синовиальной оболочки. Дефицит IL-10 при ПсА способствует запуску ауторегулируемого процесса поляризации Th0-клеток в сторону Th2-лимфоцитов, что стимулирует аутоиммунные механизмы формирования воспалительных процессов в коже и суставах [14]. Увеличение концентрации IL-10 в сыворотке крови при ПсА в зрелом возрасте может быть обусловлено его противовоспалительным и иммуносупрессивным действием в ответ на активный воспалительный процесс. Дефицит IL-10 в сыворотке крови при ПсА в молодом возрасте может играть важную роль в формировании дебюта псориатического повреждения кожи и суставов [6, 14].

Таким образом, выявленные изменения в иммунологических показателях при псориатическом артрите в молодом и зрелом возрасте указывают на наличие как общих по отношению к контролю, так и межгрупповых различий. Проведенные нами ранее исследования не выявили статистически значимых межгрупповых различий в иммунологических показателях при псориазе в молодом и зрелом возрасте, что свидетельствует о наличии иммунных нарушений, связанных с псориатическим процессом, а не с возрастом больных [1]. Однако с увеличением возраста больных псориазом и формированием тяжелых форм заболевания, в частности псориатического артрита, наблюдаются характерные нарушения иммунологической реактивности, и в качестве маркеров прогрессирования псориатической болезни могут служить: повышенная концентрация IL-10 и сниженная концентрация IgG в сыворотке крови, сниженное фагоцитарное число.

Список литературы / References

1. Барило А.А., Смирнова С.В., Смольникова М.В. Иммунологические показатели больных псориазом в различные возрастные периоды // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 4. С. 680-681. [Barilo A.A., Smirnova S.V., Smolnikova M.V. Immunological indicators of patients with psoriasis in different age groups. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 4, pp. 680-681. (In Russ.)]
2. Байтяков В.В., Новикова Л.В. Характеристика иммунных нарушений у больных распространенным псориазом в периоде обострения // Казанский медицинский журнал, 2011. Т. 92, № 6. С. 807-813. [Baytiakov V.V., Novikova L.V. Characteristics of immune disorders in patients with generalized psoriasis during exacerbation period. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2011, Vol. 92, no. 6, pp. 807-813. (In Russ.)]
3. Бoleвич С.Б., Уразалина А.А. Псориаз: современный взгляд на этиопатогенез // Вестник российской военно-медицинской академии, 2013. Т. 2, № 42. С. 202-206. [Bolevich S.B., Urazalina A.A. Psoriasis: modern view at aetiopathogenesis. *Vestnik rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii = Bulletin of Russian Military Medical Academy*, 2013, Vol. 2, no. 42, pp. 202-206. (In Russ.)]
4. Борисов А.Г., Савченко А.А., Смирнова С.В. К вопросу о классификации нарушений функционального состояния иммунной системы // Сибирский медицинский журнал, 2008. Т. 23, № 3-1. С. 13-18. [Borisov A.G., Savchenko A.A., Smirnova S.V. On classification of immune system functional status injuries. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2008, Vol. 23, no. 3-1, pp. 13-18. (In Russ.)]
5. Смирнова С.В., Барило А.А., Смольникова М.В. Заболевания гепатобилиарной системы как предикторы прогрессирования псориаза // Вестник РАМН, 2016. № 2. С. 102-108. [Smirnova S.V., Barilo A.A.,

Smolnikova M.V. Hepatobiliary system diseases as the predictors of psoriasis progression. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2016, no. 2, pp. 102-108. (In Russ.)]

6. Смирнова С.В., Смольникова М.В. Иммунопатогенез псориаза и псориатического артрита // Медицинская иммунология, 2014. № 2. С. 127-138. [Smirnova S.V., Smolnikova M.V. Immunopatogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, no. 2, pp. 127-138. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2014-2-127-138.

7. Хайдуков С.В., Байдун Л.В. Современные подходы к оценке клеточной составляющей иммунного статуса // Медицинский алфавит, 2015. Т. 2, № 8. С. 44-51. [Khaydukov S.V., Baydun L.V. Modern approach to assessing cellular constituents immune status. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2015, Vol. 2, no. 8, pp. 44-51. (In Russ.)]

8. Bogliolo L., Crepaldi G., Caporali R. Biomarkers and prognostic stratification in psoriatic arthritis. *Reumatismo*, 2012, Vol. 64, no. 2, pp. 88-98.

9. Chandran V., Raychaudhuri S.P. Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. *J. Autoimmun.*, 2010, Vol. 34, pp. 314-321.

10. Diani M., Altomare G., Reali E. T cell responses in psoriasis and psoriatic arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 2015, pp. 1568-1572.

11. Finnegan A., Mikecz K., Tao P., Glant T.T. Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 163, pp. 5383-5390.

12. González S., Queiro R., Ballina J. Update in the pathogenesis of psoriatic arthritis. *Reumatol. Clin.*, 2012, Vol. 1, pp. 1-6.

13. Hueber A.J., Manger B. New aspects on the pathogenesis of psoriatic arthritis. *Z. Rheumatol.*, 2013, Vol. 72, no. 8, pp. 758-763.

14. Karam R.A., Zidan H.E., Khater M.H. Polymorphisms in the TNF- α and IL-10 gene promoters and risk of psoriasis and correlation with disease severity. *Cytokine*, 2014, Vol. 66, no. 2, pp. 101-115.

15. Lima E.A., Lima M.A. Reviewing concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. *An. Bras. Dermatol.*, 2011, Vol. 86, no. 6, pp. 1151-1158.

16. Liu J.T., Yeh H.M., Liu S.Y., Chen K.T. Psoriatic arthritis: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *World. J. Orthop.*, 2014, Vol. 5, no. 4, pp. 537-543.

17. Lorthois I., Asselineau D., Seyler N., Pouliot R. Contribution of in vivo and organotypic 3D models to understanding the role of macrophages and neutrophils in the pathogenesis of psoriasis. *Mediators Inflamm.*, 2017, 7215072. doi: 10.1155/2017/7215072.

18. McInnes I.B., Siebert S. Psoriatic arthritis – expanding options, exciting times? *Acta. Reumatol. Port.*, 2014, Vol. 39, no. 4, pp. 294-295.

19. Mease P.J. Measures of psoriatic arthritis. *Arthritis Care Res.*, 2011, Vol. 63, no. 11, pp. 64-85.

20. Raychaudhuri S.P. A cutting edge overview: psoriatic disease. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.*, 2013, Vol. 44, no. 2, pp. 109-113.

21. Trettel A., Spehr C., Körber A., Augustin M. The impact of age on psoriasis health care in Germany. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2017, Vol. 31, no. 5, pp. 870-875.

22. Wong K., Gladman D.D., Husted J., Long J.A., Farewell V.T. Mortality studies in psoriatic arthritis: results from a single outpatient clinic. I. Causes and risk of death. *Arthritis Rheum.*, 1997, Vol. 40, no. 10, pp. 1868-1872.

23. Zhang P., Chen H.X., Duan Y.Q., Wang W.Z., Zhang T.Z., Li J.W., Tu Y.T. Analysis of Th1/Th2 response pattern for erythrodermic psoriasis. *J. Huazhong. Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.*, 2014, Vol. 34, no. 4, pp. 596-601.

Авторы:

Барило А.А. — к.м.н., ординатор 2 года обучения, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Смирнова С.В. — д.м.н., профессор, руководитель научного направления, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Смольникова М.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Authors:

Barilo A.A., PhD (Medicine), Clinical Resident, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Smirnova S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of a Scientific Direction, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Smolnikova M.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 26.01.2018
Принята к печати 07.02.2018

Received 26.01.2018
Accepted 07.02.2018

ЗАВИСИМОСТЬ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА НЕЙТРОФИЛОВ ОТ СОСТОЯНИЯ ИХ МЕТАБОЛИЗМА У БОЛЬНЫХ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ ОСТРОГО ДЕСТРУКТИВНОГО ПАНКРЕАТИТА

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

¹ Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение
ФГБНУ Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения
Российской академии наук“, г. Красноярск, Россия

² ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

³ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-
Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение зависимости состояния респираторного взрыва нейтрофилов от активности их внутриклеточных ферментов у больных с разной степенью тяжести острого деструктивного панкреатита (ОДП). Обследовано 50 больных ОДП средней (17 пациентов) и тяжелой (33 пациента) степени тяжести. В качестве контроля обследовано 47 здоровых людей. Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа. Исследование активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови проведено с помощью биoluminesцентного анализа. Установлено, что независимо от степени тяжести заболевания выявляется снижение спонтанного и индуцированного синтеза нейтрофилами супероксид-радикала. У больных с тяжелой степенью ОДП также нарушена кинетика синтеза первичных АФК. У больных со средней степенью тяжести повышается уровень синтеза нейтрофилами вторичных АФК, тогда как при тяжелой степени заболевания наблюдаются нарушения в кинетике синтеза вторичных АФК нейтрофилами, находящихся в состоянии относительного покоя, и повышение уровня синтеза при дополнительной индукции зимозаном. Метаболизм нейтрофилов у больных ОДП характеризуется активацией пластических процессов (за счет продуктов пентозофосфатного цикла) и аэробной энергетики (повышение интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот). Однако у больных со средней степенью тяжести нейтрофильный пул NADPH дополнительно поддерживается ферментативными реакциями малик-фермента и NADP-зависимой глутаматдегидрогеназой. У больных с тяжелой степенью ОДП выявляется активация перекисных процессов, для компенсации которых требуется NADPH. Состояние энергетических процессов в нейтрофилах крови у больных ОДП характеризуется отсутствием изменений активности гликолиза и увеличением интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот. У больных со средней степенью тяжести заболевания активность аэробных процессов поддерживается продуктами аминокис-

Адрес для переписки:

Савченко Андрей Анатольевич
Научно-исследовательский институт медицинских
проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел./факс: 8 (391) 228-06-33.
E-mail: aasavchenko@yandex.ru

Address for correspondence:

Savchenko Andrei A.
Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zheleznyak str., 3g.
Phone/Fax: 7 (391) 228-06-33.
E-mail: aasavchenko@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Савченко, А.Г. Борисов, Д.Э. Здзитовецкий,
А.Ю. Медведев, И.И. Гвоздев «Зависимость
респираторного взрыва нейтрофилов от состояния их
метаболизма у больных с разной степенью тяжести
острого деструктивного панкреатита» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 77-88.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-77-88

© Савченко А.А. и соавт., 2019

For citation:

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, D.E. Zdzitovetskiy,
A.Yu. Medvedev, I.I. Gvozdev "Dependence of neutrophil
respiratory burst on their metabolic state in the patients with acute
destructive pancreatitis of different severity", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 1,
pp. 77-88. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-77-88

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-77-88

лотного обмена (через глутаматдегидрогеназы), тогда как при тяжелой степени ОДП – продуктами липидного катаболизма. С помощью корреляционного анализа исследована зависимость респираторного взрыва нейтрофилов от состояния их метаболизма. Установлено, что у лиц контрольной группы интенсивность и кинетика респираторного взрыва нейтрофилов зависит только от активности NADP-зависимых дегидрогеназ. У больных со средней степенью тяжести ОДП изменение активности внутриклеточных метаболических процессов привело к нарушению их регуляторного влияния на состояние респираторного взрыва нейтрофилов. У пациентов с тяжелой степенью заболевания респираторный взрыв нейтрофилов стимулируется реакциями восстановительного аминирования α -кетоглутарата, но ингибируется внутриклеточными перекисными процессами.

Ключевые слова: панкреатит, степень тяжести, нейтрофилы, функция, респираторный взрыв, хемилюминесценция, активные формы кислорода, метаболизм, активность ферментов

DEPENDENCE OF NEUTROPHIL RESPIRATORY BURST ON THEIR METABOLIC STATE IN THE PATIENTS WITH ACUTE DESTRUCTIVE PANCREATITIS OF DIFFERENT SEVERITY

Savchenko A.A.^{a, b}, Borisov A.G.^{a, c}, Zdzitovetskiy D.E.^c, Medvedev A.Yu.^a, Gvozdev I.I.^a

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

^b Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Abstract. The aim of the study was to investigate a dependence of respiratory burst state in neutrophils on activities of their intracellular enzymes in patients with acute destructive pancreatitis (ADP) of different severity. The study included 50 patients with ADP of moderate (17 cases) and severe degree (33 cases). A group of 47 healthy people was examined as controls. The respiratory burst state was examined in neutrophilic granulocytes by means of chemiluminescence assays. A study of NAD(P)-dependent dehydrogenases activity in blood neutrophils was performed using bioluminescent analysis. We have revealed that a decrease in spontaneous and induced synthesis of superoxide radical by neutrophils was detected in ADP patients, independently of the disease severity. Kinetics of primary ROS synthesis was also impaired in patients with severe ADP. In patients with moderate disorder, the level of secondary ROS synthesis by neutrophils proved to be increased, whereas, in cases of severe disease, a disturbed kinetics of secondary ROS synthesis by neutrophils was detected at a resting state, showing increased synthetic level upon additional induction by zymosan. Metabolism of neutrophils in patients with ADP is characterized by activation of plastic processes (due to the products of the pentose phosphate cycle) and aerobic energy (increased substrate flow intensity in the cycle of tricarboxylic acids). However, NADPH neutrophilic pool in patients with moderate disorder could be additionally supported by enzymatic malic enzyme reactions and NADP-dependent glutamate dehydrogenase. Activation of peroxidation events in patients with severe ADP is revealed, which needs NADPH compensation. The state of energy processes in blood neutrophils in patients with ADP is characterized by lacking changes in glycolytic activity, and increased intensity of substrate flux along tricarboxylic acids cycle. Activity of aerobic processes in patients with moderate disease is maintained by the products of amino acid metabolism (via glutamate dehydrogenase), whereas, in severe ADP it may be provided by products of lipid catabolism. Using correlation analysis, a dependence of respiratory burst of neutrophils on the state of their metabolism was studied. We have found that intensity and kinetics of respiratory burst in the neutrophils of controls depends only on the activity of NADP-dependent dehydrogenases. The changes in cellular metabolic activity in the patients with moderate ADP led to disturbances of their regulatory effect upon the state of neutrophil respiratory burst. In patients with severe disorder, the degree a neutrophil respiratory burst is stimulated by reductive amination of α -ketoglutarate, being, however, inhibited by intracellular peroxidation processes.

Keywords: pancreatitis, severity stage, neutrophils, function, respiratory burst, chemiluminescence, reactive oxygen species, metabolism, enzyme activity

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

Англоязычный список ферментов

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) — Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Glu6PDH)

Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (ГЗФДГ) — Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Gly3PDH)

Лактатдегидрогеназа, НАД-зависимая реакция (ЛДГ) — Lactate dehydrogenase, NAD-dependent reaction (LDH)

НАДР-зависимая декарбоксилирующая малатдегидрогеназа (НАДР-МДГ) — NADP-dependent malate dehydrogenase decarboxylated (NADP-MDH)

НАДР-зависимая глутаматдегидрогеназа (НАДР-ГДГ) — NADP-dependent glutamate dehydrogenase (NADP-GluDH)

НАДР-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДР-ИЦДГ) — NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH)

Малатдегидрогеназа, НАД-зависимая реакция (МДГ) — Malate dehydrogenase, NAD-dependent reaction (MDH)

НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа (НАД-ГДГ) — NAD-dependent glutamate dehydrogenase (NAD-GluDH)

НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАД-ИЦДГ) — NAD-dependent isocitrate dehydrogenase (NAD-ICDH)

НАДН-зависимая реакция лактатдегидрогеназы (НАДН-ЛДГ) — NADH-dependent reaction of lactate dehydrogenase (NADH-LDH)

НАДН-зависимая реакция малатдегидрогеназы (НАДН-МДГ) — NADH-dependent reaction of malate dehydrogenase (NADH-MDH)

Глутатионредуктаза (ГР) — Glutathione reductase (GR)

НАДН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы (НАДН-ГДГ) — NADH-dependent reaction of glutamate dehydrogenase (NADH-GluDH)

НАДФН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы (НАДФН-ГДГ) — NADPH-dependent reaction of glutamate dehydrogenase (NADPH-GluDH)

Введение

Острый панкреатит является воспалительным процессом с очень вариабельным клиническим течением. У большинства пациентов острый панкреатит протекает в легкой форме без существенных осложнений, однако у 10-20% больных наблюдается острый деструктивный панкреатит (ОДП) — наиболее тяжелая форма заболевания,

характеризующаяся высоким риском развития летальных осложнений с общей смертностью до 30% [1, 18]. Данная группа пациентов нуждается в наиболее раннем выявлении этих рисков, правильном назначении диагностических процедур и выборе обоснованной тактики лечения. Поэтому ранняя оценка степени тяжести больных ОДП важна для назначения ранней специализированной интенсивной терапии и своевременного оперативного вмешательства и, как следствие, улучшает исходы, снижая летальность [10].

Изменения в иммунной системе при ОДП являются наиболее ранними, и их следует рассматривать как фактор, во многом определяющий течение заболевания. Ключевыми клетками в развитии воспаления являются нейтрофилы, которые являются высокореактивными клетками врожденного иммунитета, способными быстро мобилизоваться в очаг воспаления [3, 7, 24]. За счет широкого спектра рецепторов нейтрофильные гранулоциты являются очень чувствительными клетками к изменению гомеостаза организма. Одним из проявлений функциональной активности нейтрофилов является респираторный взрыв, который развивается в процессе фагоцитоза и характеризуется уровнем и кинетикой синтеза активных форм кислорода (АФК) [12, 27]. Изменение уровня фагоцитарной активности значительно коррелирует с интенсивностью синтеза АФК. Так, в работе Marchi L.F. и соавт. (2014) продемонстрировано, что IFN γ одновременно стимулировал уровень фагоцитоза и синтез нейтрофилами супероксид-радикала, перекиси водорода и хлорноватистой кислоты [19]. В то же время высокая интенсивность синтеза АФК нейтрофилами также может явиться причиной неконтролируемой воспалительной реакции [22].

Реализация любых функциональных механизмов нейтрофилами не может не зависеть, от состояния их метаболизма. Доказано, что воспринимая сигналы о нарушении гомеостаза внутренней среды организма, нейтрофилы модулируют свой метаболизм, что, в свою очередь, приводит к изменению их функциональной активности [6, 8, 20]. Так, в работе Walmsley S. и Whyte M. (2014) показано, что функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов зависит от метаболизма глюкозы (прежде всего, через пентозофосфатный цикл), глутамата и внутриклеточной энергетики [24]. Azevedo E.P. и соавт. (2015) установили, что способность к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) зависит от активности пентозофосфатного цикла [8]. Авторами отмечается, что активность НАДФН-оксидазы соответствует уровню продукции НАДФН в пентозофосфатном цикле и влияет на формирование NET. Ранее нами об-

наружено, что динамика активности ферментов нейтрофилов у больных распространенным гнойным перитонитом в послеоперационном периоде реализуется при изменении фенотипа клеток [6]. В то же время механизмы зависимости синтеза АФК от метаболизма нейтрофилов при различных воспалительных заболеваниях человека исследованы еще не полностью.

Таким образом, целью данного исследования явилось изучение зависимости состояния респираторного взрыва нейтрофилов от активности их внутриклеточных ферментов у больных с разной степенью тяжести ОДП.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 50 больных ОДП (27 мужчин и 23 женщины) средней (17 пациентов) и тяжелой (33 пациента) степени тяжести, проходивших лечение в отделениях хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии КБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» г. Красноярск. Средний возраст больных составил $46,9 \pm 6,5$ года. Из исследования были исключены больные с ОДП легкой степени, у которых ОДП явился осложнением травмы брюшной полости, в том числе и послеоперационный. Исходную степень тяжести состояния больных определяли по шкале SAPS II [16]. Для оценки тяжести ОДП и прогноза развития заболевания применяли шкалу критериев первичной экспресс-оценки тяжести острого панкреатита Санкт-Петербургского НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе [1]. Наличие и степень выраженности полиорганной недостаточности определяли по шкале SOFA [23]. При оценке степени тяжести синдрома системной воспалительной реакции придерживались критериев ACCP/SCCM [9]. В качестве контроля обследовано 47 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина. Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа [7]. В качестве индикаторов хемилюминесценции использовали люминол и люцигенин. Оценка спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе БЛМ-3607 (ООО «МедБиоТех», Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции (Sind.)

к площади спонтанной (Sspont.) и определяли как индекс активации (Sind./Sspont.).

Исследование активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови проведено с помощью биоломинесцентного анализа [4]. Метаболизм нейтрофилов оценивали по активности следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), NADP-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (малик-фермент, NADP-МДГ), NAD- и NADH-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и NADH-ЛДГ), NAD- и NADH-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и NADH-МДГ), NADP- и NADPH-зависимой глутаматдегидрогеназы (NADP-ГДГ и NADPH-ГДГ), NAD- и NADH-зависимой глутаматдегидрогеназы (NAD-ГДГ и NADH-ГДГ), NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ (NAD-ИЦДГ и NADP-ИЦДГ соответственно) и глутатионредуктазы (ГР). Активность NAD(P)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10^4 клеток, где $1 \text{ E} = 1 \text{ мкмоль/мин}$ [5]. Исследование проводили на ферментативном препарате NAD(P):FMNоксидоредуктаза-люцифераза из *Photobacterium leiognathi* (получен в Институте биофизики СО РАН, г. Красноярск).

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ($Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

При исследовании интенсивности и кинетики люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов обнаружено, что только у больных со средней степенью тяжести ОДП снижается максимум интенсивности спонтанной хемилюминесценции по сравнению с контрольными показателями и значениями, выявленными у пациентов с тяжелой степенью ОДП (табл. 1).

У больных с тяжелой степенью ОДП уменьшается время выхода на максимум спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови. Независимо от тяжести заболевания, у обследованных пациентов понижается площадь под кривой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции.

Исследование люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови позволило обнаружить, что у больных со средней степенью тяжести ОДП повышается площадь под кривой спонтанной хемилюминесценции как относительно контрольных значений, так и показателей, выявляемых у пациентов с тяжелой степенью заболевания (табл. 2). При этом у больных с тяжелой степенью ОДП наблюдается значительное снижение площади под кривой спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов относительно контрольных значений. Только у больных с тяжелой степенью ОДП относительно контрольного уровня повышается индекс активации по люми-

нол-зависимой хемилюминесценции. Независимо от тяжести заболевания у обследованных пациентов относительно контрольных значений увеличиваются максимумы интенсивности спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов.

С помощью билюминесцентного анализа исследованы уровни активности NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови (табл. 3). Обнаружено, что у больных со средней степенью тяжести ОДП в нейтрофилах крови по сравнению с контрольными значениями, а также выявленными у больных с тяжелой степенью заболевания повышаются уровни активности NADP-МДГ, NADP-ГДГ и NAD-ГДГ (табл. 3). Только у пациентов с тяжелой степенью заболевания в нейтрофилах крови относительно контрольного диапазона увеличивается активность ГЗФДГ и ГР. Независимо от тяжести ОДП, повышается внутриклеточная активность Г6ФДГ и NAD-ИЦДГ, но снижается активность ЛДГ.

ТАБЛИЦА 1. ЛЮЦИГЕНИН-ЗАВИСИМАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ ОДП

TABLE 1. THE LUCIGENIN-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE ACTIVITY OF NEUTROPHILS WITH VARYING DEGREES OF ADP SEVERITY

Показатели Parameters	Контроль Control n = 47		Средняя степень ОДП Average degree of ADP n = 17		Тяжелая степень ОДП Heavy degree of ADP n = 33	
	1		2		3	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Spontaneous lucigenin-dependent chemiluminescence						
Tmax, сек. Tmax, sec.	2093	1425-2881	1923	1195-3056	1229	838-2181
					p ₁ = 0,033	
Imax, г.у. × 10 ³	7,74	2,61-16,54	2,72	1,45-5,35	6,88	4,04-10,69
			p ₁ = 0,039		p ₂ = 0,042	
S, г.у.× sec. × 10 ⁵	15,16	3,95-41,11	0,29	0,14-0,44	0,65	0,36-0,92
			p ₁ < 0,001		p ₁ <0,001	
Зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced lucigenin-dependent chemiluminescence						
Tmax, сек. Tmax, sec.	1738	1389-2331	1376	1262-2231	1291	951-1366
					p ₁ = 0,003	
Imax, г.у. × 10 ³	14,14	7,59-28,96	9,41	7,64-15,44	14,22	9,11-31,98
S, г.у.× sec. × 10 ⁵	25,16	10,70-64,61	0,81	0,59-1,97	1,26	0,81-3,91
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	
Синд./Спонт. Sind./Sspont.	1,77	1,17-3,11	3,06	1,70-4,22	2,38	1,74-3,55

Примечание. сек. – секунды, r.u. – relative units (относительные единицы); p₁ – статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p₂ – -//- с показателями больных со средней степенью ОДП.

Note. sec. – seconds; r.u. – relative units; p₁ – statistically significant differences with indicators of the control group; p₂ – -//- with indicators of patients with an average degree of ADP.

ТАБЛИЦА 2. ЛЮМИНОЛ-ЗАВИСИМАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ ОДП

TABLE 2. THE LUMINOL-DEPENDING CHEMILUMINESCENCE ACTIVITY OF NEUTROPHILS WITH VARYING DEGREES OF ADP SEVERITY

Показатели Parameters	Контроль Control n=47		Средняя степень ОДП Average degree of ADP n=17		Тяжелая степень ОДП Heavy degree of ADP n=33	
	1		2		3	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция Spontaneous luminol-dependent chemiluminescence						
Tmax, сек. Tmax, sec.	969	567-1559	1384	781-1447	1046	733-2315
lmax, r.u. × 10 ³	10,83	4,06-30,88	42,29	30,22-62,03	68,85	31,62-104,28
			p ₁ = 0,004		p ₁ < 0,001	
S, r.u.× sec. × 10 ⁵	14,91	4,49-50,94	24,90	15,20-61,40	5,61	4,06-9,76
			p ₁ = 0,005		p ₁ = 0,008 p ₂ < 0,001	
Зимозан-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced luminol-dependent chemiluminescence						
Tmax, сек. Tmax, sec.	1072	796-1459	994	794-1256	872	766-1823
lmax, r.u. × 10 ³	21,25	7,55-62,59	117,85	86,33-151,08	135,80	131,62-142,39
			p ₁ = 0,003		p ₁ < 0,001	
S, r.u.× sec. × 10 ⁵	24,34	9,21-84,16	27,42	6,61-42,80	16,60	7,99-21,10
Синд./ Спонт. Sind./ Sspont.	1,89	1,34-2,87	1,08	1,10-2,25	2,92	1,91-4,36
					p ₁ = 0,044	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

С помощью корреляционного анализа были исследованы взаимосвязи между уровнями активности исследуемых ферментов и показателями хемилюминесцентной активности нейтрофилов крови. Установлено, что у лиц контрольной группы активность NADP-ГДГ положительно коррелирует с площадью под кривой зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов ($r = 0,35$, $p = 0,027$). Кроме того, у обследованных данной группы активность Г6ФДГ отрицательно коррелирует с временем выхода на максимум спонтанной ($r = -0,31$, $p = 0,004$) и индуцированной ($r = -0,27$, $p = 0,015$) люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов. Активность NADP-ИЦДГ положительно взаимосвязана с площадью под кривой спонтанной ($r = 0,26$, $p = 0,019$), а также с максимумом ($r = 0,25$, $p = 0,025$) и площадью под кривой ($r = 0,27$, $p = 0,013$) индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции. У лиц контрольной группы также обнаружена отрицательная корреляционная связь между активностью NADP-МДГ и временем выхода на максимум зимозан-индуцированной люми-

нол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов ($r = -0,24$, $p = 0,028$).

У больных со средней степенью тяжести ОДП корреляционные связи между внутриклеточной активностью ферментов и показателями хемилюминесценции нейтрофилов отсутствуют. В то же время у пациентов с тяжелой степенью ОДП активность ЛДГ отрицательно взаимосвязана с временем выхода на максимум спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов ($r = -0,90$, $p = 0,009$). У обследованных данной группы обнаружена отрицательная корреляционная связь активности ГР с максимумом интенсивности спонтанной ($r = -0,92$, $p = 0,008$) и положительная с временем выхода на максимум ($r = 0,75$, $p = 0,010$) зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов. У больных с тяжелой степенью ОДП обнаружены положительные корреляционные связи внутриклеточной активности NADPH-ГДГ со следующими хемилюминесцентными показателями нейтрофилов: с площадью под кривой зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции ($r = 0,68$, $p = 0,014$), с ве-

ТАБЛИЦА 3. АКТИВНОСТЬ NAD- И NADP-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В НЕЙТРОФИЛАХ У БОЛЬНЫХ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ ОДП

TABLE 3. THE ACTIVITY OF NAD- AND NADP-DEPENDENT DEHYDROGENASES IN NEUTROPHILS WITH VARYING DEGREES OF ADP SEVERITY

Показатели Parameters	Контроль Control n=67		Средняя степень ОДП Average degree of ADP n=15		Тяжелая степень ОДП Heavy degree of ADP n=35	
	1		2		3	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
Г6ФДГ Glu6PDH	0,89	0,01-4,18	4,14	0,54-8,68	4,05	1,41-15,61
			p ₁ = 0,011		p ₁ = 0,002	
Г3ФДГ Gly3PDH	0,32	0,01-1,72	1,07	0,01-1,68	1,81	0,33-7,44
					p ₁ = 0,012	
ЛДГ LDH	10,90	0,89-50,65	1,92	0,15-4,69	2,97	0,85-5,85
			p ₁ = 0,038		p ₁ = 0,045	
NADP-МДГ NADP-MDH	0,03	0,01-1,86	2,04	0,15-14,23	0,02	0,01-1,15
			p ₁ = 0,028		p ₂ = 0,032	
NADP-ГДГ NADP-GluDH	0,16	0,03-2,31	20,28	2,19-48,11	0,57	0,01-5,25
			p ₁ = 0,008		p ₂ = 0,037	
NADP-ИЦДГ NADP-ICDH	1,35	0,20-5,88	0,86	0,16-1,06	0,74	0,12-3,96
МДГ MDH	1,95	0,35-7,80	1,22	0,41-4,36	1,20	0,37-3,70
NAD-ГДГ NAD-GluDH	0,67	0,01-4,60	17,29	5,83-26,24	0,75	0,01-6,75
			p ₁ < 0,001		p ₂ = 0,009	
NAD-ИЦДГ NAD-ICDH	0,02	0,01-0,65	5,34	3,70-13,41	4,38	1,69-9,93
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	
NADH-ЛДГ NADH-LDH	4,39	1,02-28,88	5,03	1,88-27,56	8,76	0,25-26,04
NADH-МДГ NADH-MDH	15,80	3,67-55,78	8,33	2,02-27,62	11,01	0,15-26,54
ГР GR	1,14	0,12-6,68	2,41	0,99-7,12	3,95	0,12-11,15
					p ₁ = 0,034	
NADH-ГДГ NADH-GluDH	5,98	0,02-16,39	12,09	1,74-13,19	8,11	2,18-13,50
NADPH-ГДГ NADPH-GluDH	12,48	0,25-41,40	12,51	0,35-23,71	10,37	0,12-41,17

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

личиною индекса активации по люцигенин-зависимой хемилюминесценции ($r = 0,90$, $p = 0,009$), с максимумом интенсивности ($r = 0,68$, $p = 0,025$) и площадью под кривой ($r = 0,89$, $p = 0,009$) индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции.

Обсуждение

Респираторный взрыв нейтрофилов определяется синтезом широкого спектра АФК, среди которых выделяют первичные (например, супер-

роксид-радикал) и вторичные (перекись водорода, гидроксильный радикал и др.) АФК [7, 17, 26]. Синтез супероксид-радикала осуществляется экспрессированной на мембране клеток NADPH-оксидазой [14, 21]. Известно, что хемилюминесцентная реакция люцигенина осуществляется только при взаимодействии с супероксид-радикалом [2, 7]. Следовательно, показатели люцигенин-зависимой хемилюминесценции характеризуют уровень синтеза супероксид-радикала и активность NADPH-оксидазы.

Обнаружено, что у больных со средней степенью тяжести ОДП снижен уровень спонтанного синтеза нейтрофилами супероксид-радикала (по показателям максимума интенсивности и площади под кривой люцигенин-зависимой хемилюминесценции). При индукции респираторного взрыва нейтрофилов с помощью опсонизированного зимозана у больных данной группы также наблюдается понижение уровня синтеза супероксид-радикала.

У пациентов с тяжелой степенью заболевания выявляется понижение уровня синтеза супероксид-радикала нейтрофилами, как находящимися в состоянии относительного покоя, так и при дополнительной индукции респираторного взрыва зимозаном, но только по площади под кривой спонтанной и индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Подобная особенность отражает не только слабую активность NADPH-оксидазы, но и нарушения в кинетике синтеза супероксид-радикала, что подтверждается уменьшением у данной группы больных времени выхода на максимум спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Необходимо отметить, что максимум выхода на максимум хемилюминесценции характеризует период времени от момента воздействия регуляторного (в случае спонтанной хемилюминесценции) или функционального (индуцированная хемилюминесценция) стимула, включая восприятие сигнала на внешней цитоплазматической мембране, до максимального уровня синтеза АФК с использованием метаболитических ресурсов клетки [7].

Супероксид-радикал, являясь первичной АФК, обладает низкой бактерицидной активностью [2]. Но его синтез инициирует образование широкого спектра вторичных АФК, среди которых выраженной бактерицидной активностью обладает гипохлорная кислота [26]. Особенности интенсивности и кинетики синтеза АФК нейтрофилами нами исследованы с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции. В связи с тем что активность люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у больных ОДП значительно ниже, чем у лиц контрольной группы, а отдельные показатели активности люминол-зависимой хемилюминесценции превышают контрольные значения, можно предположить, что люминол-зависимая хемилюминесценция характеризует уровень синтеза вторичных АФК нейтрофилами крови.

У больных со средней степенью тяжести ОДП уровни синтеза вторичных АФК нейтрофилами крови, как находящимися в состоянии относительного покоя (спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция), так и при дополнительной

индукции респираторного взрыва (индуцированная хемилюминесценция), значительно повышены относительно контрольных значений. У пациентов с тяжелой степенью ОДП максимальный уровень синтеза вторичных АФК нейтрофилами, находящимися в состоянии покоя, также превышает контрольные значения, но при снижении площади под кривой люминол-зависимой хемилюминесценции. Подобная особенность определяется нарушением кинетики синтеза вторичных АФК, прежде всего, за счет недостаточности внутриклеточных метаболитических ресурсов. При дополнительной индукции респираторного взрыва у больных с тяжелой степенью ОДП выявляется увеличение максимума синтеза вторичных АФК, а также увеличение индекса активации. Последний параметр характеризует метаболитические резервы фагоцитирующих клеток, которые используются для синтеза АФК при дополнительной индукции респираторного взрыва [7].

Разнонаправленные изменения в уровнях синтеза первичных и вторичных АФК нейтрофилами крови больных ОДП, по-видимому, связаны с увеличением активности панкреатических пищеварительных ферментов в кровотоке и соответствующим повреждением NADPH-оксидазы цитоплазматической мембраны нейтрофилов. Деструкция ткани поджелудочной железы и соответствующая активность панкреатических ферментов в крови выше у больных при тяжелой степени ОДП, что и приводит к более выраженным нарушениям механизмов респираторного взрыва нейтрофилов у пациентов данной категории.

В качестве параметров внутриклеточного метаболизма нейтрофилов исследованы уровни активности NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ. Связано это с тем, что пиридиновые нуклеотиды (коферменты дегидрогеназ) являются основными переносчиками электронов в клетках [4]. Кроме того, исследуемые NAD(P)-зависимые дегидрогеназы занимают ключевые позиции в системе внутриклеточного обмена веществ и, соответственно, участвуют в направленной координации сопряженных метаболитических потоков, обуславливая адаптивные изменения клеточного метаболизма [5].

Независимо от степени тяжести ОДП, в нейтрофилах крови обследованных пациентов повышена активность Г6ФДГ. Фермент является ключевым и инициализирующим ферментом пентозофосфатного цикла [13]. Повышение активности данного фермента в нейтрофилах отражает активацию реакций пластического обмена и увеличение наработки NADPH для NADPH-оксидазы. Из исследуемых NADP-зависимых дегидрогеназ только у больных со средней степенью тяжести ОДП в нейтрофилах крови также повы-

шается активность у малик-фермента (NADP-МДГ) и NADP-ГДГ. NADP-МДГ является ключевой в системе липидного анаболизма, тогда как NADP-ГДГ, осуществляя окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты, принимает участие в реакциях субстратного переноса продуктов аминокислотного обмена на реакции цикла трикарбоновых кислот [25, 28]. При этом у пациентов со средней степенью тяжести ОДП в нейтрофилах крови также повышается и активность NAD-ГДГ, что отражает дополнительное стимулирование митохондриальной энергетики клеток продуктами аминокислотного обмена. У больных с тяжелой степенью ОДП в нейтрофилах крови увеличивается активность ГР. Данный фермент принимает участие в глутатион-зависимой антиоксидантной системе, осуществляя NADPH-зависимое восстановление глутатиона [5, 11]. Увеличение активности ГР отражает повышение интенсивности перекисных процессов в нейтрофилах у пациентов с тяжелой степенью ОДП. При этом при восстановлении глутатиона расходуется NADPH, что может привести к снижению наработанного пула NADPH в клетках пациентов данной группы и, соответственно, к снижению активности NADPH-оксидазы.

Характеризуя состояние энергетических процессов в нейтрофилах при ОДП, необходимо отметить независимое от степени тяжести заболевания повышение активности NAD-ИЦДГ. Данный фермент является лимитирующим в цикле трикарбоновых кислот [15]. Повышение его активности характеризует увеличение интенсивности субстратного потока по циклу Кребса. Цикл трикарбоновых кислот является амфиболическим, соответственно, уровень субстратного потока на нем может поддерживаться различными процессами. В частности, как было отмечено выше, субстратная стимуляция цикла может осуществляться за счет продуктов аминокислотного обмена, через глутаматдегидрогеназы. Однако данный механизм реализован в нейтрофилах крови только у больных со средней степенью тяжести ОДП. Анаэробный гликолиз является одним из основных процессов, стимулирующих реакции цикла трикарбоновых кислот. Однако уровни активности анаэробной реакции ЛДГ (NADH-ЛДГ) и NADH-зависимой реакции МДГ (NADH-МДГ) в нейтрофилах крови у больных ОДП соответствуют контрольным значениям, что определяет отсутствие изменений активности гликолиза. Более того, при ОДП, независимо от степени тяжести заболевания, выявляется снижение активности аэробной реакции ЛДГ. При этом гликолиз является основным энергетическим процессом для нейтрофилов. Субстратный поток лимонного цикла также может

стимулироваться продуктами липидного обмена. Обнаружено, что у пациентов с тяжелой степенью ОДП в нейтрофилах повышается активность ГЗФДГ, характеризующей уровень липидного катаболизма и перенос интермедиатов на энергетические процессы [29].

С помощью корреляционного анализа исследованы особенности влияния активности исследуемых ферментов на интенсивность и кинетику респираторного взрыва нейтрофилов. Обнаружено, что у здоровых людей с показателями респираторного взрыва нейтрофилов взаимосвязаны только уровни активности NADP-зависимых дегидрогеназ. При этом скорость развития спонтанного и индуцированного респираторного взрыва зависит от уровней активности Г6ФДГ и NADP-МДГ. Интенсивность синтеза первичных и вторичных АФК нейтрофилами крови здоровых людей находится в прямой зависимости от активности NADP-ГДГ и NADP-ИЦДГ.

У больных со средней степенью тяжести ОДП взаимосвязей между уровнями активности ферментов и показателями респираторного взрыва нейтрофилов не обнаружено. Можно предположить, что изменение интенсивности внутриклеточных процессов привело к нарушению их регуляторного влияния на активность и кинетику респираторного взрыва.

Значительно изменено регуляторное влияние исследуемых ферментов на респираторный взрыв нейтрофилов у больных с тяжелой степенью ОДП. Причем на уровень и кинетику синтеза первичных и вторичных АФК влияет активность и NAD-, и NADP-зависимых дегидрогеназ. Так, уровень спонтанного синтеза супероксид-радикала находится в обратной зависимости от активности ГР, тогда как время достижения максимальной активности NADPH-оксидазы также находится в обратной зависимости от активности аэробной реакции ЛДГ. Активность ГР напрямую повышает время достижения максимальной активности NADPH-оксидазы нейтрофилов при дополнительной индукции респираторного взрыва зимозаном, тогда как NADPH-ГДГ стимулирует индуцированный синтез супероксид-радикала. Индуцированный синтез вторичных АФК нейтрофилами крови у больных с тяжелой степенью ОДП зависит от уровней активности NADH-ГДГ и NADPH-ГДГ. Следовательно, при тяжелой степени ОДП респираторный взрыв нейтрофилов крови стимулируется NADH- и NADPH-зависимыми реакциями восстановительного аминирования α -кетоглутарата, но ингибируется внутриклеточными перекисными процессами.

Таким образом, у больных ОДП выявляются нарушения в механизмах респираторного взрыва

нейтрофилов крови. Независимо от степени тяжести заболевания, выявляется снижение спонтанного и индуцированного синтеза нейтрофилами супероксид-радикала. У больных с тяжелой степенью ОДП также нарушена кинетика синтеза первичных АФК. У больных со средней степенью тяжести повышается уровень синтеза нейтрофилами вторичных АФК, тогда как при тяжелой степени заболевания наблюдаются нарушения в кинетике синтеза вторичных АФК нейтрофилами, находящихся в состоянии относительного покоя, и повышение уровня синтеза при дополнительной индукции зимозаном. Можно предположить, что недостаточность активности мембранной NADPH-оксидазы нейтрофилов при ОДП определяется увеличением активности пищеварительных ферментов поджелудочной железы в кровотоке. Патологическое воздействие данных ферментов более выражено при тяжелой степени ОДП, что в последующем и проявляется в нарушении синтеза нейтрофилами вторичных АФК. Метаболизм нейтрофилов у больных ОДП характеризуется активацией пластических процессов (за счет продуктов пентозофосфатного цикла) и аэробной энергетики (повышение интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот). Однако у больных со средней степенью тяжести нейтрофильный пул NADPH, который в том числе может быть использован в реакциях NADPH-оксидазы, дополнительно поддерживается ферментативными реакциями NADP-МДГ и NADP-ГДГ. У больных с тяжелой степенью ОДП выявляется активация перекисных процессов, для компенсации которых требуется NADPH (в реакции восстановления глутатиона).

Состояние энергетических процессов в нейтрофилах крови у больных ОДП характеризуется отсутствием изменений активности гликолиза и увеличением интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот (за счет высокой активности NAD-ИЦДГ). При этом у больных со средней степенью тяжести заболевания активность аэробных процессов поддерживается продуктами аминокислотного обмена (через глутаматдегидрогеназы), тогда как при тяжелой степени ОДП — продуктами липидного катаболизма. С помощью корреляционного анализа исследована зависимость респираторного взрыва нейтрофилов от состояния их метаболизма. Установлено, что у лиц контрольной группы интенсивность и кинетика респираторного взрыва нейтрофилов зависит только от активности NADP-зависимых дегидрогеназ. У больных со средней степенью тяжести ОДП изменение активности внутриклеточных метаболических процессов привело к нарушению их регуляторного влияния на состояние респираторного взрыва нейтрофилов. У пациентов с тяжелой степенью заболевания респираторный взрыв нейтрофилов стимулируется реакциями восстановительного аминирования α -кетоглутарата, но ингибируется внутриклеточными перекисными процессами. Выявленные механизмы регуляторного влияния внутриклеточных метаболических процессов на состояние респираторного взрыва нейтрофилов у больных с различной степенью тяжести ОДП характеризуют особенности иммунопатогенеза и могут быть использованы при разработке новых методов лечения.

Список литературы / References

1. Багненко С.Ф., Толстой А.Д., Красногоров В.Б., Курыгин А.А., Гринев М.В., Лапшин В.Н., Гольцов В.Р. Острый панкреатит (Протоколы диагностики и лечение) // *Анналы хирургической гепатологии*, 2006. Т. 11, № 1. С. 60-66. [Bagnenko S.F., Tolstoy A.D., Krasnorogov V.B., Kurygin A.A., Grinev M.V., Lapshin V.N., Goltsov V.R. Acute pancreatitis (diagnostic protocols and treatment). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of Surgical Hepatology*, 2006, Vol. 11, no. 1, pp. 60-66. (In Russ.)]
2. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // *Успехи биологической химии*, 2009. Т. 49. С. 341-388. [Vladimirov Yu.A., Proskurina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances of Biological Chemistry*, 2009, Vol. 49, pp. 341-388. (In Russ.)]
3. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.Л. Гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // *Инфекция и иммунитет*, 2017. Т. 7, № 3. С. 219-230. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 219-230. (In Russ.)]
4. Савченко А.А. Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2015. Т. 159, № 5. С. 656-660. [Savchenko A.A. Evaluation of NAD(P)-dependent dehydrogenase activities in neutrophilic granulocytes by the bioluminescent method. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, Vol. 159, no. 5, pp. 656-660. (In Russ.)]
5. Савченко А.А., Анисимова Е.Н., Борисов А.Г., Кондаков А.Е. Витаминная основа иммунометаболической терапии. Красноярск: Издательство КрасГМУ, 2011. 213 с. [Savchenko A.A., Anisimova E.N., Borisov A.G., Kondakov A.E. Vitamin-based immunometabolic therapy. Krasnoyarsk: KrasGМУ, 2011. 213 p.]

Borisov A.G., Kondakov A.E. Vitamins as the basis of immunometabolic therapy]. Krasnoyarsk: Krasnoyarsk State Medical University, 2011. 213 p.

6. 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. The phenotype and metabolism relationship of blood neutrophils in patients with widespread purulent peritonitis in the postoperative period dynamics. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 259-270. (In Russ.)]

7. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов и уровни концентрации цитокинов у больных распространенным гнойным перитонитом // Цитокины и воспаление, 2013. Т. 12, № 1-2. С. 115-119. [Savchenko A.A., Zdzitovetskiy D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Neutrophil chemiluminescent activity and cytokine concentration levels in patients with extensive purulent peritonitis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, Vol. 12, no. 1-2, pp. 115-119. (In Russ.)]

8. Azevedo E.P., Rochael N.C., Guimarães-Costa A.B., de Souza-Vieira T.S., Ganilho J., Saraiva E.M., Palhano F.L., Foguel D. A Metabolic shift toward pentose phosphate pathway is necessary for amyloid fibril- and phorbol 12-myristate 13-acetate-induced neutrophil extracellular trap (NET) formation. *J. Biol. Chem.*, 2015, Vol. 290, no. 36, pp. 22174-22183.

9. Bone R.S., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J. American college of Chest Physicians. Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guide lines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.*, 1992, Vol. 20, no. 6, pp. 864-874.

10. Cho J.H., Kim T.N., Chung H.H., Kim K.H. Comparison of scoring systems in predicting the severity of acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.*, 2015, Vol. 21, no. 8, pp. 2387-2394.

11. Couto N., Wood J., Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, Vol. 95, pp. 27-42.

12. Dvorožňáková E., Bucková B., Hurníková Z., Revajová V., Lauková A. Effect of probiotic bacteria on phagocytosis and respiratory burst activity of blood polymorphonuclear leukocytes (PMNL) in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Vet. Parasitol.*, 2016, Vol. 231, pp. 69-76.

13. Hashimoto R., Gupta S. Pentose shunt, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH redox, and stem cells in pulmonary hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, Vol. 967, pp. 47-55.

14. Jacob C.O., Yu N., Yoo D.G., Perez-Zapata L.J., Barbu E.A., Kaplan M.J., Purmalek M., Pingel J.T., Idol R.A., Dinauer M.C. haploinsufficiency of NADPH oxidase subunit neutrophil cytosolic factor 2 is sufficient to accelerate full-blown lupus in NZM 2328 mice. *Arthritis Rheumatol.*, 2017, Vol. 69, no. 8, pp. 1647-1660.

15. Laurenti G., Tennant D.A. Isocitrate dehydrogenase (IDH), succinate dehydrogenase (SDH), fumarate hydratase (FH): three players for one phenotype in cancer? *Biochem. Soc. Trans.*, 2016, Vol. 44, no. 4, pp. 1111-1116.

16. le Gall J.-R., Lemeshow S., Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*, 1993, Vol. 270, pp. 2957-2963.

17. Li X.J., Deng L., Brandt S.L., Goodwin C.B., Ma P., Yang Z., Mali R.S., Liu Z., Kapur R., Serezani C.H., Chan R.J. Role of p85 α in neutrophil extra- and intracellular reactive oxygen species generation. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 17, pp. 23096-23105.

18. Majidi S., Golembioski A., Wilson S.L., Thompson E.C. Acute pancreatitis: etiology, pathology, diagnosis, and treatment. *South Med. J.*, 2017, Vol. 110, no. 11, pp. 727-732.

19. Marchi L.F., Sesti-Costa R., Ignacchiti M.D., Chedraoui-Silva S., Mantovani B. *In vitro* activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma: increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. *Int. Immunopharmacol.*, 2014, Vol. 18, no. 2, pp. 228-235.

20. Miralda I., Uriarte S.M., McLeish K.R. Multiple phenotypic changes define neutrophil priming. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, Vol. 7, p. 217.

21. Ryu J.C., Kim M.J., Kwon Y., Oh J.H., Yoon S.S., Shin S.J., Yoon J.H., Ryu J.H. Neutrophil pyroptosis mediates pathology of *P. aeruginosa* lung infection in the absence of the NADPH oxidase NOX2. *Mucosal Immunol.*, 2017, Vol. 10, no. 3, pp. 757-774.

22. Ståhlhammar M.E., Douhan Håkansson L., Sindelar R. Bacterial N-formyl peptides reduce PMA- and *Escherichia coli*-induced neutrophil respiratory burst in term neonates and adults. *Scand. J. Immunol.*, 2017, Vol. 85, no. 5, pp. 365-371.

23. Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonca A., Bruining H., Reinhart C.K., Suter P.M., Thijs L.G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.*, 1996, Vol. 22, no. 7, pp. 707-710.

24. Walmsley S.R., Whyte M.K. Neutrophil energetics and oxygen sensing. *Blood*, 2014, Vol. 123, no. 18, pp. 2753-2754.

25. Walvekar A.S., Choudhury R., Puneekar N.S. Mixed disulfide formation at Cys141 leads to apparent unidirectional attenuation of *Aspergillus niger* NADP-glutamate dehydrogenase activity. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 7, e101662. doi: 10.1371/journal.pone.0101662.

26. Winterbourn C.C., Kettle A.J., Hampton M.B. Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu. Rev. Biochem.*, 2016, Vol. 85, pp. 765-792.
27. Yang P., Huang S., Yan X., Huang G., Dong X., Zheng T., Yuan D., Wang R., Li R., Tan Y., Xu A. Origin of the phagocytic respiratory burst and its role in gut epithelial phagocytosis in a basal chordate. *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, Vol. 70, pp. 54-67.
28. Yao P., Sun H., Xu C., Chen T., Zou B., Jiang P., Du W. Evidence for a direct cross-talk between malic enzyme and the pentose phosphate pathway via structural interactions. *J. Biol. Chem.*, 2017, Vol. 292, no. 41, pp. 17113-17120.
29. Zhai X., Meng R., Li H., Li J., Jing L., Qin L., Gao Y. miR-181a modulates chondrocyte apoptosis by targeting glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein (GPD1L) in osteoarthritis. *Med. Sci. Monit.*, 2017, Vol. 23, pp. 1224-1231.

Авторы:

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

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

Здзитовецкий Д.Э. — д.м.н., заведующий кафедрой хирургических болезней имени профессора Ю.М. Лубенского ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Медведев А.Ю. — аспирант в лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

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

Authors:

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

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

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

Medvedev A.Yu., Graduate Student, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

**Трушина Е.Ю., Костина Е.М., Молотиллов Б.А., Типикин В.А.,
Баранова Н.И.**

*Пензенский институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия
непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Пенза, Россия*

Резюме. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является социально значимым заболеванием. В основе ХОБЛ лежит хронический воспалительный процесс респираторного тракта, определяющий неуклонное прогрессирование обструкции бронхов. Актуальной современной проблемой является изучение роли цитокинов в иммунопатогенезе ХОБЛ. Биологические медиаторы определяют местное, системное воспаление и патофизиологические эффекты внесистемных проявлений патологического процесса. В работе проведено изучение спонтанной и индуцированной продукции цитокинов IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 лейкоцитами крови у больных хронической обструктивной болезнью легких среднетяжелого и тяжелого течения вне обострения. Показано, что ведущая роль в формировании воспалительного процесса при ХОБЛ принадлежит цитокинам IL-6, IL-8. Установлено, что у пациентов наблюдалось значимое повышение как спонтанной, так и индуцированной продукции IL-6, IL-8 ($p < 0,05$). Индуцированная продукция цитокинов в большей степени отражает резервные возможности иммунокомпетентных клеток в ответ на действие патогенного фактора. С IL-6, IL-8 в первую очередь связано формирование нейтрофильного типа воспаления, выражающегося в активации гранулоцитов, прежде всего нейтрофилов, в ответ на токсические (в частности, курение) и бактериальные патогены. Полученные результаты отражают тип и интенсивность воспаления дыхательных путей у больных хронической обструктивной болезнью легких и его персистирующее течение.

Высокие значения изучаемых цитокинов подтверждают их роль в ремоделировании бронхов и вносят свой вклад в необратимость обструкции при данной патологии. Выявлена взаимосвязь спонтанной и индуцированной продукции изучаемых цитокинов с клиническими показателями течения заболевания. У пациентов с высокими значениями спонтанной и индуцированной продукции IL-6, IL-8 отмечено статистически значимое повышение частоты рецидивов ХОБЛ (более 2 в течение года, $p < 0,05$) и наблюдались низкие значения ОФВ₁ ($p < 0,05$). Возможно, это связано с персистирующим течением нейтрофильного воспаления респираторного тракта и прогрессирующей обструкцией бронхов. IL-6 и IL-8 вносят значимый вклад в патогенетические механизмы, определяя клиническое течение хронической обструктивной болезни легких, и могут служить маркерами тяжести патологического процесса. Несомненно, иммунные механизмы патологического воспаления при ХОБЛ слож-

Адрес для переписки:

Трушина Елена Юрьевна
Пензенский институт усовершенствования врачей
440005, Россия, г. Пенза, Военный городок, корп. 205, 18.
Тел.: 8 (953) 024-14-17.
E-mail: trushina.lena@mail.ru

Address for correspondence:

Trushina Elena Yu.
Penza Institute for Postgraduate Education of Physicians
440005, Russian Federation, Penza, Voenny Gorogok,
bldg 205, apt 18.
Phone: 7 (953) 024-14-17.
E-mail: trushina.lena@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Ю. Трушина, Е.М. Костина, Б.А. Молотиллов,
В.А. Типикин, Н.И. Баранова «Роль цитокинов IL-4,
IL-6, IL-8, IL-10 в иммунопатогенезе хронической
обструктивной болезни легких» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 89-98.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-89-98

© Трушина Е.Ю. и соавт., 2019

For citation:

E.Yu. Trushina, E.M. Kostina, B.A. Molotilov, V.A. Tipikin,
N.I. Baranova "Role of IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 cytokines
in the immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary
disease", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 89-98.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-89-98

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-89-98

ны и многогранны. Изучение роли и значимости индуцированной продукции ведущих цитокинов поможет врачу в определении выбора и продолжительности необходимой терапии. Персонализированный подход к терапии больных с ХОБЛ определяется фенотипом патологии, типом, выраженностью и интенсивностью воспаления.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, ХОБЛ, цитокины, $ОФВ_1$, эозинофильный тип воспаления, нейтрофильный тип воспаления

ROLE OF IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 CYTOKINES IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Trushina E.Yu., Kostina E.M., Molotilov B.A., Tipikin V.A.,
Baranova N.I.

Penza Institute for Postgraduate Education of Physicians, Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Penza, Russian Federation

Abstract. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is socially significant disease. COPD is based on chronic inflammatory process of respiratory tract, which determines steady progression of the bronchial obstruction. Studies of the role of cytokines in immune pathogenesis of COPD are of crucial importance. The biological mediators determine local, systemic inflammation, and pathophysiological effects of extra-systemic pathological manifestations. In this work, we studied spontaneous and induced production of IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 cytokines by blood leukocytes from the patients with moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease, beyond the exacerbation phase. It is shown that the evident role in formation of the inflammatory process in COPD belongs to the IL-6, IL-8. We have found a significant increase in both spontaneous and induced production of IL-6 and IL-8 ($p < 0.05$) in the patients. Induced production of cytokines strongly suggests the reserve capabilities of immunocompetent cells in response to the pathogenic factor. Neutrophilic type of inflammation, manifesting as activation of granulocytes, mostly, neutrophils, in response to toxic agents (in particular, smoking) and bacterial pathogens, is primarily associated with IL-6 and IL-8. These results reflect the type and intensity of respiratory tract inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease and its persistent course.

High levels of the studied cytokines confirm their role in bronchial remodeling and contribute to irreversibility of bronchial obstruction in this disorder. The relationship between spontaneous and induced production of the studied cytokines and the clinical indices of the disease course has been shown. Statistically significant increase between frequency of COPD recurrences (more than 2 times pro year, $p < 0.05$), and low FEV_1 values ($p < 0.05$) were observed in patients with high values of spontaneous and induced production of IL-6 and IL-8. It may be associated with persistent course of neutrophilic inflammation of respiratory tract and progressive bronchial obstruction. IL-6 and IL-8 significantly contribute to pathogenetic mechanisms, determining the clinical course of COPD and may serve as markers of severity in this disorder. Certainly, the immune mechanisms of pathological inflammation in COPD are complex and multifaceted. Studies of clinical significance of induced cytokine production will help the physician when determining type and duration of treatment. Personalized approach to the therapy of patients with COPD depends on the phenotype of pathology, pattern, severity and intensity of inflammation.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, COPD, cytokines, FEV_1 , eosinophilic inflammation, neutrophilic inflammation

Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) характеризуется персистирующим ограничением скорости воздушного потока и хроническим воспалением респираторного трак-

та [20]. По прогнозам Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2016, заболеваемость ХОБЛ с каждым годом продолжает увеличиваться. Изучению патогенетических механизмов ХОБЛ посвящено множество исследований. Тем

не менее многие патогенетические вопросы формирования и прогрессирования хронического воспалительного процесса респираторного тракта при ХОБЛ остаются дискуссионными.

Важную роль в патогенезе воспаления респираторного тракта при ХОБЛ играет состояние иммунной реактивности организма. Иммунные изменения в первую очередь связаны с активацией и увеличением количества нейтрофилов, макрофагов, CD8⁺Т-лимфоцитов [18]. Механизм воспаления дыхательных путей при ХОБЛ значительно отличается от такового при бронхиальной астме, определяя особенности клинического течения, типа воспаления и ответа на проводимую терапию.

Ключевыми цитокинами в развитии и поддержании хронического воспаления дыхательных путей при ХОБЛ являются такие медиаторы, как интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухолей α (TNF α) и интерлейкин-6 (IL-6). Цитокины являются белковыми медиаторами, синтезируемыми различными иммунокомпетентными клетками (лимфоцитами, моноцитами, гранулоцитами, эндотелиоцитами и другими) в ответ на внедрение патогенов в организм, в первую очередь вирусов, бактерий, токсинов. Цитокины имеют широкий спектр биологической активности и способствуют межклеточным взаимодействиям при иммунном и воспалительном ответе. Они выполняют функции медиаторов иммунной системы, регулируют силу, продолжительность иммунного ответа, определяют тип и интенсивность воспалительного процесса [9, 14].

IL-6 синтезируется Т- и В-лимфоцитами, макрофагами и другими клетками, играя ключевую роль в развитии воспаления как системного, так и местного. Однако IL-6 является не только маркером воспаления дыхательных путей, но и предиктором потенциального повреждения эпителия легких, что приводит к ремоделированию бронхиального дерева и потере эластичности эпителиальной ткани [21, 22]. Данный феномен играет значимую роль в развитии эмфиземы легких и прогрессированию патофизиологических процессов у больных с ХОБЛ.

IL-8 является одним из основных провоспалительных хемокинов, синтезируемых нейтрофилами, моноцитами, макрофагами и эндотелиоцитами [6, 9]. IL-8 обладает мощной хемоаттрактивной активностью в отношении нейтрофилов. IL-8 выступает на защиту организма от различных патогенных факторов, в первую очередь инфекционного генеза, привлекая в очаг воспаления нейтрофилы [16]. Это приво-

дит к развитию нейтрофильного типа воспаления дыхательных путей при ХОБЛ [6].

Интерлейкин-4 (IL-4) и интерлейкин-10 (IL-10) являются ведущими в формировании CD4⁺ типа иммунореактивности, тем самым определяя совершенно другой характер воспаления [2]. Несмотря на то, что данным цитокинам определяется ведущее значение в формировании воспаления респираторного тракта при бронхиальной астме, они могут также вносить свой вклад и в патогенез воспалительного ответа при ХОБЛ. Формирование CD4⁺ типа иммунного ответа имеет важное значение в развитии эозинофильного типа воспаления в ткани респираторного тракта, формируя эозинофильный фенотип ХОБЛ [19]. Кроме того, IL-4 активирует выработку факторов роста, которые способствуют формированию ремоделирования дыхательных путей [3].

В работе И.С. Абдурахмановой и соавт. было выявлено повышение уровня цитокинов IL-6, IL-8 и снижение концентрации IL-4, как спонтанной, так и индуцированной продукции ($p < 0,05$), в сыворотке крови больных с тяжелым течением ХОБЛ. По мнению авторов, выявленный дисбаланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов является отрицательным прогностическим фактором, свидетельствующим о нарушении регуляторной функции цитокинов, что способствует поддержанию воспалительного процесса в дыхательных путях у больных ХОБЛ [1].

В другом исследовании показано, что значения IL-8 и других цитокинов (TNF α , гамма-интерферона) в мокроте, смывах из бронхов, жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) и сыворотке крови у больных ХОБЛ сохраняются высокими на разных стадиях заболевания. Наибольший уровень IL-8 в сыворотке крови был отмечен в третью стадию заболевания и составил $28,69 \pm 2,92$ пг/мл ($p < 0,005$), однако, авторами отмечено снижение значений изучаемого цитокина в сыворотке крови к четвертой стадии болезни — $16,2 \pm 1,04$ пг/мл ($p < 0,005$). По мнению авторов, возможно, это связано с применением системных и топических стероидов у больных, в том числе для купирования обострения [7].

Также, по данным литературы, при изучении интерлейкина-1 β (IL-1 β), IL-6 и TNF α в сыворотке крови у больных ХОБЛ с нормальным и повышенным систолическим давлением в легочной артерии установлена взаимосвязь высокого уровня IL-6, TNF α и повышенного давления в легочной артерии, что свидетельствовало о более тяжелом течении заболевания [10]. Данный факт

корреляции высоких значений IL-6 и IL-8 в сыворотке крови больных и тяжести течения ХОБЛ подтвердили в своих работах и другие исследователи [15], с этим же связывают и увеличение риска смертности [17].

Кроме того, выявлено наличие обратной корреляции между содержанием цитокинов IL-8 ($r = -0,64$) и IL-1 β ($r = -0,53$) в ЖБАЛ и значением ОФВ₁ у больных среднетяжелого и тяжелого течения ХОБЛ вне обострения. Авторы отметили, что нарушение соотношения провоспалительных (IL-8, IL-1 β) и противовоспалительных цитокинов (IL-10, TNF α) способствует прогрессированию хронического воспалительного процесса при ХОБЛ даже в период ремиссии [11].

При изучении ХОБЛ профессионального генеза различной степени тяжести так же отмечались повышенные значения IL-6 и IL-8 в сыворотке крови больных относительно здоровых лиц ($p < 0,05$). Вместе с тем достоверных данных по уровням IL-1 β , IL-4 и TNF α ($p < 0,05$) в исследовании получено не было. В связи с этим авторы сделали вывод, что респираторное воспаление в периоде стабильной фазы болезни выражено слабо и мало зависит от степени обструктивных нарушений [4].

Встречаются и другие работы, в которых выявлено повышение уровня IL-4 у больных с ХОБЛ в сыворотке крови. Уровень IL-4 составил 403 ± 11 пг/мл у больных ХОБЛ в период обострения ($p < 0,05$) в сравнении с значениями 200 ± 25 пг/мл, полученными у пациентов в период ремиссии [13]. В исследовании А.В. Ефремова и соавт. при проведении сравнительного анализа содержания цитокинов в крови в зависимости от стадии заболевания было обнаружено повышение уровня изучаемых цитокинов, в том числе IL-4, у пациентов с тяжелым течением ХОБЛ [8]. В данном аспекте остается много дискуссионных вопросов о роли и значимости IL-4, IL-10 в формировании воспаления дыхательных путей у больных ХОБЛ.

Несомненно, изучение роли цитокинов в патогенезе ХОБЛ является актуальной современной проблемой. Большая часть исследовательских работ проводилась по изучению уровня цитокинов в сыворотке крови. Изучение медиаторов в БАЛЖ в реальной клинической практики затруднено и трудоемко. Современный научный интерес представляет изучение спонтанной и индуцированной продукции цитокинов как резервной возможности иммунокомпетентных клеток. Кроме того, индуцированная продукция изучаемых медиаторов, на наш взгляд, может более точно отражать характер и интенсивность воспали-

ния в ответ на действие патогенов и при данной патологии.

Цель исследования — изучить уровень спонтанной и индуцированной продукции IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 лейкоцитами крови у больных ХОБЛ.

Материалы и методы

Обследовано 50 больных с диагнозом ХОБЛ, из них мужчин было 37 (74%), женщин — 13 (26%) человек. Контрольную группу составили 17 человек практически здоровых лиц без диагноза ХОБЛ и факторов риска сходного возраста. Все больные прошли полное клинико-лабораторное обследование в соответствии со стандартами обследования больных с ХОБЛ на базе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Клиническая больница № 4» г. Пензы. Средний возраст обследованных составил 59,50 лет. Критерии включения в исследование: больные с диагнозом ХОБЛ среднетяжелого и тяжелого течения (GOLD 2016) вне обострения, возраст больных от 40 до 65 лет, индекс курящего более 10 пачек/лет, информированное согласие испытуемых. Критерии исключения: легкая и крайне тяжелая степень тяжести ХОБЛ; психические заболевания; туберкулез любой локализации в активной фазе и в анамнезе; тяжелые и декомпенсированные заболевания печени и почек, сердечно-сосудистой системы; тяжелое и декомпенсированное течение эндокринных заболеваний, включая сахарный диабет; аутоиммунные заболевания; онкологические заболевания; беременность и период лактации; нежелание участвовать в исследовании. Функция внешнего дыхания (ФВД) изучалась при помощи спирометра MicroLab (Англия) с определением объема форсированного выдоха в секунду (ОФВ₁, %, л), форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ, %, л), модифицированного индекса Тиффно ($IT = ОФВ_1 / ФЖЕЛ, \%$), в соответствии с требованиями ATS (American Thoracic Society — Американское торакальное общество). Диагноз ХОБЛ установлен в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями и согласительным документом GOLD 2016 [20].

Исследование спонтанной и индуцированной продукции IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 проведено в Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) ПИУВ — филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (заведующая ЦНИЛ — доцент, д.б.н. Баранова Н.И.). Материалом для исследования служили супернатант спонтанной и фитогемагглютинин (ФГА)-индуцированной продукции клеток больных ХОБЛ и здоровых лиц. Для оценки спонтанной

и ФГА-индуцированной продукции цитокинов был проведен тест *ex vivo* [12]. Определение концентрации IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 в супернатанте спонтанной и ФГА-индуцированной продукции клеток иммунной системы осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) при помощи тест-систем «Интерлейкина-4-ИФА-Бест», «Интерлейкина-6-ИФА-Бест», «Интерлейкина-8-ИФА-Бест», «Интерлейкина-10-ИФА-Бест» (АО «Вектор-Бест», Россия).

Статистическая обработка материала проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 на персональном компьютере. При сравнении групп между собой использовали критерий Манна–Уитни. Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Исследование взаимосвязи между изучаемыми показателями проводилось с помощью метода корреляционного анализа по Спирмену с вычислением коэффициента корреляции (r). Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

По степени тяжести больные были распределены следующим образом: со среднетяжелым течением – 21 (42%), тяжелым – 29 (58%) человек. Индекс курильщика составил – 47,50 пачек/лет. У 37 (74%) пациентов ХОБЛ протекал с выраженными клиническими симптомами. ФВД различалась у больных и определяла степень тяжести обструкции. Среднее значение ОФВ₁ составило 37,50% (1,02 л), ФЖЕЛ – 48,00% (1,58 л), ИТ – 66,00%.

В ходе работы при изучении уровня цитокинов у больных с ХОБЛ были получены следующие результаты (табл. 1).

Значимых изменений уровня IL-4 и IL-10 как спонтанной, так и индуцированной продукции между больными ХОБЛ и контрольной группой выявлено не было ($p > 0,05$).

По IL-6 выявлены отличия как по спонтанной, так и по индуцированной продукции у больных с ХОБЛ в сравнении с группой контроля. Спонтанная продукция IL-6 у больных ХОБЛ

ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЯ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 ЛЕЙКОЦИТАМИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХОБЛ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

TABLE 1. VALUES OF BLOOD LEUKOCYTES' SPONTANEOUS AND INDUCED PRODUCTION OF IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 CYTOKINES IN PATIENTS WITH COPD AND HEALTHY SUBJECTS, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Цитокины, пг/мл Cytokines, pg/ml	Контрольная группа Control group n = 17	ХОБЛ COPD n = 50
IL-4 (спонт.**) IL-4 (spont.**)	0 (0-0)	0 (0-0)
IL-4 (инд.***) IL-4 (ind.***)	16,1 (8,4-25,6)	9,6 (2,4-21,6)
IL-6 (спонт.) IL-6 (spont.)	54,1 (27,9-94,4)	293,3* (170,2-370,5)
IL-6 (инд.) IL-6 (ind.)	9844 (9840-9849)	9886* (9860-9912)
IL-8 (спонт.) IL-8 (spont.)	427,4 (387,0-450,5)	587,1* (586,0-587,4)
IL-8 (инд.) IL-8 (ind.)	6014 (5786-6068)	9022* (9002-9044)
IL-10 (спонт.) IL-10 (spont.)	3,19 (2,40-7,50)	3,01 (2,30-9,40)
IL-10 (инд.) IL-10 (ind.)	130,31 (105,60-145,20)	129,03 (96,80-155,50)

Примечание. * – статистически значимое различие показателей между группами больных ХОБЛ и контрольной группой (тест Манна–Уитни, $p < 0,05$); ** спонт. – содержание цитокинов в супернатанте при спонтанной продукции клетками; *** инд. – содержание цитокинов в супернатанте при ФГА-индуцированной продукции клетками.

Note. *, statistically significant difference between the COPD patients group and the control group (Mann–Whitney test, $p < 0.05$); ** spont., the content of cytokines in the supernatant during spontaneous cells production; *** ind., the content of cytokines in the supernatant during PHA-induced cells production.

составила 293,30 пг/мл, что в 4 раза выше в сравнении с результатами, полученными у здоровых лиц ($p < 0,05$). Индуцированная продукция IL-6 у больных с ХОБЛ также значимо различалась в сравнении со здоровыми донорами и составила 9886,00 пг/мл ($p < 0,05$).

Аналогичные данные получены и по IL-8. У больных ХОБЛ отмечено повышение как спонтанной, так и индуцированной продукции IL-8. Спонтанная продукция IL-8 у больных ХОБЛ составила 587,10 пг/мл в сравнении с данными здоровой группы 427,40 пг/мл ($p < 0,05$). Индуцированная продукция IL-8 была в 1,5 раза выше в группе больных ХОБЛ в сравнении со здоровыми лицами ($p < 0,05$).

Выявлена обратная корреляционная взаимосвязь показателей ОФВ₁ и значений спонтанной и индуцированной продукции IL-6 и IL-8 ($p < 0,05$) (рис. 1). У пациентов с низкими зна-

чениями ОФВ₁ отмечены более высокие уровни как спонтанной, так и индуцированной продукции IL-6 ($r = -0,3165$, $-0,4319$) и IL-8 ($r = -0,4258$, $-0,4957$) соответственно ($p < 0,05$).

При сопоставлении значений цитокинов и клинического течения ХОБЛ (клинических симптомов, частоты обострения) получена значимая взаимосвязь с частотой рецидивов ХОБЛ (более 2 в течение года, $p < 0,05$).

Обсуждение

Отсутствие изменений продукции спонтанной и индуцированной продукции цитокинов IL-4 и IL-10 у больных ХОБЛ может быть связано с тем, что данные цитокины не имеют ведущего значения в патогенезе воспаления при ХОБЛ, особенно в период ремиссии. Иммунопатологические изменения при ХОБЛ в меньшей степени затрагивают CD4⁺ тип иммунного ответа,

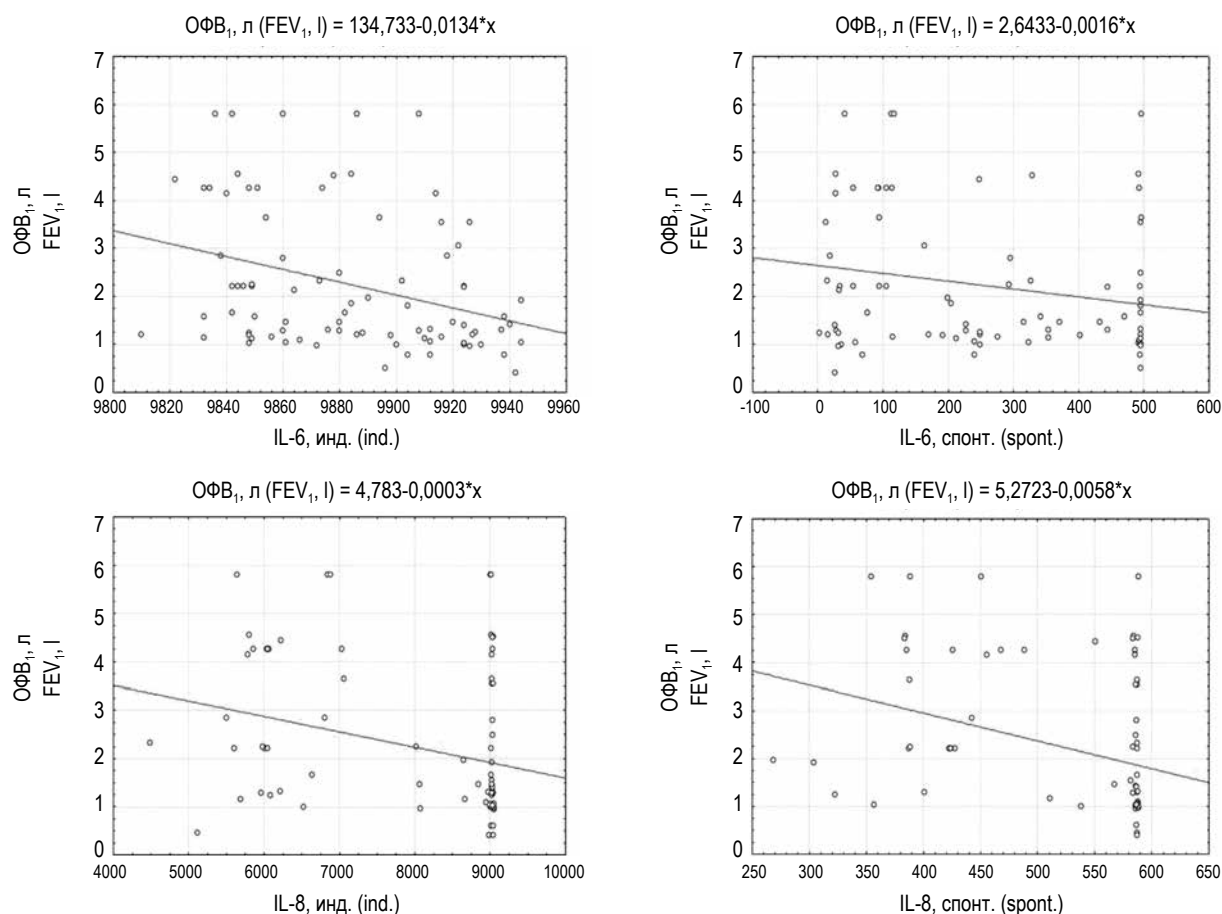


Рисунок 1. Корреляционные зависимости значений ОФВ₁ (л) и уровня спонтанной и индуцированной продукции цитокинов IL-6, IL-8 (пг/мл) лейкоцитами крови у больных ХОБЛ

Примечание. спонт. – содержание цитокинов в супернатанте при спонтанной продукции клетками; инд. – содержание цитокинов в супернатанте при ФГА-индуцированной продукции клетками.

Figure 1. Correlation between the FEV₁ (l) values and the level of spontaneous and induced production of IL-6, IL-8 (pg/ml) cytokines by blood leukocytes in patients with COPD

Note. spont., the content of cytokines in the supernatant during spontaneous cells production; ind., the content of cytokines in the supernatant during PHA-induced cells production.

что находит отражение в результатах, полученных другими исследователями. Эозинофильный тип воспаления при ХОБЛ встречается реже, чем нейтрофильный.

Сохранение высоких значений спонтанной и индуцированной продукции IL-6 указывает на персистенцию воспаления, несмотря на купирование обострения. Именно с IL-6 связывают выработку белков острой фазы воспаления и влияние на ремоделирование бронхов, за счет повреждения эпителия дыхательных путей. В свою очередь нейтрофилы являются основными объектами IL-6 в легких, что может делать IL-6 потенциально ключевым медиатором в патогенезе нейтрофильного воспаления респираторного тракта.

Полученные результаты уровня IL-8 также указывают на выраженность воспаления дыхательных путей у больных ХОБЛ и его персистирующее течение. С IL-8 в первую очередь связывают активацию гранулоцитов, прежде всего нейтрофилов, в ответ на токсические (в частности, курение) и бактериальные патогены. Таким образом, учитывая патофизиологические эффекты IL-6 и IL-8, можно полагать, что они играют значимую роль в формировании нейтрофильного типа воспаления дыхательных путей у больных ХОБЛ. Нейтрофильный тип воспаления дыхательных путей преобладает у большинства пациентов с ХОБЛ, что, несомненно, нужно учитывать при выборе метода терапии. В данном случае можно предположить, что ведущую роль в иммунопатогенезе ХОБЛ играет CD8⁺ тип иммунного реагирования [18]. Применительно к клинической ситуации, пациентам с ХОБЛ в данном случае будет целесообразным проведение терапии бронхолитиками и антибактериальными препаратами. Назначение ингаляционных глюкокортикостероидов в режиме постоянной терапии не только будет неэффективным, но может привести к нежелательным побочным эффектам, в частности к развитию инфекционных осложнений (пневмонии). Аналогичное мнение и результаты приводятся в других отечественных и зарубежных исследовательских работах [20].

При анализе клинического течения ХОБЛ наблюдали следующую тенденцию: у больных с высокими значениями как спонтанной, так индуцированной продукции IL-8 отмечали чаще эпизоды обострения заболевания (более 2 в течение года, $p < 0,05$). Кроме того, выявленная связь между высокими уровнями спонтанной и индуцированной продукции IL-6 и IL-8 и низкими значениями ОФВ₁. В связи с этим 11 (22%) больным были назначены пероральные глюкокорти-

костероидные препараты (преднизолон в дозе 30 мг в течение 14 дней), из них 9 человек (18%) дополнительно получали антибактериальную терапию. Это позволило уменьшить выраженность клинических симптомов, повысить контроль заболевания, улучшить клиническое течение ХОБЛ.

Интересным фактом было то, что у 5 (10%) пациентов выявлены низкие значения IL-8 как по спонтанной, так и индуцированной продукции (данные пациенты имели тяжелое течение ХОБЛ с частыми обострениями и выраженными клиническими симптомами). Возможно, снижение уровня в первую очередь индуцированной продукции IL-8 является прогностически неблагоприятным, так как снижается противоинфекционная защита организма и начинают преобладать процессы деструкции легочной ткани (эмфизема, бронхолит, необратимая обструкция).

Заключение

Воспаление при ХОБЛ носит иммунный характер с вовлечением в патофизиологический процесс различных цитокинов, в том числе IL-6, IL-8. Для больных ХОБЛ характерно повышение спонтанной и индуцированной продукции IL-6, IL-8 даже в период ремиссии заболевания. Наблюдается различное соотношение про- и противовоспалительных цитокинов как в период обострения заболевания, так и в ремиссию. С повышением продукции IL-6 и IL-8 могут быть связаны процессы ремоделирования бронхов и развитие необратимой обструкции, что также является важным фактором патогенеза ХОБЛ. Продукция цитокинов определяет не только активность воспалительного процесса, но и его тип, определяя фенотип патологии (нейтрофильный фенотип ХОБЛ, эозинофильный фенотип ХОБЛ). Индуцированная продукция цитокинов отражает функциональную резервную возможность иммунокомпетентных клеток на воздействие патогенов (курения, бактерий, вирусов), тем самым данный метод изучения цитокинов может более точно отражать тип, характер и выраженность воспаления дыхательных путей у больных ХОБЛ. Цитокины вносят свой вклад в клиническое течение заболевания в ответ на проводимую терапию, что, несомненно, следует учитывать при выборе метода лечения пациентов с ХОБЛ. Дальнейшее изучение продукции цитокинов позволит более точно определить иммунные механизмы формирования ХОБЛ и персонализировать проводимую терапию с учетом ведущего патогенетического механизма.

Список литературы / References

1. Абдурахманова И.С., Никуличева В.И., Вагапова Д.Р., Еникеев О.А. Характер экспрессии провоспалительных цитокинов у больных хронической обструктивной болезнью легких // Саратовский научно-медицинский журнал, 2010. Т. 6, № 2. С. 314-317. [Abdurakhmanova I.S., Nikulicheva V.I., Vagapova D.R., Enikeev O.A. Proinflammatory cytokine expression in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2010, Vol. 6, no. 2, pp. 314-317. (In Russ.)]
2. 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 regulation in pathology: rapid development and inevitable questions. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2007, Vol. 6, no. 2, pp. 26-34. (In Russ.)]
3. Бережная Н.М., Сепиашвили Р.И. Интерлейкины в патогенезе atopических аллергических заболеваний // Аллергология и иммунология, 2014. Т. 15, № 3. С. 169-176. [Berezhnaya N.M., Sepiashvili R.I. Interleukins in the pathogenesis of atopic allergic disease. *Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology*, 2014, Vol. 15, no. 3, pp. 169-176. (In Russ.)]
4. Блинова Т.В., Страхова Л.А., Лавренюк Н.А., Умнягина И.А. Цитокиновый профиль сыворотки крови при хронической обструктивной болезни легких профессиональной этиологии в стабильной фазе болезни и его ассоциация с другими маркерами воспалительного процесса // Пульмонология, 2015. Т. 25, № 5. С. 566-573. [Blinova T.V., Strakhova L.A., Lavrenyuk N.A., Umnyagina I.A. Serum cytokine profile in stable patients with work related chronic obstructive pulmonary disease and relationship to other inflammatory markers. *Pulmonologiya = Pulmonology*, 2015, Vol. 25, no. 5, pp. 566-573. (In Russ.)]
5. Воронина М.С., Шилкина Н.П., Виноградов А.А., Бутусова С.В. Интерлейкины 4, 6, 8 в патогенезе ревматоидного артрита и его осложнений // Цитокины и воспаление, 2014. Т. 13, № 1. С. 5-10. [Voronina M.S., Shilkina N.P., Vinogradov A.A., Butusova S.V. Interleukins 4, 6, 8 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and its complications. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2014, Vol. 13, no. 1, pp. 5-10. (In Russ.)]
6. Геренг Е.А., Суходоло И.В., Плешко Р.И., Огородова Л.М., Акбашева О.Е., Букреева Е.Б., Дзюман А.Н., Кобякова О.С., Селиванова П.А., Кремис И.С. Морфологические и биохимические маркеры воспалительных реакций в слизистой оболочке бронхов при тяжелой форме бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких // Бюллетень сибирской медицины, 2009. № 3. С. 11-17. [Gereng E.A., Sukhodolo I.V., Pleshko R.I., Ogorodova L.M., Akbasheva O.E., Bukreyeva E.B., Dzyuman A.N., Kobyakova O.S., Selivanova P.A., Kremis I.S. Morphological and biochemical markers of inflammatory reactions in a mucous membrane of bronchial tubes at the heavy form of a bronchial asthma and chronic obstructive disease of lungs. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2009, no. 3, pp. 11-17. (In Russ.)]
7. Долинина Л.Ю., Делиева А.Н., Каклюгин А.П., Богданова Е.О., Галкина О.В., Трофимов В.И. Сравнительный анализ уровня провоспалительных цитокинов у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких в зависимости от стадии заболевания // Архив внутренней медицины, 2012. № 1 (3). С. 64-67. [Dolinina L.Yu., Delieva A.N., Kaklyugin A.P., Bogdanova E.O., Galkina O.V., Trofimov V.I. Comparative analysis of proinflammatory cytokines level in patients with chronic obstructive pulmonary disease depending on the stage of the disease. *Arkhir vnutrenney meditsiny = Archive of Internal Medicine*, 2012, no. 1 (3), pp. 64-67. (In Russ.)]
8. Ефремов А.В., Тулеутаева Р.Е., Сафронов И.Д. Содержание про- и противовоспалительных цитокинов в крови больных хронической обструктивной болезнью легких на разных стадиях заболевания // Медицина и образование в Сибири, 2014. № 6. [Efremov A.V., Tuleutaeva R.E., Safronov I.D. The content of pro- and anti-inflammatory cytokines in the blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease in different stages of the disease. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri = Medicine and Education in Siberia*, 2014, no. 6. (In Russ.)] http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1589.
9. 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.
10. Прибылов С.А. Провоспалительные цитокины при хронической обструктивной болезни легких // Вестник новых медицинских технологий, 2007. Т. 10, № 3. С. 25-28. [Pribylov S.A. Antiinflammatory cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*, 2007, Vol. 10, no. 3, pp. 25-28. (In Russ.)]
11. Суркова Е.А., Кузубова Н.А., Сесь Т.П., Тотолян Арег А. Особенности цитокиновой регуляции очагового и системного воспаления при ХОБЛ // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 4-5. С. 349-354. [Surkova E.A., Kuzubova N.A., Ses' T.P., Totolian Areg A. Features of cytokine-mediated regulation of focal and systemic inflammation in COPD. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 4-5, pp. 349-354. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2010-4-5-349-354.

12. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 352 с. [Khaitov R.M., Pinegin B.V., Yarilin A.A. Guide on clinical immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2009. 352 p.
13. Шаповалова Т.Г., Волкова М.В., Шелобанова Н.В. Цитокиновый профиль и молекулы адгезии у больных хронической обструктивной болезнью легких, сочетанной с бронхиальной астмой // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 6. С. 553-558. [Shapovalova T.G., Volkova M.V., Shelobanova N.V. Cytokine profile and adhesion molecules in the patients with chronic obstructive lung disease combined with bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 6, pp. 553-558. (In Russ.)] doi: 15789/1563-0625-2010-6-553-558.
14. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
15. Agusti A., Edwards L.D., Rennard S.I., MacNee W., Tal-Singer R., Miller B.E., Vestbo J., Lomas D.A., Calverley P.M., Wouters E., Crim C., Yates J.C., Silverman E.K., Coxson H.O., Bakke P., Mayer R.J., Celli B. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 5, pp. 1-10.
16. Barnes P.J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, no. 11, pp. 3546-3556.
17. Celli B.R., Locantore N., Yates J., Tal-Singer R., Miller B.E., Bakke P., Calverley P., Coxson H., Crim C., Edwards L.D., Lomas D.A., Duvoix A., MacNee W., Rennard S., Silverman E., Vestbo J., Wouters E., Agusti A. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2012, Vol. 185, pp. 1065-1072.
18. Chung K.F. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.*, 2001, Vol. 18, pp. 50-59.
19. Eltboli O., Bafadhel M., Hollins F., Wright A., Hargadon B., Kulkarni N., Brightling C. COPD exacerbation severity and frequency is associated with impaired macrophage efferocytosis of eosinophils. *BMC Pulm. Med.*, 2014, Vol. 14, p. 112.
20. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention (GOLD) 2016, p. 80.
21. Whittaker L., Niu N., Temann U.A., Stoddard A., Flavell R.A., Ray A., Homer R.J., Cohn L. Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for airway epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2002, Vol. 27, pp. 593-602.
22. Zhu Z., Homer R.J., Wang Z., Chen Q., Geba G.P., Wang J., Zhang Y., Elias J.A. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J. Clin. Invest.*, 1999, Vol. 103, pp. 779-788.

Авторы:

Трушина Е.Ю. — аспирант кафедры аллергологии и иммунологии, Пензенский институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Пенза, Россия

Костина Е.М. — д.м.н., профессор кафедры аллергологии и иммунологии, Пензенский институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Пенза, Россия

Молотилев Б.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой аллергологии и иммунологии, Пензенский институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Пенза, Россия

Authors:

Trushina E. Yu., Postgraduate Student, Department of Allergology and Immunology, Penza Institute for Postgraduate Education of Physicians, Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Penza, Russian Federation

Kostina E.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Allergology and Immunology, Penza Institute for Postgraduate Education of Physicians, Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Penza, Russian Federation

Molotilov B.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Allergology and Immunology, Penza Institute for Postgraduate Education of Physicians, Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Penza, Russian Federation

Типикин В.А. — к.м.н., доцент, заведующий кафедрой пульмонологии и фтизиатрии, заместитель директора по учебной работе, Пензенский институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Пенза, Россия

Баранова Н.И. — д.б.н., доцент, заведующая центральной научной лабораторией, Пензенский институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Пенза, Россия

Tipikin V.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Pulmonology and Phthisiology Department, Deputy Director for Research, Penza Institute for Postgraduate Education of Physicians, Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Penza, Russian Federation

Baranova N.I., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Central Research Laboratory, Penza Institute for Postgraduate Education of Physicians, Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Penza, Russian Federation

Поступила 26.04.2018
Отправлена на доработку 10.05.2018
Принята к печати 21.05.2018

Received 26.04.2018
Revision received 10.05.2018
Accepted 21.05.2018

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ

Ганковская Л.В.¹, Намазова-Баранова Л.С.², Порядин Г.В.¹,
Греченко В.В.¹, Ганковский В.А.², Алексеева А.А.², Салмаси Ж.М.¹,
Казимирский А.Н.¹, Брагвадзе Б.Г.¹, Свитич О.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

² ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. В настоящее время активно исследуется роль механизмов врожденного иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы, в частности TLRs и цитокинов. В исследование были включены 42 пациента с бронхиальной астмой тяжелой степени в возрасте от 3-х до 12-ти лет и 67 здоровых детей того же возраста. Методом ПЦР-РВ оценивалась экспрессия генов TLR2, TLR4, TLR9 в соскобах со слизистых полости носа; методом иммуноферментного анализа оценивались цитокины (IL-33, TSLP, IL-4, TGF- β 1 и IL-28B) в назальных смывах. В результате проведенного исследования в соскобах со слизистой полости носа пациентов с бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми детьми показано повышение экспрессии генов TLR2, TLR4, TLR9. Параллельно проведен анализ содержания важных цитокинов, секретируемых эпителием респираторного тракта при активации TLRs. При исследовании концентрации IL-33, TSLP, IL-4 в назальных смывах было выявлено достоверное повышение значений концентраций этих цитокинов в группе больных тяжелой степенью БА относительно группы контроля. Исследование уровня TGF- β в смывах из полости носа выявило выраженное, достоверное снижение уровня данного регуляторного цитокина в группе больных детей с БА. Важно отметить, что при оценке содержания противовирусного цитокина IL-28B в группе больных БА тяжелой степени выявлена тенденция к снижению в сравнении с показателями контроля.

Таким образом, можно заключить, что у больных тяжелой формой БА имеются нарушения в системе врожденного иммунитета на локальном уровне, проявляющиеся в гиперэкспрессии генов TLRs, увеличении выработки провоспалительных и эпителиальных цитокинов, снижении продукции противовирусного цитокина IL-28B и TGF- β 1.

Ключевые слова: TLR2, TLR4, TLR9, провоспалительные цитокины, экспрессия гена, бронхиальная астма

Адрес для переписки:

Свитич Оксана Анатольевна
ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
117513, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 9.
Тел.: 8 (926) 148-83-22.
E-mail: svitichoa@yandex.ru

Address for correspondence:

Svitich Oksana A.
N. Pirogov Russian National Research Medical University
117513, Russian Federation, Moscow, Ostrovitianova str., 1, bldg 9.
Phone: 7 (926) 148-83-22.
E-mail: svitichoa@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.В. Ганковская, Л.С. Намазова-Баранова, Г.В. Порядин, В.В. Греченко, В.А. Ганковский, А.А. Алексеева, Ж.М. Салмаси, А.Н. Казимирский, Б.Г. Брагвадзе, О.А. Свитич «Изменение показателей врожденного иммунитета при тяжелой бронхиальной астме у детей» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 99–106.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-99-106
© Ганковская Л.В. и соавт., 2019

For citation:

L.V. Gankovskaya, L.S. Namazova-Baranova, G.V. Poriadin, V.V. Grechenko, V.A. Gankovsky, A.A. Alekseeva, Zh.M. Salmashi, A.N. Kazimirsky, B.G. Bragvadze, O.A. Svitich "Changes of innate immunity indexes in severe asthma in children", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 99–106.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-99-106
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-99-106

CHANGES OF INNATE IMMUNITY INDEXES IN SEVERE ASTHMA IN CHILDREN

Gankovskaya L.V.^a, Namazova-Baranova L.S.^b, Poriadin G.V.^a, Grechenko V.V.^a, Gankovsky V.A.^b, Alekseeva A.A.^b, Salmashi Zh.M.^a, Kazimirsky A.N.^a, Bragvadze B.G.^a, Svitich O.A.^a

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

^b National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Abstract. At the present time, the role of innate immunity in pathogenesis of bronchial asthma (BA) is actively studied, in particular, significance of TLRs and cytokines. The study included 42 patients with severe bronchial asthma (from 3 to 12 years old), and 67 healthy children at the same age. Expression of TLR2, TLR4, and TLR9 genes was evaluated by PCR-RT from the scrapings of nasal mucosa; cytokines (IL-33, TSLP, IL-4, TGF- β 1 and IL-28B) were assayed in nasal swabs by ELISA technique. The main results were as follows: an increased gene expression of TLR2, TLR4, TLR9 genes was revealed in the nasal mucosa scraps from the patients with bronchial asthma as compared to healthy children. We have also measured the contents of important cytokines secreted by the respiratory epithelium in the course of TLRs activation. The study of IL-33, TSLP, IL-4 in nasal samples revealed significantly increased concentrations of these cytokines in the patients with severe BA against the control group. A study of TGF- β levels in nasal cavity swabs revealed a significant decrease of this regulatory cytokine in the group of pediatric patients with asthma. Worth of note, evaluation of antiviral IL-28B cytokine in the group of patients with severe BA showed a significant downward trend, in comparison to the control indexes. Hence, one may conclude on some disturbances of local innate immunity system in the patients with severe BA which manifest as hyperexpression of TLRs genes, increased production of proinflammatory and epithelial cytokines, decreased production of antiviral IL-28B cytokine, and TGF- β 1.

Keywords: TLR2, TLR4, TLR9, proinflammatory cytokine, expression, asthma

Введение

В последние годы наблюдается тенденция к увеличению заболеваемости бронхиальной астмой (БА) и ее тяжелому течению. Эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что по меньшей мере 5-10% детской популяции и 5% взрослой страдает БА [6]. В связи с этим проводится углубленное изучение иммунопатогенеза БА с целью совершенствования методов диагностики, лечения и профилактики.

Наибольшее значение в иммунопатогенезе БА у детей имеет IgE-опосредованный механизм формирования атопического фенотипа.

В настоящее время активно исследуется роль механизмов врожденного иммунитета в патогенезе БА. Это обусловлено важной ролью врожденного иммунитета в развитии воспаления, являющегося неотъемлемым компонентом БА, а также тем фактом, что вирусные и бактериальные инфекции вызывают тяжелые обострения БА у 85% детей [16].

В работах последних лет получены новые доказательства важной роли эпителиальных клеток респираторного тракта в патогенезе БА. Респираторный эпителий представляет

физиологический и иммунологический барьер на пути проникновения патогенов и аллергенов. Имеются данные о недостаточной барьерной функции эпителиальных клеток дыхательных путей у пациентов с астмой [12]. Эпителий рассматривают в качестве полноправного участника мукозального иммунитета, выполняющего функции удаления патогенов за счет мукоцилиарного клиренса, распознавания патогенов и аллергенов паттерн-распознающими рецепторами, в частности Toll-подобными рецепторами (TLRs), секреции ряда цитокинов и противомикробных пептидов [8]. Кроме того, клетки слизистой имеют выраженное влияние на характер активации дендритных клеток (ДК) и дальнейшее формирование Th1- или Th2-типов иммунного ответа. Эта функция реализуется благодаря цитокинам, секретируемым эпителиальными клетками тимусного стромального лимфопоэтина (tymic stromal lymphopoietin – TSLP), IL-25 и IL-33. TSLP стимулирует аллергическое воспаление, развивающееся в зоне контакта эпителиальных клеток и дендритных клеток (ДК), активируя способность миелоидных ДК индуцировать Th2-воспалительный от-

вет [15]. Кроме того, TSLP способен напрямую взаимодействовать с тучными клетками, стимулируя синтез цитокинов.

Среди недавно открытых цитокинов большое внимание привлекает IL-33, относящийся к семейству провоспалительного цитокина IL-1. IL-33 стимулирует развитие ДК, приводя их к выраженной способности активировать CD4⁺Т-лимфоциты, что проявляется в значительной продукции последними IL-5 и IL-13. Кроме того, IL-33 является хемоаттрактантом для Th2. Продуцируемые ими цитокины (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) увеличивают продукцию IgE, количество эозинофилов, базофилов и тучных клеток, которые влияют на гладкомышечные и слизистые клетки дыхательных путей. Все это приводит к гиперактивности дыхательных путей — одному из главных звеньев патогенеза БА [3, 5]. В связи с этим изучение данного цитокина при БА весьма актуально.

Синтез TSLP и IL-33 инициируется при взаимодействии Toll-подобных рецепторов эпителиальных клеток с различными лигандами (аллергенами, патогенами и др.). Наиболее важным представляется изучение TLR2, TLR4 и TLR9, так как данные рецепторы распознают широкий спектр лигандов как микробного происхождения, так и ряда аллергенов [9]. Показано, что аллергены клещей домашней пыли активируют TLR4-опосредованные механизмы, вызывающие переключение дифференцировки Т-лимфоцитов по пути Th2-клеток.

В последнее время изучается роль регуляторного цитокина TGF- β в патогенезе БА, и результаты являются весьма противоречивыми. Существует мнение, что TGF- β 1 выступает в качестве противовоспалительного цитокина, т.е. подавляет аллергическое воспаление [10]. Однако в ряде работ показано повышение содержания и активности цитокина TGF- β 1 у больных БА, особенно после контакта с аллергеном, что ведет к увеличению количества воспалительных клеток в бронхах [18]. TGF- β 1 действует также на фибробласты, эндотелиальные клетки и гладкую мускулатуру дыхательных путей и способствует формированию ремоделирования дыхательных путей при БА [17].

Таким образом, эпителий респираторного тракта является информативным объектом исследования для изучения механизмов патогенеза БА. Однако прогностическая ценность бронхоальвеолярного лаважа во многом ограничена вследствие инвазивности доступа для получения исследуемого материала. В последние годы внимание исследователей в качестве материала для неинвазивной диагностики привлекает эпителий слизистой полости носа. Взятие материала

с внутренней поверхности носовой полости — неинвазивная процедура и может быть применима для диагностики заболеваний дыхательных путей у детей [3].

Необходимо отметить, что механизм формирования неконтролируемого течения бронхиальной астмы не до конца изучен. Сохраняется необходимость дальнейшего исследования иммунопатогенеза бронхиальной астмы для выявления маркеров тяжелого течения заболевания у детей.

Цель исследования — изучить особенности врожденного иммунитета на уровне слизистой оболочки полости носа у детей с тяжелой бронхиальной астмой.

Материалы и методы

В исследование включено 42 пациента с бронхиальной астмой тяжелой степени в возрасте от 3-х до 12-ти лет, находившихся на обследовании и лечении в отделении аллергологии ФГАУ «ННПЦЗД» Министерства здравоохранения России. Перед включением в исследование было получено информированное согласие у родителей пациентов. Основными критериями для включения в исследование были: верифицированный диагноз тяжелой БА, подтвержденный атопический фенотип (положительные кожные пробы, повышение уровня сывороточного иммуноглобулина Е), возраст от 3-х до 12-ти лет. Диагноз устанавливался в соответствии с критериями GINA (2016 г.) [14]. Критерии исключения — наличие на момент исследования вирусной инфекции, острых воспалительных заболеваний, патологии ЛОР-органов. Контрольную группу составили 67 здоровых детей того же возраста.

С целью исследования экспрессии генов TLR2, TLR4, TLR9 проводился метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Из соскобов со слизистой оболочки выделяли общую РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля, используя набор для выделения РНК «АмплиПРАЙМ Рибо-сорб» (ИнтерЛабСервис, РФ) по инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием «Набора для проведения реакции обратной транскрипции» (Синтол, РФ) для синтеза первой цепи ДНК на матрице РНК интересующего гена (TLR2, TLR4, TLR9) для последующего определения числа копий с помощью ПЦР в реальном времени. Реакцию проводили с применением «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» и праймеров, синтезированных на фирме «Синтол», РФ [15]. Реакцию проводили в амплификаторе ДТ-96. Анализ результатов проводили относительным методом измерений [7].

Определение цитокинов методом иммуноферментного анализа

В качестве материала исследования были использованы смывы со слизистой полости носа пациентов с БА и здоровых детей. Для получения назального смыва в носовой ход вводили по 1 мл теплого стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Промывную жидкость собирали в одну стерильную пробирку. Перед исследованием во всех пробах проводили оценку содержания белка на микроспектрофотометре NanoDrop™ 2000. Содержание цитокинов представлено в пикограммах в пересчете на миллиграмм белка.

Для определения содержания IL-28B в назальных смывах применяли набор для иммуноферментного определения IL-28B человека ELISA Kit for Interleukin 28B (Cloud-Clone Corp., США) «сэндвич»-методом строго по протоколу фирмы-производителя.

Для определения концентрации IL-33, IL-4 и TGF-β1 в назальных смывах и сыворотке крови применяли наборы для иммуноферментного анализа Human IL-33 Platinum ELISA, Human IL-4 Platinum ELISA, Human TGF beta 1 Platinum ELISA (Affymetrix eBioscience, San Diego, CA, США) согласно инструкции фирмы-производителя.

С целью количественного анализа TSLP в смывах из полости носа и сыворотке крови применяли набор Quantikine ELISA Human TSLP Immunoassay (R&D systems, США).

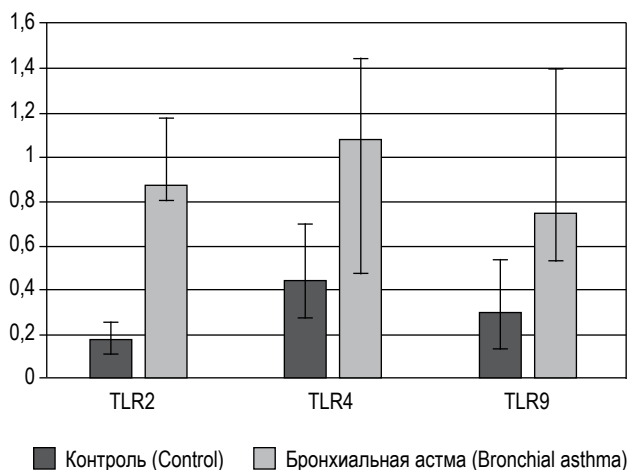


Рисунок 1. Экспрессия генов TLR2, TLR4, TLR9 в клетках слизистой полости носа у здоровых детей и больных бронхиальной астмой

Примечание. По оси ординат данные представлены в относительных единицах в виде медианы ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$).

Figure 1. Expression of TLR2, TLR4, TLR9 genes in nasal mucosa cells in healthy children and in patients with bronchial asthma

Note. On the ordinate axis, the data are presented in relative units in the form of a median ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного обеспечения Statistica 6. Данные представлены в виде медианы и 25-75 перцентилей. Достоверные различия между группами рассчитывали, используя непараметрический критерий Манна-Уитни. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе проведена оценка экспрессии генов распознающих рецепторов врожденного иммунитета TLR2, TLR4 и TLR9 в соскобах слизистой оболочки носа детей с тяжелой формой БА и здоровых детей того же возраста (рис. 1). Выбор данных рецепторов обусловлен широким спектром лигандов, распознаваемых этими рецепторами. В частности, TLR2 распознает PAMP микоплазм, грамположительных бактерий, TLR4 распознает PAMP грамотрицательных бактерий, белки теплового шока, а также некоторые аллергены [8]. TLR9 активируется неметилованными CpG-повторами ДНК-вирусов и бактерий [4].

В группе детей с тяжелой астмой выявлено значительное повышение экспрессии гена TLR2 в 6,5 раза ($p \leq 0,01$) по сравнению с группой здоровых детей (рис. 1).

Экспрессия генов TLR4 и TLR9 у детей с тяжелой формой БА в 2,5 раза превышала данные показатели контрольной группы ($p \leq 0,05$). Таким образом, наблюдается активация экспрессии генов распознающих рецепторов врожденного иммунитета слизистой оболочки полости носа у детей с БА.

Параллельно проведен анализ содержания IL-33 и TSLP-важных цитокинов, секретируемых эпителием респираторного тракта при активации TLRs.

При исследовании концентрации IL-33 в назальных смывах было выявлено достоверное повышение значений концентраций в группе больных тяжелой степенью БА (42,5 пг/мг белка) относительно группы контроля ($p = 0,016$) (рис. 2). У пациентов с БА содержание TSLP составило 91,7 (84,5; 107,9) пг/мг белка, что в 2,4 раза превышает показатель группы контроля (37,2 (25,2; 73,6) пг/мг) ($p \leq 0,05$) (рис. 2).

При оценке уровня цитокина IL-4 в группе пациентов с тяжелой формой БА обнаружено достоверное повышение данного цитокина в назальных смывах по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). Содержание IL-4 составило 6,2 пг/мг белка (3,3; 8,5). Следует отметить, что локальный уровень IL-4 был значительно ниже других исследуемых цитокинов.

Исследование уровня TGF-β в смывах из полости носа выявило выраженное достоверное снижение уровня данного регуляторного цитоки-

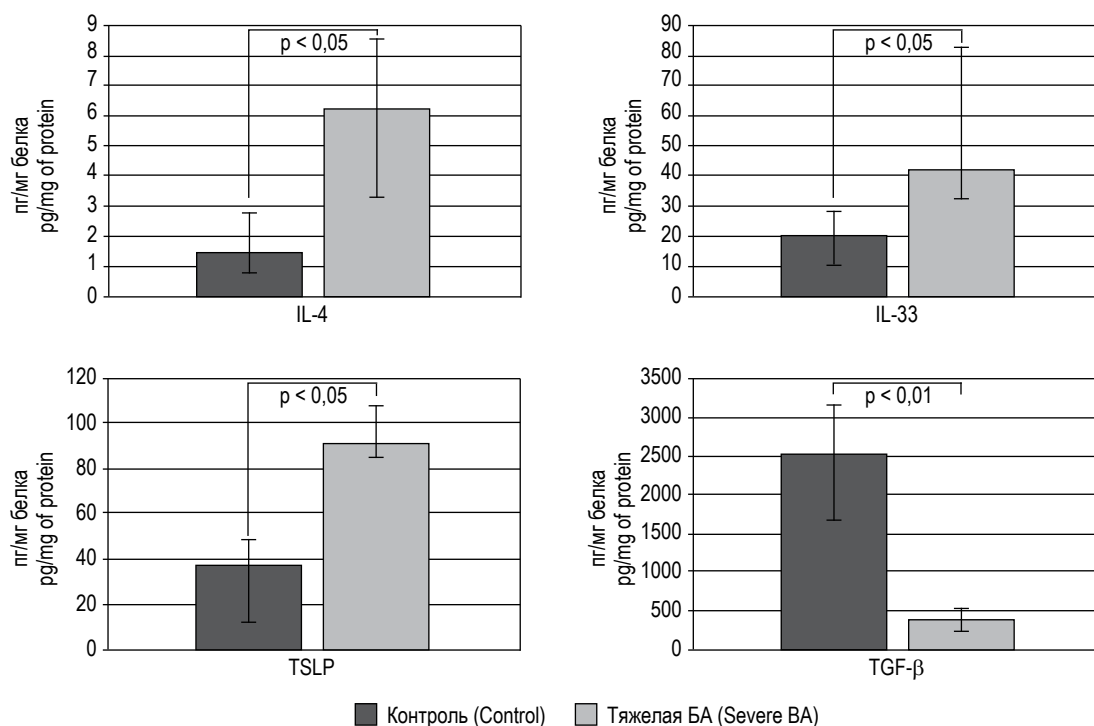


Рисунок 2. Содержание IL-4, IL-33, TSLP, TGF-β в смывах со слизистой полости носа у здоровых детей и больных бронхиальной астмой

Примечание. По оси ординат представлено содержание цитокинов в назальных смывах в пг/мг белка.

Figure 2. Cytokine content (IL-4, IL-33, TSLP, TGF-β) in the lavages from the nasal cavity in healthy children and patients with bronchial asthma

Note. On the ordinate axis: cytokine concentration normalized per 1 mg of protein.

на в группе больных детей с БА. Так, содержание TGF-β в назальных смывах у детей с БА составило 385,1 (47,7; 971,4) пг/мг белка, что в 6,5 раз ниже показателя группы контроля (2-532,9 (1687,5; 3175,8) пг/мг) (рис. 2).

Важно отметить, что при оценке содержания противовирусного цитокина IL-28B в группе больных БА тяжелой степени (8,4 (6-10,9) пг/мг) выявлена тенденция к снижению в сравнении с показателями контроля, который составил 11,9 (10,8-12,7) пг/мг белка [1].

Обсуждение

В настоящее время клетки слизистой оболочки рассматриваются как иммунологически активный барьер [2]. Ключевую роль в инициировании иммунной реакции в ответ на попадание патогенных микроорганизмов, аллергенов на слизистые респираторного тракта отводят врожденному иммунитету, а именно распознающим рецепторам (TLRs) и цитокинам.

Полученные нами результаты об увеличении уровня экспрессии генов TLR2, TLR4, TLR9 согласуются с работой Diogenes S. Ferreira и соавт., которые выявили увеличение экспрессии самих рецепторов TLR2, TLR3 и TLR4 на эпителиаль-

ных клетках слизистых дыхательных путей у пациентов с тяжелой БА иммуногистохимическим методом [13].

Гиперэкспрессия TLRs эпителиальными клетками приводит к повышенной выработке провоспалительных цитокинов и хемокинов. Ранее нами было показано значительное увеличение концентрации IL-1, IL-6, IL-8, TNF в смывах со слизистой полости носа у детей с тяжелой формой БА [2]. При этом уровень TGF-β был в 6,5 раза снижен у пациентов с БА по сравнению с группой здоровых детей. Можно предположить, что при тяжелой форме БА наблюдается переключение сигнальных каскадов в клетках эпителия, направленных на выработку провоспалительных цитокинов. Содержание противовирусного цитокина IL-28B было снижено, что свидетельствует о дефекте противовирусной защиты на уровне слизистой оболочки у больных тяжелой БА. Выявленный дисбаланс можно рассматривать как важный механизм формирования и самой БА, и ее вирус-индуцированных осложнений [1].

Наряду с повышенной экспрессией генов TLRs, у больных с БА выявлено повышенное содержание цитокинов TSLP и IL-33, секретируе-

мых эпителиальными клетками слизистой оболочки полости носа. Данные цитокины обладают иммунорегуляторным действием — активируют ДК, формируют Th2-тип иммунного ответа. Более того, через активацию ILC2 они способствуют выработке цитокинов (IL-4, IL-9, IL-13) и развитию аллергического типа воспаления [11].

Таким образом, можно заключить, что у больных тяжелой формой БА имеются нарушения в системе врожденного иммунитета на локальном уровне, проявляющиеся в гиперэкспрессии генов TLRs, увеличении выработки провоспалительных и эпителиальных цитокинов, снижении

продукции противовирусного цитокина IL-28B и TGF- β 1.

Новый взгляд на механизмы врожденного иммунитета, и в первую очередь на систему распознающих рецепторов TLR2, TLR4, TLR9, эпителиальных цитокинов TSLP и IL-33, открывает новые подходы к диагностике и лечению бронхиальной астмы у детей.

Выявленные нами особенности некоторых иммунологических показателей врожденного иммунитета можно рекомендовать в качестве критериев прогноза неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей.

Список литературы / References

1. Ганковская Л.В., Намазова-Баранова Л.С., Свитич О.А., Брагвадзе Б.Г., Алексеева А.А., Ганковский В.А. Особенности экспрессии IL-28B у детей с бронхиальной астмой // Российский иммунологический журнал, 2017. № 4. С. 641-646. [Gankovskaya L.V., Namazova-Baranova L.S., Svitich O.A., Bragvadze B.G., Alekseeva A.A., Gankovsky V.A. Expression features of IL-28B in children with asthma. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, no. 4, pp. 641-646. (In Russ.)]
2. Ганковская Л.В., Намазова-Баранова Л.С., Хорева М.В., Брагвадзе Б.Г., Огурцова А.Д., Алексеева А.А., Ганковский В.А., Свитич О.А. Особенности экспрессии Toll-подобного рецептора 2 и Toll-подобного рецептора 4 у детей с бронхиальной астмой // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 431-440. [Gankovskaya L.V., Namazova-Baranova L.S., Khoreva M.V., Bragvadze B.G., Ogurtsova A.D., Alekseeva A.A., Gankovsky V.A., Svitich O.A. Expression features of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 in children with asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 431-440. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-431-440.
3. Ганковская Л.В., Свитич О.А., Зайцева М.А. Молекулярно-генетические механизмы врожденного иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы // Аллергология и иммунология, 2015. Т. 16, № 4. С. 368-370. [Gankovskaya L.V., Svitich O.A., Zaitseva M.A. Molecular-genetic mechanisms of innate immunity in the pathogenesis of bronchial asthma. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2015, Vol. 16, no. 4, pp. 368-370. (In Russ.)]
4. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2011. С. 148-165. [Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R.Ya. *Klinicheskaya immunologiya i allergologiya s osnovami obshhej immunologii*. Moscow: GEOTAR-Media, 2011, pp. 148-165.
5. Колобов В.В. Интерлейкин 33 – ключевой посредник в реализации иммунного ответа // Цитокины и воспаление, 2011. № 3. С. 5-9. [Kolobov V.V. Interleukin 33 is a key mediator of immune response. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2011, no. 3, pp. 5-9. (In Russ.)]
6. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». Российское респираторное общество, Педиатрическое респираторное общество, Федерация педиатров стран СНГ, 2017. [The national program "Bronchial asthma in children. The strategy of treatment and prevention". Russian Respiratory Society, Pediatric Respiratory Society, Federation of Pediatricians of the CIS countries, 2017].
7. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. ПЦР в реальном времени. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 215 с. [Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu., Semenov P.A., Savilova A.M., Kofiadi I.A., Abramov D.D. *PCR in real time*. Moscow: BINOM. Laboratory of Knowledge, 2009. 215 p.
8. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. 749 с. [Yarilin A.A. *Immunology*. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 749 p.
9. Bezemer G.F., Sagar S., van Bergenhenegouwen J., Georgiou N.A., Garssen J., Kraneveld A.D., Folkerts G. Dual role of Toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Rev.*, 2012, Vol. 64, no. 2, pp. 337-358.
10. Bosse Y., Rola Pleszczynski M. Controversy surrounding the increased expression of TGF beta 1 in asthma. *Respir. Res.*, 2007, no. 8, p. 66.
11. Cayrol C., Girard J. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, no. 31, pp. 31-37.
12. Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, no. 4, pp. 978-988.

13. Ferreira D.S., Annoni R., Silva L.F.F., Buttignol M., Santos A.B.G., Medeiros M.C.R., Andrade L.N.S., Yick C.Y., Sterk P.J., Sampaio J.L.M., Dolhnikoff M., Wenzel S.E., Mauad T. Toll-like receptors, 3 and 4 and thymic stromal lymphopoietin expression in fatal asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2012, no. 42 (10), pp. 1459-1471.
14. Global strategy for asthma management and prevention (GINA) Report, 2016. Ginaasthma.org.
15. Lazear H., Nice T. Interferon- λ : Immune functions at barrier surfaces and beyond. *Immunity*, 2015, no. 43, pp. 15-28.
16. Wark P., Johnston S. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J. Exp. Med.*, 2005, no. 6, pp. 937-947.
17. Wójcik-Pszczola K., Jakiela B., Plutecka H., Koczurkiewicz P., Madeja Z., Marta Michalik, Sanak M. Connective tissue growth factor regulates transition of primary bronchial fibroblasts to myofibroblasts in asthmatic subjects. *Cytokine*, 2018, Vol. 102, pp. 187-190.
18. Yucesoy G.B., Kashon M.L., Johnson V.J., Lummus Z.L., Fluharty K., Gautrin D., Cartier A., Bouley L., Sastre J., Quirce S., Tarlo S.M., Cruz M., Munoz X., Luster M.I., Bernstein D.I. Genetic variants in *TNF α* , *TGFB1*, *PTGS1* and *PTGS2* genes are associated with diisocyanate induced asthma. *J. Immunol. Toxicol.*, 2015, no. 27, pp. 1-8.

Авторы:

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

Намазова-Баранова Л.С. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор Научно-исследовательского института педиатрии, заместитель директора по научной работе ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Порядин Г.В. — д.м.н., член-корр. РАН, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Authors:

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

Namazova-Baranova L.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Research, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Poriadin G.V., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Faculty of Medicine, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Греченко В.В. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Ганковский В.А. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии и аллергологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Алексеева А.А. — к.м.н., заведующая отделением стационарозамещающих технологий ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Салмаси Ж.М. — д.м.н., заведующий кафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Казимирский А.Н. — д.б.н., ведущий инженер отдела медицинской химии, токсикологии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Брагвадзе Б.Г. — ассистент кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, профессор кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Grechenko V.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Immunology, Medico-Biological Faculty, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Gankovsky V.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology and Allergology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Alekseeva A.A., PhD (Medicine), Head, Department of Ambulance Technologies, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Salmashi Zh.M., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Faculty of Medicine, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Kazimirsky A.N., PhD, MD (Biology), Leading Engineer, Department of Medical Chemistry and Toxicology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Bragvadze B.G., Assistant, Department of Immunology, Medico-Biological Faculty, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Department of Immunology, Medico-Biological Faculty, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 05.04.2018
Отправлена на доработку 10.05.2018
Принята к печати 14.05.2018

Received 05.04.2018
Revision received 10.05.2018
Accepted 14.05.2018

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ CXCR3 И CCR6 И ИХ ЛИГАНДОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С ВО ВРЕМЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕГИЛИРОВАННЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ

Басина В.В.¹, Арсентьева Н.А.², Бацунов О.К.^{2,3}, Любимова Н.Е.², Семенов А.В.^{2,3}, Эсауленко Е.В.^{1,2}, Тотолян Арег А.^{2,3}

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. В работе представлены данные по 41 пациенту с хроническим гепатитом С (1 генотип) и разной степенью фиброза печени, которые были получены в процессе противовирусной терапии с использованием интерферонсодержащих схем: пегилированный интерферон плюс рибавирин и пегилированный интерферон, рибавирин плюс ингибитор NS3/4A сериновой протеазы вируса гепатита С. В плазме крови измеряли концентрацию цитокинов/хемокинов: TNF α , CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC с помощью xMAP мультиплексного анализа, также проводили проточную цитофлуориметрию для определения экспрессии CCR6 и CXCR3 на популяциях лимфоцитов. Анализ результатов осуществляли с применением программы для статистического анализа данных R. Из 41 пациента 36 достигли вирусологического ответа, а 5 не ответили на терапию. Ответившие на лечение были разделены на две группы: без фиброза печени и с фиброзом 1, 2 и 3. В группе пациентов без фиброза печени в процессе терапии наблюдалось снижение концентрации CXCL11/ITAC и нарастание TNF α , а также увеличение содержания CTL CXCR3⁺ к 12 неделе терапии и увеличение содержания NK CXCR3⁺ к окончанию лечения. Наряду с этим в данной группе к концу лечения наблюдалось снижение содержания В-лимфоцитов с CXCR3⁺ рецептором. У пациентов с различной степенью фиброза печени было отмечено увеличение концентрации CCL2/MCP-1 в процессе лечения по сравнению с исходным уровнем. Также к окончанию терапии было выявлено

Адрес для переписки:

Басина Валентина Владимировна
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
194100, Россия, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2.
Тел.: 8 (921) 777-65-41.
E-mail: v.basina@mail.ru

Address for correspondence:

Basina Valentina V.
St. Petersburg State Pediatric Medical University
194100, Russian Federation, St. Petersburg, Litovskaya str., 2.
Phone: 7 (921) 777-65-41.
E-mail: v.basina@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Басина, Н.А. Арсентьева, О.К. Бацунов, Н.Е. Любимова, А.В. Семенов, Е.В. Эсауленко, Арег А. Тотолян «Особенности экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6 и их лигандов в периферической крови больных хроническим гепатитом С во время проведения противовирусной терапии с использованием пегилированных интерферонов» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 107–120.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-107-120

© Басина В.В. и соавт., 2019

For citation:

V.V. Basina, N.A. Arsentieva, O.K. Batsunov, N.E. Lyubimova, A.V. Semenov, E.V. Esaulenko, Areg A. Totolian "Expression patterns of chemokine receptors CXCR3 and CCR6, and their ligands in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C during antiviral therapy using pegylated interferons", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 107–120.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-107-120

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-107-120

но увеличение относительного содержания NK CXCR3⁺ и TNK CCR6⁺. Исследования подтверждают роль цитокинов/хемокинов TNFα, CCL2/MCP-1 и CXCL11/ITAC в процессе активации клеточного звена иммунитета и элиминации вируса гепатита С из организма. Они свидетельствуют о том, что активация Т-клеточного звена иммунитета у пациентов обеих групп и снижение В-лимфоцитов с CXCR3-рецептором у пациентов первой группы является прогностически положительным фактором в отношении эффективности терапии с использованием интерферонов. Два из исследованных цитокинов/хемокинов (TNFα и CCL20/MIP3α) различались на старте терапии у пациентов, ответивших и не ответивших на лечение. По результатам статистического анализа перед лечением концентрация TNFα демонстрировала тенденцию к различию, а CCL20/MIP3α — достоверное различие у пациентов этих групп. При этом концентрация CCL20/MIP3α в плазме крови пациентов, не ответивших на лечение, была более чем в 4 раза выше, чем у пациентов, достигших вирусологического ответа. Таким образом, данное исследование дает возможность предложить на роль предиктора исхода терапии хемокин CCL20/MIP3α.

Ключевые слова: гепатит С, противовирусная терапия, хемокины, фиброз, MIP-3α, TNFα, CTL CXCR3⁺, NK CXCR3⁺, предиктор исхода терапии

EXPRESSION PATTERNS OF CHEMOKINE RECEPTORS CXCR3 AND CCR6, AND THEIR LIGANDS IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C DURING ANTIVIRAL THERAPY USING PEGYLATED INTERFERONS

Basina V.V.^a, Arsentieva N.A.^b, Batsunov O.K.^{b, c}, Lyubimova N.E.^b,
Semenov A.V.^{b, c}, Esaulenko E.V.^{a, b}, Totolian Areg A.^{b, c}

^a St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. The work presents data on forty-one patients with chronic hepatitis C (HCV, genotype 1), at different liver fibrosis stages. The studies were performed in the course of interferon-containing treatment regimens, i.e., pegylated interferon combined with ribavirin and pegylated interferon; ribavirin together with NS3/4A inhibitor of HCV serine protease. Concentrations of cytokines/chemokines (TNFα, CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3α, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC) were measured in blood plasma samples, using xMAP multiplex analysis. Flow cytometry studies were also performed in order to reveal cells with CCR6 and CXCR3 receptors in lymphocyte populations. The obtained results were analyzed using a statistical program package R. Results: 36 out of 41 patients achieved virological response, while 5 patients did not respond to the therapy. The responders were split into two groups, as follows: (1) liver fibrosis-free; (2) patients with fibrosis stages 1, 2 and 3. In the group of fibrosis-free patients, the decrease of CXCL11/ITAC concentration and the increase of TNFα were observed, as well as increase of CTL CXCR3⁺ content by the 12th week of therapy and an increase of NK CXCR3⁺ by the end of treatment. In addition, this group exhibited a decrease in the CXCR3⁺ B lymphocyte contents at this timepoint. Concentrations of CCL2/MCP-1 during treatment were increased in the patients with different stages of liver fibrosis, as compared to baseline. By the end of therapy, an increase in the relative content of NK CXCR3⁺ and TNK CCR6⁺ was also detected. The study confirmed a potential role of cytokines/chemokines TNFα, CCL2/MCP-1 and CXCL11/ITAC in activation of the cell-mediated immunity and elimination of the hepatitis C virus from the body. The results indicate that activation of T cell-mediated immunity in both groups of the patients and reduction of B cells with CXCR3 receptor in the patients of first group is a positive prognostic factor showing efficiency of interferon therapy. Two of studied cytokines/chemokines (TNFα and CCL20/MIP3α) differed in the groups of responders and non-responders at the start of therapy. Statistical evaluation of pre-treatment results has shown a tendency for differing concentration of TNFα, and CCL20/MIP3α amounts were significantly different for the patients of these groups. The plasma concentrations of CCL20/MIP3α in non-responders were > 4-fold higher than in responders to the therapy. Hence, the present study allowed us to propose the chemokine CCL20/MIP3α as a potential predictor of treatment outcomes in HCV infection.

Keywords: hepatitis C, antiviral therapy, chemokines, fibrosis, MIP-3α, TNFα, CTL CXCR3⁺, NK CXCR3⁺, therapy outcome

Введение

Наиболее распространенным генотипом вируса гепатита С (ВГС) как на территории Российской Федерации [4], так и в Европейских государствах является первый (1a и 1b), выявляющийся примерно в половине случаев заболевания [26].

В настоящее время для лечения и предотвращения развития осложнений хронического гепатита С (ХГС) применяют различные комбинации противовирусной терапии (ПВТ) с использованием интерферонов. Эффективность комбинированной терапии не превышает 80% при 2 и 3 генотипе, 50% — при 1 генотипе вируса [22, 34]. Маркерами прогрессирования хронического вирусного гепатита С и эффективности противовирусной терапии могут служить биологические особенности вируса: генотип вируса, вирусная нагрузка. Индивидуальные особенности организма человека, такие как иммунологический ответ, индекс массы тела, также являются показателями скорости прогрессии фиброза печени у пациентов с ХГС и развития устойчивого вирусологического ответа (УВО) в результате противовирусной терапии. В связи с этим в центре внимания оказывается вопрос о прогнозе эффективности терапии в зависимости от особенности иммунологического ответа, обусловленного генетическим своеобразием организма человека. Цитокины вообще и хемокины в частности являются ключевыми медиаторами воспалительного процесса и формирования специфического иммунитета, ответственного за естественную элиминацию вируса гепатита С и исход противовирусной терапии. Известно, что аллельные варианты генов цитокинов определяют особенности течения ХГС и тип ответа на противовирусную терапию.

Механизмы повреждения печени при ХГС до сих пор остаются не полностью изученными. Считается, что повреждение печеночной ткани в большей степени является результатом реализации иммунного ответа в очаге воспаления, а не цитопатического действия ВГС [1, 12]. В печени пациентов накапливается большое количество иммунокомпетентных клеток, часть из которых обладает высокой цитотоксичностью и способностью повреждать и здоровые гепатоциты (НК-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты) [14, 25, 28, 32]. При вирусном поражении в печени происходит повышенная секреция определенных хемокинов, например CCL20, CXCL9, CXCL10, CXCL11, эпителиальными клетками, гепатоцитами, Купферовскими клетками [13]. В ответ на это происходит мигра-

ция лейкоцитов в очаг воспаления. Большинство иммунокомпетентных клеток, обнаруживаемых в периферической крови пациентов с ХГС, несут на своей поверхности CXCR3 и/или CCR6 [3, 6]. В случаях самоизлечения при гепатите С полную элиминацию вируса связывают с Т-клеточным ответом, поэтому интерес представляют хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6, обеспечивающие хемотаксис преимущественно Т-клеток в очаг воспаления в печени. Лигандами CXCR3 являются CXCL9, CXCL10, CXCL11, а CCR6 — CCL20. Предположительно, хемокины и их рецепторы, селективно экспрессирующиеся на иммунных клетках, могут претендовать на роль предикторов исхода противовирусной терапии. В литературе описано, что CXCL-10/IP-10 является предиктором отсутствия ответа на ПВТ с использованием интерферонов при ХГС [11].

Хемокины — это небольшие белки с молекулярной массой 8–12 кДа, их основная функция заключается в контроле миграции клеток иммунной системы в пораженный орган. Они играют большую роль как в нормальных, так и патологических процессах организма. Вопрос, каким образом эти рецепторы и их лиганды оказывают влияние на исход противовирусной терапии, остается не выясненным.

Целью данного исследования был комплексный анализ экспрессии CCR6 и CXCR3 на лимфоцитах и определение содержания их лигандов (CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC, CCL2/MCP-1) и TNF α в периферической крови больных ХГС на разных этапах ПВТ, а также поиск предикторов исхода ПВТ с использованием интерферонов.

Материалы и методы

Данное иммунологическое исследование проведено среди пациентов, страдающих хроническим вирусным гепатитом С с 1a, 1a+1b генотипами на разных этапах противовирусной терапии в период с 2014 по 2015 год. Лечение проводилось на кафедре инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, клинической базой которого являлась СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина» и ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера».

Обследован 41 пациент в возрасте от 22 до 58 лет во время проведения противовирусной тера-

пии ХГС. Средний возраст пациентов составил $41,5 \pm 8,9$ лет. Из них было 29 мужчин и 12 женщин, что составило 71 и 29% соответственно.

Для подтверждения диагноза у всех пациентов перед началом лечения проводилось серологическое исследование крови, определение общих антител к ВГС (HCVAB), молекулярно-биологическое исследование (обнаружение ВГС в плазме крови методом полимеразной цепной реакции), выявление уровня вирусной нагрузки, молекулярно-генетическое исследование (определение генотипа вируса). Также у пациентов проводились дополнительные исследования крови для исключения наличия маркеров сопутствующего хронического гепатита В, ВИЧ-инфекции и сифилиса, а также биохимическое определение активности цитолитических ферментов (АЛТ и АСТ), концентрации общего билирубина, амилазы, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы, протромбинового индекса, мочевины, креатинина крови, определение электролитного состава плазмы крови, уровней гормонов щитовидной железы, общий анализ мочи. Диагностика выраженности фиброза печени проводилась либо с помощью эластометрии, либо с помощью фибротеста.

В результате первичной диагностики у всех пациентов было подтверждено наличие моноинфекции — хронический вирусный гепатит С. У данных пациентов был выявлен 1 генотип HCV: 40 пациентов с 1b генотипом, 1 пациент с микстинфекцией 1a+1b генотип. Абсолютно у всех выявлен высокий уровень вирусной нагрузки в крови ($1,8 \times 10^6$ МЕ/мл.). Определение выраженности фиброза печени выявило у 36 пациентов либо отсутствие фиброза печени (F0), либо слабо выраженный фиброз (F1-F2), и лишь 5 пациентов имели выраженный фиброз (F3). Степень повышения активности цитолитических ферментов была умеренной (АЛТ от 43 до 146 Ед/л, АСТ от 41 до 205 Ед/л). Также наблюдалось незначительное повышение уровня щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы и общего билирубина примерно у одной четвертой части больных.

Для противовирусной терапии (ПВТ) использовались интерферонсодержащие схемы: пегилированный интерферон и рибавирин ($n = 12$) и пегилированный интерферон, рибавирин + ингибитор NS3/4A сериновой протеазы ВГС ($n = 29$).

Для анализа проведенных иммунологических исследований все пациенты были разделены на две группы: достигшие вирусологического от-

вета (ВО) — 36 пациентов и не ответившие (НО) на проведенную терапию — 5 пациентов.

В плазме крови измеряли концентрацию цитокинов/хемокинов: TNF α , CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC методом мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex) с использованием коммерческих тест-систем Milliplex MAP (Millipore), основанных на магнитных микросферах Milliplex Mag, согласно инструкции производителя. Регистрацию и анализ данных проводили на приборе Luminex MAGPIX (Luminex).

У всех пациентов также было определено относительное и абсолютное содержание CXCR3⁺ и CCR6⁺ лимфоцитов: Т-клеток, Th, CTL и NK-клеток и В-лимфоцитов в процессе ПВТ методом проточной цитофлуориметрии с использованием различных комбинаций моноклональных антител. Для оценки содержания CTL и NK-клеток использовалась комбинация моноклональных антител (CD3/CD16,56/CXCR3/CCR6/CD8), а для оценки содержания В-лимфоцитов и Th использовалась комбинация (CD19/CD3/CXCR3/CCR6/CD4).

Для определения статистически значимого изменения медиан до, во время и после ПВТ был использован критерий Краскела—Уоллиса с уровнем значимости $p < 0,05$. Сравнение медиан в группах ответивших и не ответивших на терапию в начальной точке проводилось с использованием критерия Манна—Уитни. Для выбора ПВТ с использованием предикторов количественные значения пороговых величин определялись с использованием ROC-кривых и построения дерева решений. Для вычислений использовалась программа для статистического анализа данных R [29].

Результаты

В результате проводимой противовирусной терапии с использованием интерферонов у 36 из 41 пациента был достигнут вирусологический ответ (ВО). У части пациентов вирус элиминировался из периферической крови к 4 неделе лечения (БВО), у остальных до 12 недели (РВО). Пять пациентов не ответили на терапию (НО) (рис. 1). Среди пациентов, развивших БВО, было 30 человек, получавших пегилированный интерферон, рибавирин и один из препаратов прямого противовирусного действия. Один пациент получал пегилированный интерферон и рибавирин. Все 5 пациентов, достигших РВО, получали для лече-

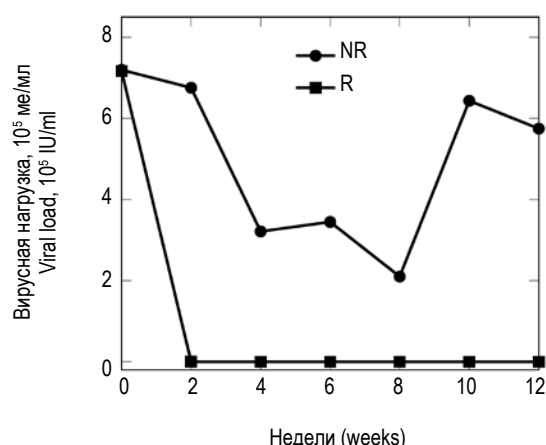


Рисунок 1. Изменение вирусной нагрузки у пациентов с ХГС в процессе ПБТ

Примечание. R – для пациентов, ответивших на терапию; NR – для пациентов, не ответивших на терапию.

Figure 1. Variation of viral load in patients with CHC during AVT
Note. R, for responders; NR, for nonresponders.

ния два препарата: пегилированный интерферон и рибавирин.

Среди пациентов, не ответивших на противовирусную терапию, двое получали два препарата для лечения: это пегилированный интерферон и рибавирин. Оба пациента получали ПБТ повторно. Ранее полученная схема терапии включала в себя интерфероны короткого действия и рибавирин. При предыдущем лечении пациен-

ты достигали РВО, однако через 3 и 4 месяца после терапии возникал рецидив заболевания. Трое пациентов с неудачей ПБТ получали для лечения три препарата: пегилированный интерферон, рибавирин и один из препаратов прямого противовирусного действия (нарлапривир в двух случаях и в одном симепревири). Данные пациенты ранее также получали ПБТ с использованием интерферонов короткого действия и рибавирина. У двух пациентов не было ответа на предшествующее лечение, и у одного на шестом месяце после лечения развился рецидив. Один из пациентов, получавший комбинацию препаратов, включающих в себя симепревири, имел микст-инфекцию: 1a и 1b генотип HCV.

В процессе ПБТ у пациентов, достигших ВО, происходила нормализация активности печеночных ферментов: АЛТ, АСТ, также наблюдалось снижение уровня общего билирубина, щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтрансферидазы (рис. 2). У пациентов, не ответивших на лечение, нормализации этих показателей не происходило.

На момент старта терапии в группе пациентов, достигших ВО, было следующее разделение по степени фиброза печени: 18 человек с отсутствием фиброза, 5 – с фиброзом 1, 10 – с фиброзом 2, 3 – с фиброзом 3.

Эти пациенты были разделены на две группы. К первой были отнесены пациенты с отсутствием фиброза печени, а ко второй – с фиброзом 1, 2 и 3. Всем больным были измерены концен-

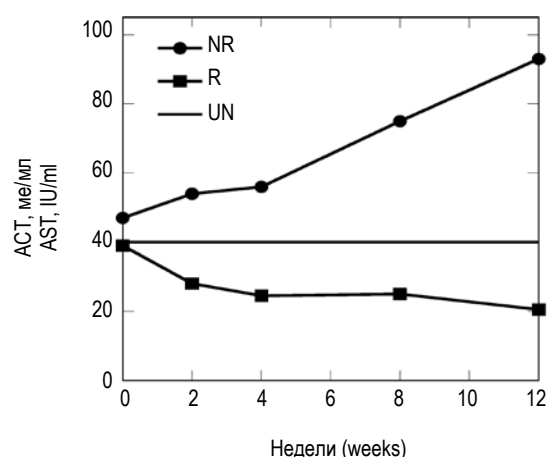
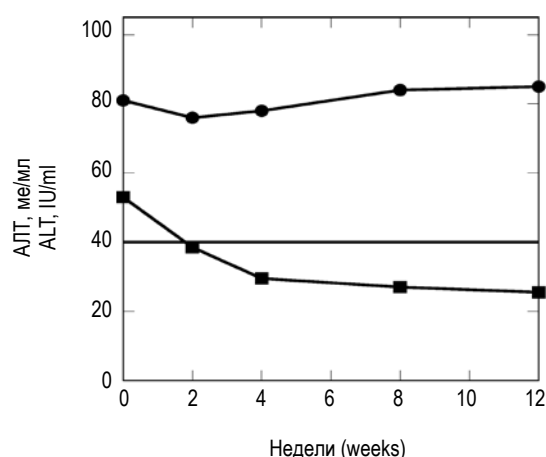


Рисунок 2. Изменение активности АЛТ и АСТ у пациентов с ХГС в процессе ПБТ

Примечание. R – для пациентов, ответивших на терапию; NR – для пациентов, не ответивших на терапию; UL – верхняя граница нормы.

Figure 2. Variation of ALT and AST in patients with CHC during AVT
Note. R, for responders; NR, for nonresponders; UL, upper limit of norm.

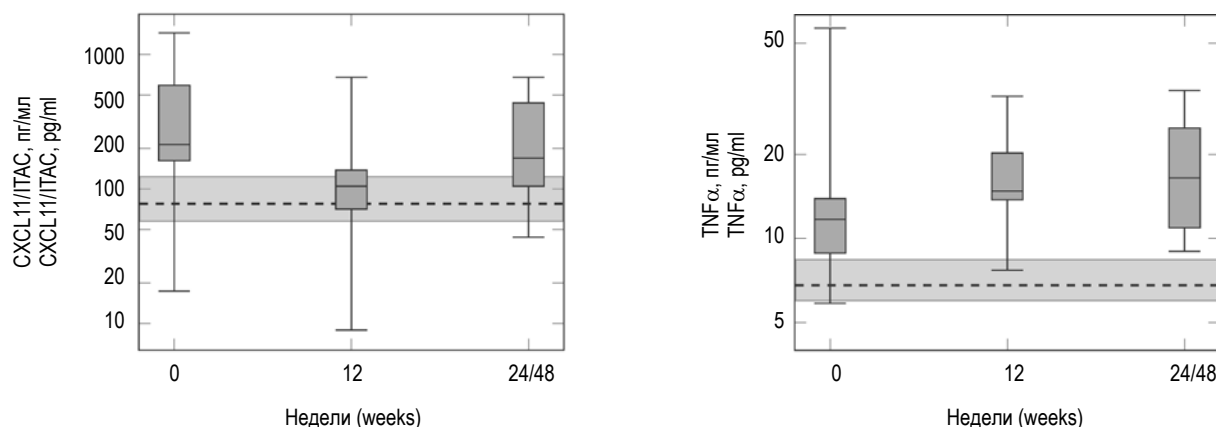


Рисунок 3. Изменение концентрации хемокина CXCL11 (слева) и фактора некроза опухоли (справа) на разных этапах терапии в сравнении с нормой

Примечание. Светло-серым показана область, ограничивающая интерквартильный размах, а пунктир соответствует медиане для нормальных показателей.

Figure 3. Variation of concentration of chemokine CXCL11 (left) and tumor necrosis factor TNF α (right) at different stages of therapy compared to the norm

Note. Light gray shows the area that limits the interquartile range, and the dotted line corresponds to the median for the norm.

трации цитокинов/хемокинов TNF α , CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC, и двадцати семи из них были определены различные субпопуляции Т- и В-лимфоцитов с CXCR3- и CCR6-рецепторами. Иммунологические показатели в динамике терапии были сопоставлены со значениями нормы.

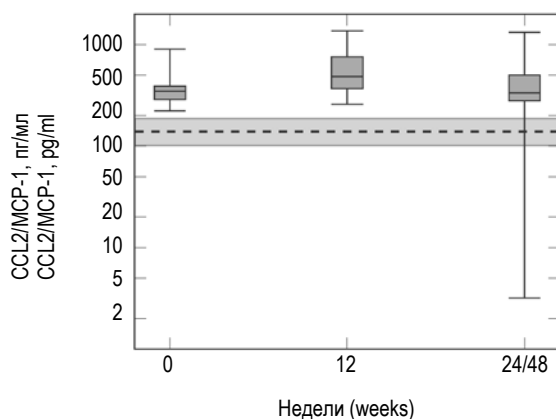


Рисунок 4. Изменение концентрации хемокина CCL2/MCP-1 на разных этапах терапии в сравнении с нормой

Примечание. Светло-серым показана область, ограничивающая интерквартильный размах, а пунктир соответствует медиане для нормальных показателей.

Figure 4. Variation of the concentration of chemokine CCL2/MCP-1 at different stages of therapy in comparison with the norm

Note. Light gray is the area that limits the interquartile range, and the dotted line corresponds to the median for the norm.

В группе обследованных пациентов, не имевших фиброза печени, было выявлено достоверное снижение содержания CXCL11/ITAC по сравнению с началом терапии уже к 12 неделе лечения ($p = 0,012$). Причем если на старте терапии медианы для этого показателя превышали медианы в группе здоровых доноров в 2,8 раза, то к 12-ой неделе концентрации CXCL11/ITAC практически сравнялись. На момент окончания терапии показатель превышал аналогичный у здоровых людей в 2,2 раза. Также имеет место увеличение концентрации TNF α ($p = 0,01$) к окончанию лечения. Если на момент начала лечения этот показатель превышал норму в 1,7 раза, то к окончанию терапии повышение было уже в 2,7 раза (рис. 3).

Во второй группе пациентов (с различными степенями фиброза печени) наблюдалось увеличение содержания CCL2/MCP-1 в процессе лечения ($p = 0,04$) по сравнению с исходным уровнем. Значения этого показателя во всех трех точках (старт, середина и окончание терапии) значительно превышали таковые у группы практически здоровых людей (в 2,5; 3,5 и 2,4 раза соответственно) (рис. 4).

Максимальные изменения концентраций CXCL11/ITAC в первой группе пациентов (F0) и CCL2/MCP-1 во второй (F1,2-3) по срокам терапии совпадают с периодом полной негативации ПЦР HCV – 4-12 неделя.

По данным проточной цитометрии в первой группе наблюдали достоверное увеличение от-

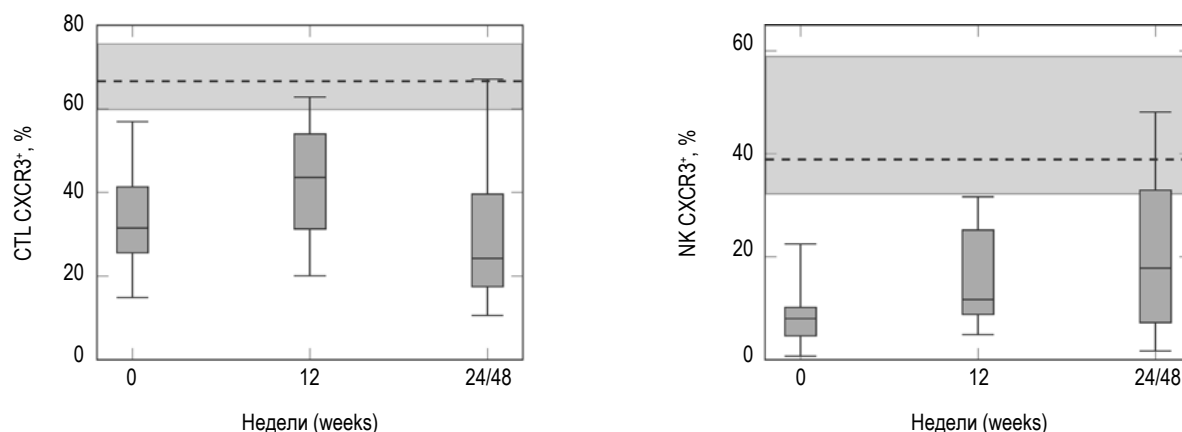


Рисунок 5. Относительное содержание CTL CXCR3⁺ (слева) и NK CXCR3⁺ (справа) на разных этапах терапии в сравнении с нормой

Примечание. Светло-серым показана область, ограничивающая интерквартильный размах, а пунктир соответствует медиане для нормальных показателей.

Figure 5. Relative content of CTL CXCR3⁺ (left) and NK CXCR3⁺ (right) at different stages of therapy compared to the norm

Note. Light gray shows the region that limits interquartile range, and the dotted line corresponds to the median for the norm.

носительного содержания лимфоцитов, обладающих цитотоксическим действием, что проявлялось увеличением содержания CTL CXCR3⁺ в середине лечения с последующим снижением к окончанию ($p = 0,03$). Однако максимальное повышение этого показателя на 12-ой неделе

остается в 1,5 раза меньше, чем у практически здоровых людей. Параллельно с увеличением относительного содержания CTL CXCR3⁺ происходит нарастание относительного содержания NK CXCR3⁺, в процессе терапии не достигающее значений нормы ($p = 0,01$). Перед лечением относительное содержание NK CXCR3⁺ почти в 5 раз меньше, чем нормальные значения, а к окончанию терапии NK CXCR3⁺ стало всего в 2 раза меньше. Увеличение содержания CTL CXCR3⁺ и NK CXCR3⁺ говорит об активации Т-клеточного звена иммунитета в процессе ПБТ с использованием препаратов интерферона (рис. 5).

Наряду с этим в данной группе к концу лечения наблюдается нормализация В-лимфоцитов с CXCR3⁺ рецептором. Медианы для этого показателя соответствуют значениям нормальных показателей (рис. 6).

У пациентов второй группы во время лечения было выявлено увеличение относительного содержания NK CXCR3⁺ и TNK CCR6⁺ ($p = 0,0007$ и $p = 0,04$ соответственно) с максимальным нарастанием содержания к окончанию лечения. Если перед терапией относительное содержание NK CXCR3⁺ было в 11,4 раза меньше такового у здоровых лиц, то к окончанию лечения этот показатель стал всего в 1,3 раза меньше. Относительное содержание TNK CCR6⁺ перед лечением было в 6 раз меньше нормы и к исходу терапии стало в 2,6 раза меньше (рис. 7). Увеличение этих показателей также говорит об активации

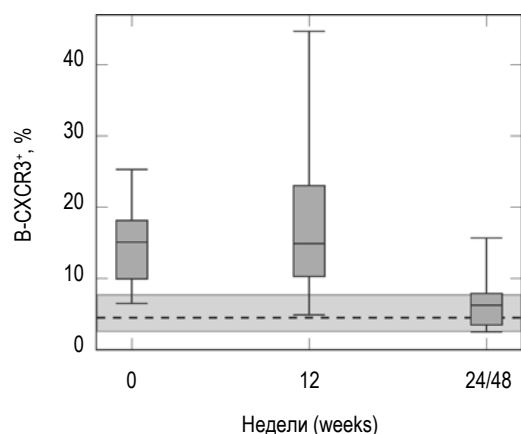


Рисунок 6. Динамика относительного содержания В-СХСR3⁺ лимфоцитов на разных этапах терапии в сравнении с нормой

Примечание. Светло-серым показана область, ограничивающая интерквартильный размах, а пунктир соответствует медиане для нормальных показателей.

Figure 6. Dynamics of the relative content of B-CXCR3⁺ lymphocytes at different stages of therapy in comparison with the norm

Note. Light gray is the area that limits the interquartile range, and the dotted line corresponds to the median for the norm.

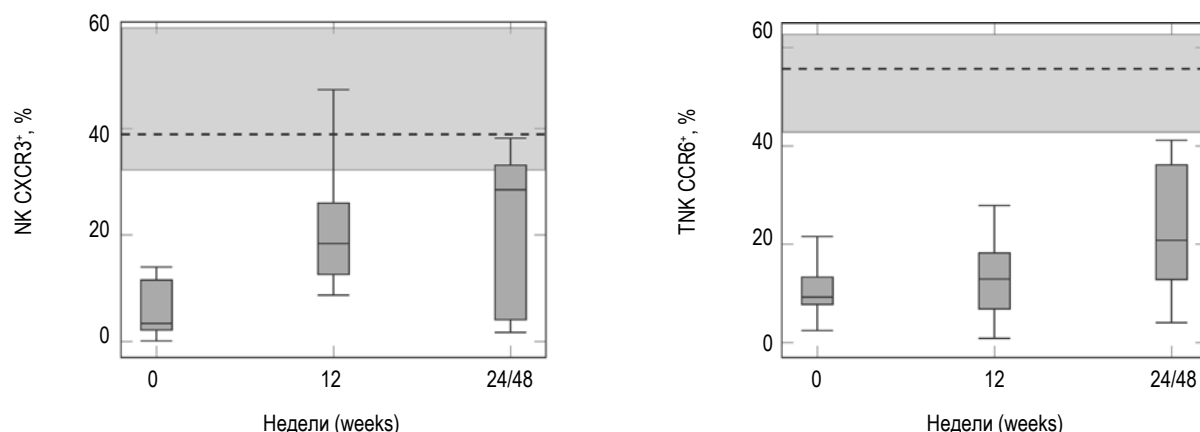


Рисунок 7. Изменение содержания NK CXCR3⁺ (слева) и TNK CCR6⁺ (справа) на разных этапах терапии в сравнении с нормальными показателями

Примечание. Светло-серым показана область, ограничивающая интерквартильный размах, а пунктир соответствует медиане для нормальных показателей.

Figure 7. Variation of the content of NK CXCR3⁺ (left) and TNK CCR6⁺ (right) at different stages of therapy compared to normal measures

Note. Light gray is the area that limits the interquartile range, and the dotted line corresponds to the median for the norm.

Т-клеточного звена иммунитета в ответ на HCV-инфекцию во время ПБТ.

Из литературы известно, что CXCL10/IP-10 является предиктором неудачного исхода ПБТ с использованием интерферонов. У пациентов двух групп: группы, в которой пациенты развили ВО (36 человек), и группы, в которой пациенты не достигли ВО (5 человек), в начале ПБТ достоверных различий концентрации CXCL10/IP-10 не наблюдалось. Однако наблюдалось достоверное различие между концентрацией CCL20/MIP3 α перед

лечением у пациентов, достигших впоследствии ВО и НО на ПБТ ($p = 0,009$) (рис. 8). Причем у пациентов, не ответивших на лечение, медианы были выше, чем у развивших ВО, в 4 раза.

Также наблюдались тенденции к различию у пациентов этих групп по содержанию TNF α , показатели которого у НО на лечение на начальной точке исследования были несколько выше (в 1,3 раза), чем у достигших ВО ($p = 0,09$) (рис. 9).

Одной из важных задач проведенного исследования явилась разработка способов эффективно-

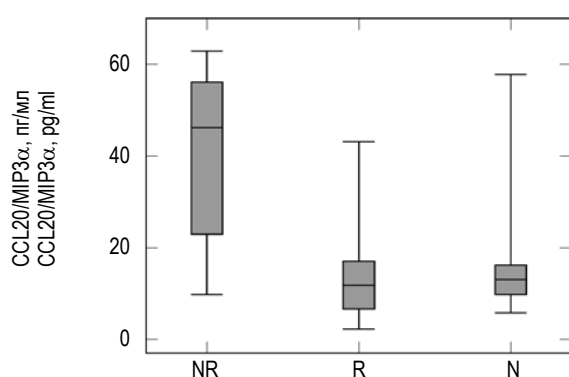


Рисунок 8. Концентрация CCL20/MIP3 α у пациентов, не ответивших (NR) и ответивших (R) на терапию, перед ее началом в сравнении с нормой (N)

Figure 8. The concentration of CCL20/MIP3 α in nonresponders (NR) and responders (R) before the start of the therapy versus the norm (N)

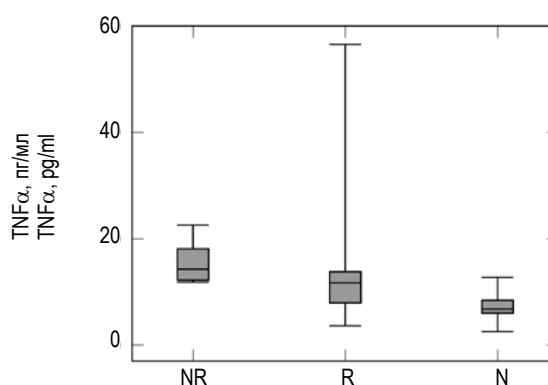


Рисунок 9. Концентрация TNF α у пациентов, не ответивших (NR) и ответивших (R) на терапию, перед ее началом в сравнении с нормой (N)

Figure 9. The concentration of TNF α in nonresponders (NR) and responders (R) before the start of the therapy versus the norm (N)

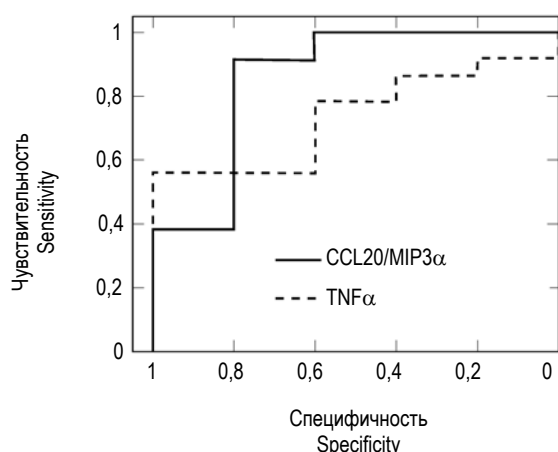


Рисунок 10. ROC-кривые, характеризующие зависимость чувствительности и специфичности CCL20/MIP3α и TNFα при сравнении групп больных, достигших и не достигших ВО

Figure 10. ROC curves characterizing the sensitivity and specificity of CCL20/MIP3α and TNFα while comparing responders and nonresponders groups

го прогнозирования исхода ПБТ с использованием интерферонов, которая позволяет изначально подобрать адекватную терапию и тактику ведения больного, экономически выгодно ориентировать пациента в режимах ПБТ.

С целью поиска эффективных предикторов исхода ПБТ с использованием интерферонов был проведен ROC-анализ, построены характеристические ROC-кривые и определены ППК (рис. 10). Проведенный анализ свидетельствует о том, что среди исследованных нами цитокинов/хемокинов наиболее информативными оказались CCL20/MIP3α и TNFα для разделения больных на достигших и не достигших ВО. ROC-кривая для CCL20/MIP3α приведена на рисунке 10, из которого видно, что площадь под кривой достаточно велика (ППК = 0,86). ROC-анализ для TNFα дает меньшую площадь под кривой (ППК = 0,73). Дерево решений, построенное с использованием этих двух параметров, приведено на рисунке 11. Построение дерева решений с использованием только CCL20/MIP3α показало, что оптимальным критерием наличия ВО является концентрация CCL20/MIP3α < 25 пг/мл. При этом чувствительность составила 91%, а специфичность — 80%. Использование TNFα в дополнение к CCL20/MIP3α для построения дерева решений позволяет лишь уточнить вероятность принадлежности пациента к группе ответчиков.

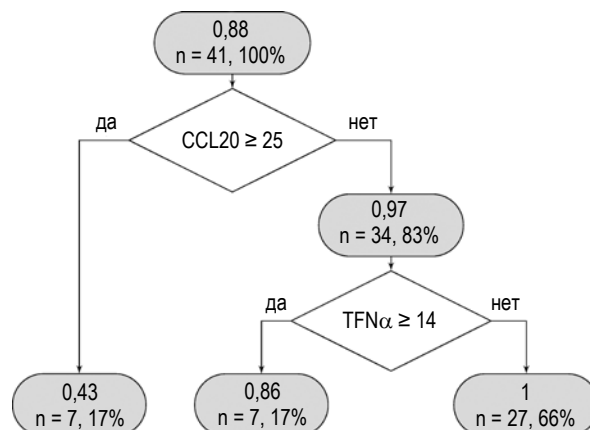


Рисунок 11. Дерево принятия решений для разделения пациентов на группы ответчиков и неответчиков по параметрам CCL20/MIP3α и TNFα

Figure 11. Decision tree for division of patients into groups of responders and non-responders with the help of parameters CCL20/MIP3α and TNFα

Обсуждение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что содержание хемокина CCL20/MIP3α меньше 25 пг/мл в сыворотке крови пациентов является предиктором развития вирусологического ответа на ПБТ с использованием интерферонов с чувствительностью 91% и специфичностью 80%. Аналогичный результат был получен в статье [35], где было проанализировано содержание хемокина CCL20/MIP3α у 25 пациентов в процессе ПБТ с использованием интерферонов. Было обнаружено, что на 2 неделе лечения уровень CCL20/MIP3α оказался значительно выше у пациентов, не ответивших на ПБТ, по сравнению с ответившими на лечение.

Из литературных источников известно, что увеличение концентрации CCL2/MCP-1 у пациентов с ХГС связано с прогрессией фиброза [3, 17, 23, 36], а также с развитием осложнений ХГС, в частности развитием васкулитов [10]. В нашем исследовании корреляции концентрации CCL2/MCP-1 со степенью фиброза при ХГС не наблюдается. Однако анализ показал, что у пациентов в группе с фиброзом печени в процессе ПБТ заметно колебался уровень хемокина CCL2/MCP-1. Происходило выраженное нарастание этого показателя в сыворотке крови пациентов на 12-ой неделе терапии с последующим снижением к окончанию лечения.

В процессе статистической обработки полученных в результате исследования данных, с помощью метода Краскела—Уоллиса, с достоверностью ($p = 0,039$ и $p = 0,01$) был выявлен рост процентного содержания CTL CXCR3⁺ и NK CXCR3⁺ в первой группе пациентов и рост NK CXCR3⁺ и TNK CCR6⁺ ($p = 0,0007$ и $p = 0,04$) во второй. Этот рост должен быть связан с усилением Т-клеточного ответа при проведении ПБТ с использованием пегилированных интерферонов у пациентов с ХГС.

С другой стороны, если рассматривать изменения относительного содержания этих Т-клеток по рисунку 5, то видно, что с 0 по 12 неделю противовирусной терапии происходил заметный рост CTL CXCR3⁺ в первой группе пациентов, а с 12 по 24 неделю — слабое снижение этих показателей. Похожий результат был получен в работе [37], где анализ изменения Т-клеток при ПБТ пациентов с острым ВГС показал рост клеток на начальном этапе терапии (с 0 по 12 неделю) и снижение в дальнейшем (с 12 по 24 неделю). В то же время в работе [30] утверждается, что Т-клеточный ответ снижался во время удачной ПБТ острого ВГС, а также мощный ВГС-специфический Т-клеточный ответ сохранялся у пациентов с вирусологическим прорывом в процессе ПБТ. С другой стороны, в работе [20], наоборот, показано, что в процессе ПБТ с использованием интерферонов увеличивается относительное содержание CD4⁺Т-клеток у пациентов, развивших после терапии УВО (устойчивый вирусологический ответ), особенно в сравнении с уровнем Т-клеток CD4⁺ перед терапией и у не получивших ПБТ пациентов с ХГС. В работе [21] также сообщается, что при терапии ХГС пегилированным интерфероном УВО был связан с ростом Т-клеточного иммунного ответа, хотя в [31] не прослеживается связи Т-клеточного ответа с результатами терапии. Возможно, как указано в [15], на эти выводы может влиять тот факт, что исследовалось содержание Т-клеток в периферической крови пациентов, а не в биоптатах печени. Поэтому требуется дальнейшее исследование этого вопроса.

Также в процессе данного исследования было обнаружено статистически достоверное снижение относительного содержания В-лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3-рецептор, у пациентов первой группы, развивших ВО ($p = 0,0003$) в процессе ПБТ.

В зарубежной литературе имеются разрозненные сведения об активации В-лимфоцитов

у пациентов с ХГС в печени и периферической крови в сравнении со здоровыми людьми. В статье [24] говорится о снижении содержания CD27⁺В-лимфоцитов с CXCR3 в периферической крови пациентов с ХГС и одновременном увеличении этих же лимфоцитов в тканях печени из-за их перераспределения вблизи очага инфекции. В статье [27] упоминается о высоком уровне CXCR3 В-лимфоцитов в сравнении с низким содержанием в периферической крови CD8⁺Т-лимфоцитов и NK-клеток у пациентов с ХГС перед проведением ПБТ в сравнении со здоровыми.

Имеются данные исследований, говорящих об изменении содержания В-лимфоцитов у пациентов с ХГС в процессе ПБТ. В статье [33] описывается увеличение относительного содержания CD81 В-лимфоцитов у пациентов с ХГС, получавших интерфероновую схему терапии и достигших ВО в дальнейшем. Однако среди пациентов с повышенным уровнем CD81 В-лимфоцитов перед проведением ПБТ оказалось много не ответивших на терапию пациентов. Таким образом, авторы говорят о том, что повышенный уровень CD81 В-лимфоцитов перед ПБТ может быть предиктором неудачи ПБТ у больных с ХГС.

В статье [16] анализируются изменения уровня процентного содержания CD100, CD68, CD69 В-лимфоцитов у пациентов с ХГС до и после ПБТ с использованием интерферонов. Повышенный уровень этих клеток среди пациентов с ХГС в сравнении со здоровыми перед проведением ПБТ нормализуется к окончанию терапии. Таким образом полученные данные о снижении содержания В-лимфоцитов в процессе ПБТ совпадают с результатами зарубежных исследований и говорят о дезактивации гуморального звена иммунитета в результате ПБТ.

Выводы

Таким образом, анализ цитокинов/хемокинов TNF α , CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC в периферической крови больных перед началом терапии с использованием интерферонов в группах пациентов, ответивших и не ответивших на лечение, дает возможность предложить на роль предиктора исхода терапии хемокин CCL20/MIP3 α . Его концентрация в плазме крови пациентов, потерпевших неудачу во время терапии, была более чем в 4 раза выше, чем у пациентов, достигших ВО.

В процессе ПБТ в группе пациентов с отсутствием фиброза печени, достигших ВО, значи-

тельно понижается концентрация CXCL11/ITAC и повышается TNF α , а во второй группе повышается CCL2/MCP-1, что подтверждает их роль в процессе активации клеточного звена иммунитета и элиминации вируса гепатита С из организма.

Во время проведения противовирусного лечения у пациентов, достигших вирусологического ответа, возрастает содержание в периферической крови Т-клеток, несущих на своей повер-

ности хемокиновые рецепторы CXCR3, за счет CTL-лимфоцитов, НК-клеток и ТНК-клеток. Это свидетельствует о том, что Т-клеточный иммунный ответ играет ключевую роль в элиминации вируса гепатита С из организма. Активация Т-клеточного звена иммунитета и снижение В-лимфоцитов с CXCR3-рецептором у пациентов первой группы является прогностически положительным фактором в отношении эффективности терапии с использованием интерферонов.

Список литературы / References

1. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Любимова Н.Е., Останков Ю.В., Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Козлов К.В., Жданов К.В., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 и их лиганды в печени и крови больных хроническим вирусным гепатитом С // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2015. Т. 160, № 8. С. 218-222. [Arsentyeva N.A., Semenov A.V., Lyubimova N.E., Ostankov Yu.V., Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Basina V.V., Esaulenko E.V., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Totolian A.A. Chemokine receptors CXCR3 and CCR6 and their ligands in the liver and blood of patients with chronic hepatitis C. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, Vol. 160, no. 8, pp. 218-222. (In Russ.)]
2. Астанина Н.С., Оспельникова Т.П., Киселев О.И., Эсауленко Е.В., Ершов Ф.И. Хронический гепатит С: прогноз эффективности противовирусной терапии // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 119-122. [Astaniina N.S., Ospelnikova T.P., Kiselev O.I., Esaulenko E.V., Ershov F.I. Chronic hepatitis C: prediction of antiviral therapy effectiveness. *Tsitokiny i vospalenie* = *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 119-122. (In Russ.)]
3. Жданов К.В., Гусев Д.А., Чирский В.С., Сысоев К.А., Якубовская Л.А., Шахманов Д.М., Тотолян А.А. Хроническая HCV-инфекция и экспрессия мРНК CC-хемокинов и их рецепторов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2008. № 4. С. 73-78. [Zhdanov K.V., Gusev D.A., Chirsky V.S., Sysoev K.A., Yakubovskaya L.A., Shakhmanov D.M., Totolian A.A. Chronic HCV-infection and expression of mRNA of CC-chemokines and their receptors. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2008, no. 4, pp. 73-78. (In Russ.)]
4. Пименов Н.Н., Чуланов В.П., Комарова С.В., Карандашова И.В., Неверов А.Д., Михайловская Г.В., Долгин В.А., Лебедева Е.Б., Пашкина К.В., Коршунова Г.С. Гепатит С в России: эпидемиологическая характеристика и пути совершенствования диагностики и надзора // Эпидемиология и инфекционные болезни, 2012. № 3. С. 4-10. [Pimenov N.N., Chulanov V.P., Komarova S.V., Karandashova I.V., Neverov A.D., Mikhailovskaya G.V., Dolgin V.A., Lebedeva E.B., Pashkina K.V., Korshunova G.S. Hepatitis C in Russia: epidemiological characteristics and ways to improve diagnostics and surveillance. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni* = *Epidemiology and Infectious Diseases*, 2012, no. 3, pp. 4-10. (In Russ.)]
5. Постановление Правительства Российской Федерации от 1 декабря 2004 года № 715 «Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих (с изменениями на 13 июля 2012 года)». [Decree of the Government of the Russian Federation No. 715 of December 1, 2004 "On approval of the list of socially significant diseases and the list of diseases that are dangerous for others (as amended on July 13, 2012)"].
6. Сысоев К.А., Чухловин А.Б., Тотолян А.А. Диагностическая роль определения хемокинов и их рецепторов при хроническом гепатите С // Клиническая лабораторная диагностика, 2013. Т. 2. С. 23-29. [Sysoev K.A., Chukhlov A.B., Totolyan A.A. Diagnostic role of the determination of chemokines and their receptors in chronic hepatitis C. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, Vol. 2, pp. 23-29. (In Russ.)]
7. Эсауленко Е.В., Никитина О.Е. Обоснование необходимости тройной терапии хронического гепатита С // Инфекционные болезни, 2013. Т. 11, № 2. С. 69-73. [Esaulenko E.V., Nikitina O.E. Rationale of the necessity of triple therapy for chronic hepatitis C. *Infektsionnye bolezni* = *Infectious Diseases*, 2013, Vol. 11, no. 2, pp. 69-73. (In Russ.)]
8. Эсауленко Е.В., Павлова О.О., Го А.А., Осе И.В. Эффективность нового отечественного интерферона альфа-2b в терапии хронического гепатита С: результаты открытого рандомизированного сравнительного исследования // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии, 2007. № 1. С. 29-34.

[Esaulenko E.V., Pavlova O.O., Go A.A., Ose I.V. Efficacy of local drug "Altevir" (interferon alpha-2b) in therapy of chronic hepatitis C: results of the open randomized comparative study. *Klinicheskie perspektivy gastroenterologii, gepatologii* = *Clinical Prospects Gastroenterology, Hepatology*, 2007, no. 1, pp. 29-34. (In Russ.)]

9. Ющук Н.Д., Климова Е.А., Знойко О.О., Кареткина Г.Н., Максимов С.Л., Маев И.В. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2011. 162 с. [Yushchuk N.D., Klimova E.A., Znoyko O.O., Karetkina G.N., Maksimov S.L., Maev I.V. Viral hepatitis: clinic, diagnosis, treatment]. Moscow: GOETAR-Media, 2011. 162 p.

10. Antonelli A., Ferri C., Fallahi P., Ferrari S.M., Frascerra S., Franzoni F., Galetta F., Zignego A.L., Ferrannini E. CXCL10 and CCL2 serum levels in patients with mixed cryoglobulinaemia and hepatitis C. *Dig. Liver Dis.*, 2009, Vol. 41, pp. 42-48.

11. Apolinario A., Diago M., Lo Iacono O., Lorente R., Pérez C., Majano P.L., Clemente G., García-Monzón C. Increased circulating and intrahepatic T-cell-specific chemokines in chronic hepatitis C: relationship with the type of virological response to peginterferon plus ribavirin combination therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2004, Vol. 19, no. 5, pp. 551-562.

12. Bengsch B., Thimme R. CD8⁺ T-cell differentiation in chronic HCV infection. *Future Virol.*, 2011, Vol. 6, pp. 249-258.

13. Butera D., Marukian S., Iwamaye A.E., Hembrador E., Chambers Th.J., di Bisceglie A.M., Charles E.D., Talal A.H., Jacobson I.M., Rice Ch.M., Dustin L.B. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood*, 2005, Vol. 106, no. 4, pp. 1175-1182.

14. Chisari F.V., Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.*, 1995, Vol. 13, pp. 29-60.

15. Feld J.J., Hoofnagle J.H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, 2005, Vol. 436, pp. 967-972.

16. He Y., Guo Y., Zhou Y., Zhang Y., Fan Ch., Ji G., Wang Y., Ma Zh., Lian J., Hao Ch., Yao Zh.Q., Jia Zh. CD100 up-regulation induced by interferon- α on B cells is related to hepatitis C virus infection. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 12, e113338. doi: 10.1371/journal.pone.0113338.

17. Hellier S., Frodsham A.J., Hennig B.J., Klenerman P., Knapp S., Ramaley P., Satsangi J., Wright M., Zhang L., Thomas H.C., Thursz M., Hill A.V.S. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology*, 2003, Vol. 38, pp. 1468-1476.

18. Heydtmann M., Shields Ph., McCaughan G., David A. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2001, Vol. 14, p. 279.

19. Houghton M., Abrignani S. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*, 2005, Vol. 436, p. 961.

20. Kamal S.M., Ismail A., Graham C.S., He Q., Rasenack J.W., Peters T., Tawil A.A., Fehr J.J., Khalifa K.S., Madwar M.M., Koziel M.J. Pegylated interferon alpha therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virus-specific T cell response kinetics. *Hepatology*, 2004, Vol. 39, pp. 1721-1731.

21. Kamal S.M., Fehr J., Roesler B., Peters T., Rasenack J.W. PEG interferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 2002, Vol. 123, pp. 1070-1083.

22. Keffe E.B., Hollinger F.B. Therapy of hepatitis C: Consensus interferon trials. *Hepatology*, 1997, Vol. 26, pp. 101S-107S.

23. Marra F., Romanelli R.G., Giannini C., Failli P., Pastacaldi S., Arrighi M.C., Pinzani M., Laffi G., Montalto P., Gentilini P. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 1999, Vol. 29, pp. 140-148.

24. Mizuochi T., Ito M., Saito K., Kasai M., Kunimura T., Morohoshi T., Momose H., Hamaguchi I., Takai K., Iino Sh., Suzuki M., Mochida S., Ikebuchi K., Yamaguchi K. Possible recruitment of peripheral blood CXCR3⁺ CD27⁺ CD19⁺ B cells to the liver of chronic hepatitis C patients. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2010, Vol. 30, pp. 243-251.

25. Napoli J., Bishop G.A., McGuinness P.H., Painter D.M., McCaughan G.W. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology*, 1996, Vol. 24, pp. 759-765.

26. Negro F., Alberti A. The global health burden of hepatitis C virus infection. *Liver Int.*, 2011, Vol. 31, pp. 1-3.

27. Oliveira I., Carvalho L., Schinoni M., Paraná R., Atta A.M., Atta M.L.B. Peripheral lymphocyte subsets in chronic hepatitis C: Effects of 12 weeks of antiviral treatment with interferon-alpha plus ribavirin. *Microb. Pathog.*, 2016, Vol. 91, pp. 155-160.

28. Peters M., Vierling J., Gershwin M.E., Milich D., Chisari F.V., Hoofnagle J.H. Immunology and the liver. *Hepatology*, 1991, Vol. 13, pp. 977-994.

29. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2017. <https://www.R-project.org>.
30. Rahman F., Heller Th., Sobao Y., Mizukoshi E., Nascimbeni M., Alter H., Herrine S., Hoofnagle J., Liang T.J., Rehermann B. Effects of antiviral therapy on the cellular immune response in acute hepatitis C. *Hepatology*, 2004, Vol. 40, pp. 87-97.
31. Rehermann B., Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, pp. 215-229.
32. Shields P.L., Morland C.M., Salmon M., Shixin Q., Hubscher S.G., Adams D.H. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 163, no. 11, pp. 6236-6243.
33. Soldevila B., Alonso N., Martinez-Arconada M., Morillas R.M., Planas R., Sanmartí A.M., Martínez-Cáceres E.M. A prospective study of T- and B-lymphocyte subpopulations, CD81 expression levels on B cells and regulatory CD4⁺CD25⁺CD127^{low}/FoxP3⁺ T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment. *J. Viral Hepat.*, 2011, Vol. 18, pp. 384-392.
34. Traubaud M.A., Bailly F., Si-Ahmed S.N., Chevallier P., Sepetjan M., Colucci G., Trépo C. Comparison of HCV RNA assays for the detection and quantification of hepatitis C virus RNA levels in serum of patients with chronic hepatitis C treated with interferon. *J. Med. Virol.*, 1997, Vol. 52, pp. 105-112.
35. Yamauchi K., Akbar S.M.F., Horiike N., Michitaka K., Onji M. Increased serum levels of macrophage inflammatory protein-3α in chronic viral hepatitis: prognostic importance of macrophage inflammatory protein-3α during interferon therapy in chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.*, 2002, Vol. 9, no. 3, pp. 213-220.
36. Wald O., Weiss I.D., Galun E., Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: Pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine*, 2007, Vol. 39, pp. 50-62.
37. Wiegand J., Cornberg M., Aslan N., Schlaphoff V., Sarrazin C., Kubitschke A., Buggisch P., Ciner A., Jaeckel E., Manns M.P., Wedemeyer H. Fate and function of hepatitis-C-virus-specific T-cells during peginterferon-alpha2b therapy for acute hepatitis C. *Antivir. Ther.*, 2007, Vol. 12, no. 3, p. 303.
38. World Health Organization [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <http://www.who.int/hepatitis/en/>. Дата обращения: 13.11.2016. [World Health Organization [Electronic resource]. Access mode: <http://www.who.int/hepatitis/en/>. 13.11.2016].

Авторы:

Басина В.В. — ассистент кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Арсентьева Н.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Бацунов О.К. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; кафедра иммунологии, ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Basina V.V., Assistant Professor, Department of Infectious Diseases in Adults and Epidemiology, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Arsentieva N.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Batsunov O.K., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation; Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Любимова Н.Е. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Семенов А.В. — к.б.н., заведующий лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; кафедра иммунологии, ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Есауленко Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Lyubimova N.E., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Semenov A.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Immunology and Virology of HIV infection, L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation; Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Esaulenko E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Infectious Diseases in Adults and Epidemiology, St. Petersburg State Pediatric Medical University; L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 30.10.2018
Отправлена на доработку 03.11.2018
Принята к печати 29.05.2018

Received 30.10.2018
Revision received 03.11.2018
Accepted 29.05.2018

ПЛЕЙОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ СИМВАСТАТИНА И ФЕНОФИБРАТА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Ширинский И.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский В.С.

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

Резюме. У 66 пациентов с активным РА, получающих стабильные дозы DMARD, сравнивалась клиническая эффективность и безопасность применения симvastатина в дозе 40 мг однократно в сутки в течение 12 недель (33 больных – 1 группа) и фенофибрат 145 мг в сутки в течение 12 недель (33 больных – 2 группа). Первичной конечной точкой было изменение индекса активности болезни с 28-суставным счетом (Disease Activity Score with 28 joint count, DAS28). Симvastатин и фенофибрат статистически значимо снижали показатели DAS28 к концу лечения, умеренный EULAR-ответ и ACR20-ответ при приеме фенофибрат выявлялись в полтора раза чаще, чем при приеме симvastатина. Серьезных нежелательных явлений в обеих группах больных не зарегистрировано. Клинический эффект был ассоциирован с плеiotропным действием как симvastатина, так и фенофибрат. Оба препарата, помимо противовоспалительного действия, снижали уровень иммунологических маркеров атеросклероза – СРБ и IL-6. У пациентов, принимавших симvastатин по окончании курса терапии, зарегистрировано снижение уровня сывороточного IL-17. В обеих группах больных содержание IL-8, TNF α , IFN γ в сыворотке ПК в конце лечения не изменилось. Прием препаратов не влиял на уровень общего холестерина сыворотки, терапия симvastатином снижала содержание холестерина липопротеидов низкой плотности и увеличивала содержание холестерина липопротеидов высокой плотности. У больных, получавших фенофибрат, отмечено снижение уровня триглицеридов. Заключение, что симvastатин и фенофибрат у больных РА с высоким риском развития атеросклероза, не адекватно отвечающих на прием стандартных DMARD, являются препаратами выбора. Разработка показаний для приема каждого из них требует более масштабных сравнительных исследований.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, симvastатин, фенофибрат, DAS28, плеiotропный эффект

PLEIOTROPIC EFFECTS OF SIMVASTATIN AND FENOFIBRATE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS: A COMPARATIVE STUDY

Shirinsky I.V., Kalinovskaya N.Yu., Shirinsky V.S.

Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. We compared clinical efficacy and safety of simvastatin (40 mg daily) for 12 weeks (n = 33, group 1) vs fenofibrate (145 mg daily) for 12 weeks (n = 33, group 2) in patients with active RA taking stable doses of

Адрес для переписки:

Ширинский Иван Валерьевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630047, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (923) 107-51-00.
Факс: 8 (383) 228-25-47.
E-mail: ivan.shirinsky@gmail.com

Address for correspondence:

Shirinsky Ivan V.
Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630047, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (923) 107-51-00.
Fax: 7 (383) 228-25-47.
E-mail: ivan.shirinsky@gmail.com

Образец цитирования:

И.В. Ширинский, Н.Ю. Калиновская, В.С. Ширинский
«Плеiotропное действие симvastатина
и фенофибрат у больных ревматоидным артритом:
сравнительное исследование» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 121–128.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-121-128
© Ширинский И.В. и соавт., 2019

For citation:

I.V. Shirinsky, N.Yu. Kalinovskaya, V.S. Shirinsky
“Pleiotropic effects of simvastatin and fenofibrate in patients
with rheumatoid arthritis: a comparative study”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019,
Vol. 21, no. 1, pp. 121–128.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-121-128
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-121-128

DMARDs. Changes in the Disease Activity Score (DAS28) with 28 joints count was the primary endpoint. Both simvastatin and fenofibrate treatment resulted in statistically significant decrease in DAS28 scores, the patients taking fenofibrate developed moderate EULAR and ACR20 responses 1.5 times more frequently than the patients taking simvastatin. There were no serious adverse events in either group. Clinical response was associated with pleiotropic effects, both in simvastatin- and fenofibrate-treated groups. Both drugs resulted in decrease of atherosclerosis immunological markers (CRP and IL-6 levels). At the end of treatment, we observed a decrease in serum IL-17 in patients taking simvastatin. No changes in serum IL-8, TNF α , and IFN γ were observed in both groups. The total cholesterol concentrations did not change, whereas simvastatin treatment resulted in decreased serum LDL cholesterol, while increasing serum HDL cholesterol levels. There was a decrease of triglyceride concentrations in patients taking fenofibrate. In conclusion, simvastatin and fenofibrate can be considered as drugs of choice in RA patients with high risk of atherosclerosis who do not respond to conventional DMARDs. There is a need for larger comparative studies, in order to define detailed guidelines for their use.

Keywords: *rheumatoid arthritis, simvastatin, fenofibrate, DAS28, pleiotropic effect*

Введение

В последние десятилетия все большее внимание клиницистов разных специальностей, сотрудников органов здравоохранения, страховых компаний привлекает проблема сопутствующих заболеваний — коморбидность (полипатии). Оказалось, что наличие у больного более двух-трех заболеваний является, скорее, правилом, чем исключением [1, 2]. Коморбидные заболевания существенно меняют клинические проявления болезней входящих в полипатию, характер и тяжесть их осложнений, что затрудняет диагностику, прогноз и лечение [3, 4]. Особые формы коморбидных заболеваний синтропии, вероятно, имеют сходные генетические, эпигенетические, патогенетические механизмы, и их фенотип не есть простая сумма отдельных заболеваний [2, 5].

Ревматоидный артрит (РА), псориаз, другие аутоиммунные заболевания являются независимыми предикторами сердечно-сосудистых заболеваний [6]. Основной причиной их развития является раннее формирование и ускоренное прогрессирование синтропной коморбидной патологии — атеросклеротического поражения сосудов, обуславливающего развитие инфаркта миокарда, инсульта, застойной сердечной недостаточности и внезапной смерти [7]. При хроническом воспалении изменения в иммунной системе сопряжены с изменениями липидного обмена в крови, печени, жировой и других тканях [8]. Описаны два основных механизма интеграции метаболизма липидов и иммунного ответа. Первый связан с активностью фермента 3-гидрокси-3-метил коэнзим А-редуктазы (ГМГ-КоА-редуктазы), участвующего в синтезе холестерина, продуктов его промежуточного обмена — изопrenoидов [9]. Второй — с активностью ядерных рецепторов, активируемых пероксисомным пролиферато-

пом α (peroxisome proliferator-activated receptors α (PPAR α)) [10]. Предполагается, что нарушение функции этих структур — фермента и ядерного рецептора — лежит в основе общности патогенеза аутоиммунных заболеваний и атеросклероза и является основанием для применения препаратов, модулирующих эти мишени и обладающих многоцелевым действием.

К числу этой группы препаратов можно отнести ингибиторы ГМГ КоА-редуктазы (статины) и агонисты PPAR α (фибраты) [9, 10], благодаря наличию у них не только липидкорректирующих и антиатерогенных свойств, но и противовоспалительных, иммуномодулирующих и других фармакологических эффектов. Ранее нами было показано, что применение фенофибратов у больных РА приводило к двенадцатой неделе лечения к статистически значимому уменьшению воспаления в суставах, снижению СОЭ, уровня С-реактивного протеина, IL-6, триглицеридов в сыворотке ПК [11].

Прием другого препарата с плейотропным действием, симвастина, на фоне применения стандартных болезнь-модифицирующих препаратов (DMARD), больными РА также уменьшал выраженность воспаления в суставах, показатели активности системного воспаления, содержание IL-6, IL-17 в конце двенадцатой недели лечения [12]. Итак, оба препарата продемонстрировали многоцелевое действие, хорошую переносимость, однако остается неясным, какому из них следует отдать предпочтение в лечении.

Цель исследования — провести сравнительную оценку клинической эффективности и безопасности применения симвастина и фенофибратов, различий их фармакодинамики у больных РА, принимающих стандартные DMARD с сохраняющейся активностью воспаления.

Материалы и методы

В открытое сравнительное исследование было включено 66 пациентов с активным РА. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИФКИ. Перед включением в исследование все пациенты подписали форму добровольного информированного согласия.

Основными критериями включения были:

- возраст от 18 до 60 лет;
- РА, удовлетворяющий пересмотренным критериям Американской коллегии ревматологов 1987 года [13];
- активный РА, определяемый с числом припухших суставов ≥ 6 и одним из перечисленных ниже критериев:
 - количество болезненных суставов ≥ 9 ;
 - утренняя скованность ≥ 30 минут;
 - СОЭ ≥ 28 мм/час.

Пациенты могли получать любые DMARD (Disease-modifying anti rheumatic drugs) в стабильной дозировке за 1 месяц до включения в исследование. В течение всего времени наблюдения запрещалось увеличивать дозу DMARD или принимать новые DMARD.

Дополнительно к проводимой терапии DMARD первой группе больных (33 человека) назначался симвастатин в дозе 40 мг однократно в сутки в течение 12 недель, второй группе (33 больных) — фенофибрат 145 мг в сутки в течение 12 недель. Первичной конечной точкой было изменение индекса активности болезни с 28-суставным счетом (Disease activity score with 28 joint count, DAS28), основанного на числе припухших и болезненных суставов, уровне СОЭ и общей оценке состояния здоровья пациентом по визуальной аналоговой шкале (ВАШ) [14]. Помимо этого, у пациентов регистрировали продолжительность утренней скованности, уровень боли по ВАШ, степень влияния артрита на качество жизни с помощью опросника состояния здоровья (Health Assessment Questionnaire, HAQ) [15], активность болезни, оцениваемую по ВАШ пациентом и врачом. Проводилась оценка ответа на лечение в соответствии с критериям Европейской антиревматической лиги (European League Against Rheumatism, EULAR) [16].

Визиты проводились 1 раз в 4 недели. На каждом визите осуществлялась оценка эффективности и безопасности, включавшая клиническое и лабораторное обследование, определение активности трансаминаз в сыворотке крови.

Методы определения биомаркеров (содержание СРБ, цитокинов, липидов) в сыворотке ПК описаны ранее [11, 12].

Методы статистического анализа включали описательную статистику, представленную медианой, 25 и 75 квартилями. Для сравнения непрерывных параметров использовали непараметрический критерий Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены базовые характеристики обследованных больных. Видно, что пациенты, получавшие симвастатин, были несколько моложе лиц сравняемой группы, у них статистически значимо было больше число припухших суставов, что не привело к различиям в показателях DAS28. Помимо этого, обе группы различались по числу пациентов, получавших метотрексат, сульфасалазин и комбинированную терапию.

Из таблицы 2 следует, что прием симвастатина и фенофибрата статистически значимо снижал интегральный показатель активности РА DAS28 к концу 12 недели лечения и его компоненты: число припухших суставов и СОЭ.

Примечательно, что в группе больных, принимавших фенофибрат, снижение активности болезни по DAS28 зарегистрировано на 8 неделе лечения, а снижение СОЭ — к концу первого месяца терапии.

Следует отметить, что умеренный EULAR-ответ и ACR20-ответ при приеме фенофибрата выявлялись в полтора раза чаще, чем при приеме симвастатина.

Оба препарата хорошо переносились больными, серьезных нежелательных явлений за все время наблюдения зарегистрировано не было. У одного пациента, принимавшего фенофибрат, отмечено незначительное повышение трансаминаз, которое не потребовало отмены препарата. У двоих больных после четвертой недели приема симвастатина было выявлено повышение активности трансаминаз более трех верхних границ нормы, потребовавшее в одном случае уменьшения дозы препарата и отмены — в другом.

При оценке изменений некоторых биомаркеров в конце лечения (табл. 3) обращали на себя внимание сходство и различия фармакодинамики использованных препаратов. Так, в обеих группах больных снизился уровень системного показателя воспаления СРБ, содержание IL-6 уменьшилось в группе больных, получавших фенофибрат, а у пациентов, принимавших симвастатин, — только в подгруппе ответивших на терапию по критериям EULAR. В группе пациентов, принимавших симвастатин, по окончании курса зарегистрировано снижение уровня сывороточного IL-17, тогда как в группе срав-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ, ПРИНИМАВШИХ ФЕНОФИБРАТ И СИМВАСТАТИН, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS TAKING FENOFIBRATE AND SIMVASTATIN, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Демографические и клинические характеристики Demographic and clinical characteristics	Фенофибрат Fenofibrate n = 33	Симвастатин Simvastatin n = 33
Возраст, лет Age, years	61,6 (54,0-65,1)	51 (46-68)
Мужчины Males	5 (15,1%)	4 (12,2%)
Женщины Females	28 (84,8%)	29 (87,8%)
Длительность заболевания, лет Disease duration, years	8,1 (2,3-19,5)	8 (3-13)
Клинические показатели Clinical parameters		
DAS28	6,2 (5,6-6,9)	6, 7 (6,1-7,5)
Число припухших суставов Swollen joint count	7 (6-12)	11 (8-14)*
Утренняя скованность, мин Morning stiffness, min	220 (140-650)	150 (65-430)
Оценка уровня боли (ВАШ), мм VAS pain, mm	51 (40-61)	55 (42-65)
Оценка активности заболевания врачом (ВАШ), мм VAS physician assessment of disease activity, mm	53 (49-66)	60,5 (51-70)
Оценка общего состояния здоровья пациентом (ВАШ), мм VAS physician assessment of global health, mm	54 (46,0-69,5)	60 (51-70)
Оценка активности заболевания пациентом (ВАШ), мм VAS patient assessment of global health, mm	58 (49-66)	66,6 (50-75)
Оценка по шкале HAQ HAQ scale assessment	1,62 (1,1-2,1)	1,62 (1,07-2,00)
Прием болезнь-модифицирующих препаратов Disease modifying anti-rheumatic drugs		
Метотрексат Methotrexate	31 (93,9%)	21(63,6%)
Сульфасалазин Sulfasalazine	1 (3,03%)	8 (24,3%)
Азатиоприн Azathioprine	1 (3,03%)	0
Комбинированная терапия Combination therapy	0	4 (12,1%)
Лабораторные показатели Laboratory parameters		
СОЭ ESR	43 (30-58)	39 (28-59)

Примечание. Число больных, получавших DMARD, дано в абсолютных и относительных значениях,

* – $p < 0,05$.

Note. Numbers of patients receiving DMARDs are given in absolute and relative terms; *, $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ СИМВАСТАТИНА И ФЕНОФИБРАТА У БОЛЬНЫХ РА, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CLINICAL EFFICACY OF SIMVASTATIN AND FENOFIBRATE IN PATIENTS WITH RA, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Неделя 0 лечения симвастатином Week 0 of simvastatin treatment (n = 33)	Неделя 12 лечения симвастатином Week 12 of simvastatin treatment (n = 33)	Неделя 0 лечения фенофибратом Week 0 of fenofibrate treatment (n = 33)	Неделя 12 лечения фенофибратом Week 12 of fenofibrate treatment (n = 33)
DAS28	6,7 (6,1-7,5)	5,7 (5,2-6,7)*	6,2 (5,6-6,9)	4,8 (2,7-5,8)*
Число припухших суставов Swollen joint count	11 (8-14)	8 (5-13)*	7 (6-12)	3 (0-8)*
Число болезненных суставов Tender joint count	20 (14-26)	13 (8-20)	18 (9-24)	13 (3-19)*
СОЭ (мм/час) ESR (mm/h)	39 (28-59)	30 (16-46)*	37 (30-58)	14 (5-28)*
HAQ	1,75 (1,31-2,19)	1,31 (1,00-1,81)*	1,62 (1,16-2,11)	1,22 (1,05-1,60)*

Примечание. * – $p < 0,05$.

Note. *, $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ СРБ, IL-6, IL-17 В СЫВОРОТКЕ ПК ПРИ ЛЕЧЕНИИ ФЕНОФИБРАТОМ И СИМВАСТАТИНОМ В ДИНАМИКЕ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. SERUM CONCENTRATIONS OF CRP, IL-6, AND IL-17 DURING TREATMENT WITH FENOFIBRATE AND SIMVASTATIN, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Неделя 0 лечения симвастатином Week 0 of simvastatin treatment (n = 33)	Неделя 12 лечения симвастатином Week 12 of simvastatin treatment (n = 33)	Неделя 0 лечения фенофибратом Week 0 of fenofibrate treatment (n = 33)	Неделя 12 лечения фенофибратом Week 12 of fenofibrate treatment (n = 33)
СРБ, мг/л CRP, mg/l	21 (15,4-42,3) n = 33	13,3 (8,4-19,6) n = 33*	20,35 (16,7-39,2) n = 33	12,2 (10,2-21,5) n = 33*
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	26,7 (11,4-41,1) n = 11	9,5 (5,6-26,8) n = 11*	17,5 (10,2-27,5) n = 33	10,6 (6,4-15,5) n = 33*
IL-17, пг/мл IL-17, pg/ml	140,3 (70,1-202,4) n = 33	79,3 (14,6-123,2) n = 33*	115,6 (54,0-156,6) n = 33	89,3 (66,4-141,0) n = 33

Примечание. * – $p < 0,05$.

Note. *, $p < 0.05$.

нения изменения этого показателя в динамике лечения не выявлено. В обеих группах больных содержание IL-8, TNF α , IFN γ в сыворотке ПК в конце лечения не изменилось.

Примечательно, что оба препарата не влияли на уровень общего холестерина сыворотки,

однако на субфракции липидов действовали неодинаково. После лечения симвастатином зарегистрировано снижение содержания холестерина липопротеидов низкой плотности и увеличение холестерина липопротеидов высокой плотности [17]. У больных, получавших фенофибрат,

в конце лечения отмечено снижение уровня триглицеридов [11]. Это далеко не полные сведения о фармакодинамике имвастатина и фенофибрат, и в результате дальнейших исследований, можно ожидать другие сходства и различия в точках приложения препаратов. Важно главное: препараты, один из которых является антагонистом фермента, а другой — агонистом ядерного гормонального рецептора, при использовании у больных РА оказали плеiotропное фармакологическое действие — противовоспалительное, иммуномодулирующее и липидкорректирующее. Учитывая, что СРБ и IL-6 являются иммунологическими маркерами атеросклероза [18], и их содержание в сыворотке к концу лечения снизилось в обеих группах, можно говорить еще об одном свойстве симвастатина и фенофибрат у больных РА — антиатерогенном. Следует отметить, что прием фенофибрат был более эффективен, поскольку умеренный EULAR-ответ и ACR20-ответ на фенофибрат регистрировались в полтора раза чаще, чем на прием симвастатина. Различия клинической эффективности объясняются, вероятно, различиями молекулярных мишеней и механизмов противовоспалительного действия препаратов [9, 10].

Молекулярные механизмы противовоспалительного действия агонистов PPAR α связывают с подавлением активности NF- κ B [10]. Помимо этого, агонисты PPAR α способны уменьшать продолжительность воспаления за счет снижения действия его лиганда лейкотриена, который является мощным провоспалительным медиатором и хемоаттрактантом. Предполагается наличие у PPAR α агонистов еще одного фармакологического эффекта — противоостеопоретического, вследствие ингибиции активности остеокластов [19]. Клиническую значимость этого эффекта еще предстоит выяснить.

В последнее десятилетие получены данные об ингибирующем действии статинов на разнообразные функции клеток иммунной системы — субпопуляции лимфоцитов, макрофагов, натуральных киллеров, нейтрофилов, а также эндотелиоцитов [9]. Иммуномодулирующие эффекты статинов обусловлены снижением содер-

жания промежуточных продуктов синтеза холестерина — изопреноидов. Они осуществляют пренилирование ряда внутриклеточных белков, выполняющих роль «молекулярных переключателей» и участвующих в процессах пролиферации, дифференцировки и направленного движения разных клеток, реализующих воспаление и иммунный ответ. Кроме того, статины подавляют презентацию антигена и смещают баланс Т-хелперов в сторону усиления активности Т-хелперов второго типа и уменьшения активности Т-хелперов первого типа. Ранее нами было показано, что статины преимущественно действуют на антиген-специфическую активацию лимфоцитов, поскольку уменьшают collagen II-индуцированную пролиферацию мононуклеаров ПК больных РА и продукцию ими IFN γ *in vitro* [20, 21].

Итак, представленные результаты демонстрируют принципиальную возможность лечения препаратами, направленными на узловое звено патогенеза синтропных коморбидных заболеваний, в частности РА, с высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний и обладающих многоцелевым действием. Условно такой вид лечения назван нами «узловая терапия» [22]. Перспективность этого терапевтического подхода очевидна, поскольку он предполагает использование у больных полипатией препаратов с селективной точкой приложения и плеiotропным эффектом, является альтернативой полипрагматии и, следовательно, уменьшает прямые затраты на лечение.

Результаты исследования позволяют предполагать, что симвастатин и фенофибрат у больных РА с дислипидемией и высоким риском развития атеросклероза, не адекватно отвечающих на стандартные DMARD, являются препаратами выбора. Определение показаний для приема каждого из них требует результатов более масштабных сравнительных исследований, которые бы учитывали не только их эффективность, безопасность, фармакодинамику, но и фармакоэкономическое преимущество, а также предпочтения пациентов.

Список литературы / References

1. Арьева Г.Т., Советкина Н.В., Овсянникова Н.А., Арьев А. П. Коморбидные мультиморбидные состояния в гериатрии (обзор) // Успехи геронтологии, 2011. Т. 24, № 4. С. 612-619. [Aryeva G.T., Sovetkina N.V., Ovsyannikova N.A., Aryev A.P. Comorbid multimorbid states in geriatrics (review). *Uspekhi gerontologii = Advances in Gerontology*, 2011, Vol. 24, no. 4, pp. 612-619. (In Russ.)]
2. Насонов Е.Л. Иммунологические маркеры атеросклероза // Терапевтический архив, 2002. № 5. С. 57-60. [Nasonov E.L. Immunological markers of atherosclerosis. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, no. 5, pp. 57-60. (In Russ.)]
3. Ширинский В.С., Половникова О.А., Калиновская Н.Ю., Ширинский И.В. Клиническая эффективность и безопасность применения агониста рецептора пероксисомного пролифератора альфа у больных

ревматоидным артритом – открытое контролируемое исследование // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 71-80. [Shirinsky V.S., Polovnikova O.A., Kalinovskaya N.Yu., Shirinsky I.V. Clinical efficacy and safety of peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists in rheumatoid arthritis: an open-label controlled study. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 71-80. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-71-80.

4. Ширинский В.С., Ширинский И.В. Коморбидные заболевания – актуальная проблема клинической медицины // Сибирский медицинский журнал, 2014. Т. 29, № 1. С. 7-12. [Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Comorbid diseases as an important problem of clinical medicine. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2014, Vol. 29, no. 1, pp. 7-12. (In Russ.)]

5. Ширинский В.С., Ширинский И.В. Узловая терапия – новая возможность лечения коморбидных заболеваний // Сибирский медицинский журнал, 2014. Т. 29, № 4. С. 13-21. [Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Hub therapy as a new opportunity for treatment of comorbid diseases. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2014, Vol. 29, no. 4, pp. 13-21. (In Russ.)]

6. Ширинский И.В., Желтова О.И., Соловьева Н.Ю., Ширинский В.С. Влияние статинов на пролиферацию лимфоцитов при ревматоидном артрите // Аллергология и иммунология, 2007. № 4. С. 380-383. [Shirinsky I.V., Zheltova O.I., Solovyova N.Yu., Shirinsky V.S. Effects of statins on lymphocyte proliferation in rheumatoid arthritis. *Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology*, 2007, no. 4, pp. 380-383. (In Russ.)]

7. Ширинский И.В., Желтова О.И., Ширинский В.С., Козлов В.А. Влияние симвастатина на активность болезни и содержание холестерина субфракций липопротеидов сыворотки крови у больных ревматоидным артритом // Терапевтический архив, 2008. № 8. С. 63-65. [Shirinsky I.V., Zheltova O.I., Shirinsky V.S., Kozlov V.A. Simvastatin effects on the disease activity and cholesterol content in blood serum lipoprotein subfractions in patients with rheumatoid arthritis. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2008, no. 8, pp. 63-65. (In Russ.)]

8. Ширинский И.В., Желтова О.И., Ширинский В.С., Козлов В.А. Эффективность и безопасность симвастатина у больных ревматоидным артритом – открытое контролируемое исследование // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 4-5. С. 477-482. [Shirinsky I.V., Zheltova O.I., Shirinsky V.S., Kozlov V.A. Efficacy and safety of simvastatin in rheumatoid arthritis: an open-label, controlled study. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 4-5, pp. 477-482. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-4-5-477-482.

9. Ширинский И.В., Козлов В.А., Ширинский В.С. Использование статинов – новый подход к терапии аутоиммунных заболеваний // Вестник РАМН, 2009. № 2. С. 26-32. [Shirinsky I.V., Kozlov V.A., Shirinsky V.S. The use of statins, a new approach to the treatment of autoimmune diseases. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2009, Vol. 2, pp. 26-32. (In Russ.)]

10. Ширинский И. В., Ширинский В. С. Влияние статинов на антигенспецифическую активацию лимфоцитов больных ревматоидным артритом – исследование *in vitro* // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 1. С. 77-80. [Shirinsky I.V., Shirinsky V.S. Effects of statins upon antigen-specific lymphocyte activation in patients with rheumatoid arthritis: an *in vitro* study. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 1, pp. 77-80. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-1-77-80.

11. Пузырев В.П. Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии у человека // Медицинская генетика, 2008. № 9. С. 3-9. [Puzyrev V.P. Genetic view on the phenomenon of combined pathology in human. *Meditsinskaya genetika = Scientific and Practical Journal Medical Genetics*, 2008, Vol. 9, pp. 3-9. (In Russ.)]

12. Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., McShane D.J., Fries J.F., Cooper N.S., Healey L.A., Kaplan S.R., Liang M.H., Luthra H.S., Medsger T.A., Mitchell D.M., Neustadt D.H., Pinals R.S., Schaller J.G., Sharp J.T., Wilder R.L., Hunder G.G. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1988, Vol. 31, pp. 315-324.

13. Fries J.F., Spitz P., Kraines R.G., Holman H.R. Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1980, Vol. 23, pp. 137-145.

14. Kidani Y., Bensinger S.J. Liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor as integrators of lipid homeostasis and immunity. *Immunol. Rev.*, 2012, Vol. 249, pp. 72-83.

15. Marti S. Body weight and comorbidity predict mortality in COPD patients treated with oxygen therapy. *Eur. Respir. J.*, 2006, Vol. 27, no. 4, pp. 689-696.

16. Miguel A. Comorbidity and mortality in peritoneal dialysis. *Nephron*, 2002, Vol. 90, no. 3, pp. 290-296.

17. Okamoto H., Iwamoto T., Kotake S., Momohara S., Yamanaka H., Kamatani N. Inhibition of NF-kappa B signaling by fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, presents a therapeutic strategy for rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2005, Vol. 23, pp. 323-330.

18. Prevoo M.L., van't Hof M.A., Kuper H.H., van Leeuwen M.A., van de Putte L.B., van Riel P.L. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1995, Vol. 38, pp. 44-48.

19. Serio B., Sulli A., Burroni A., Cutolo M. Rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Reumatismo*, 2003, Vol. 55, pp. 140-146.

20. Shirinsky I.V., Shirinsky V. S. Targeting nuclear hormone receptors: PPAR alpha agonists as potential disease-modifying drugs for rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheumatol.*, 2011, Vol. 2011, 937843. doi: 10.1155/2011/937843.

21. van Gestel A.M., Prevoo M.L., van't Hof M.A., van Rijswijk M.H., van de Putte L.B., van Riel P.L. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum.*, 1996, Vol. 39, pp. 34-41.

22. van Halm V., Peters M., Voskuyl A., Boers M., Lems W., Visser M. Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-section study, the CARRE Investigation. *Ann. Rheum. Dis.*, 2009, Vol. 68, pp. 1395-1400.

Авторы:

Ширинский И.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Калиновская Н.Ю. — к.м.н., лаборант-исследователь лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

Authors:

Shirinsky I.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kalinovskaya N.Yu., PhD (Medicine), Laboratory Research Assistant, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Поступила 26.02.2018
Отправлена на доработку 06.03.2018
Принята к печати 07.03.2018

Received 26.02.2018
Revision received 06.03.2018
Accepted 07.03.2018

ЭФФЕКТЫ ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО СТАТУСА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Колесникова О.В.¹, Петренко Т.И.^{1,2}, Колпакова Т.А.²,
Труфакин В.А.³

¹ ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

³ ФГБУ «Томский научно-исследовательский центр» СО РАН, г. Томск, Россия

Резюме. Проведено исследование иммунных показателей у больных впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких в процессе специфической противотуберкулезной терапии. Исследование проводилось в три этапа: при госпитализации до начала терапии, через 2 месяца и 4 месяца лечения. В зависимости от вида лечения больные были разделены на две группы: группа сравнения, принимающая стандартную противотуберкулезную терапию (СПТ, $n = 33$), и группа антистрессовой нейротехнологической коррекции (НТК, $n = 35$), которой, наряду со стандартным лечением, дополнительно проводили сеансы аудио-визуально-вибротактильной стимуляции (АВВС, 2–3 сеанса в неделю по 30 мин на протяжении 4 месяцев). Клинические группы наблюдения сравнивались с группой контрольных испытуемых (КИ). Показано, что на момент госпитализации и до лечения по совокупности исследуемых иммунных показателей группы пациентов достоверно не различались между собой. Установлено, что пациенты обеих групп при поступлении в стационар характеризовались снижением количества и активности фагоцитирующих моноцитов и гранулоцитов по сравнению с группой КИ. Важным является факт, что в процессе терапии к концу 4-го месяца наблюдений в группе НТК по сравнению с группой СПТ достоверно увеличивались количество и активность фагоцитирующих моноцитов ($p < 0,01$) и фагоцитирующих гранулоцитов ($p < 0,05$). Одновременно в группе НТК полностью распадались терапевтическим путем у 90,5% пациентов, а в группе СПТ – у 45%. Полученные результаты свидетельствуют об обоснованности комплексного применения антистрессовых нейротехнологий наряду со специфической химиотерапией при лечении больных впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких.

Ключевые слова: туберкулез легких, антистрессовая терапия, иммунная система, фагоцитоз, натуральные киллеры CD16⁺, полости распада в легких

Адрес для переписки:

Колесникова Ольга Валерьевна
ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства здравоохранения РФ
630132, Россия, г. Новосибирск, ул. Красноярская, 40–18.
Тел./факс: 8 (383) 203–78–25.
E-mail: ola_doc@ngs.ru

Address for correspondence:

Kolesnikova Olga V.
Novosibirsk Tuberculosis Research Institute
630132, Russian Federation, Novosibirsk,
Krasnoyarskaya str., 40, apt 18.
Phone/Fax: 7 (383) 203–78–25.
E-mail: ola_doc@ngs.ru

Образец цитирования:

О.В. Колесникова, Т.И. Петренко, Т.А. Колпакова, В.А. Труфакин «Эффекты психофизиологической коррекции в регуляции иммунного статуса в комплексной терапии больных туберкулезом легких» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 129–136. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-129-136

For citation:

O.V. Kolesnikova, T.I. Petrenko, T.A. Kolpakova, V.A. Trufakin “Effects of psychophysiological neurotherapy in regulation immune response combined with standard antituberculosis drug therapy in acute pulmonary tuberculosis”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 129–136. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-129-136
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-129-136

EFFECTS OF PSYCHOPHYSIOLOGICAL NEUROTHERAPY IN REGULATION IMMUNE RESPONSE COMBINED WITH STANDARD ANTITUBERCULOSIS DRUG THERAPY IN ACUTE PULMONARY TUBERCULOSIS

Kolesnikova O.V.^a, Petrenko T.I.^{a, b}, Kolpakova T.A.^b, Trufakin V.A.^c

^a Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

^c Tomsk Research Medical Center, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to assess optimizing effects of antistress neurotechnologies on the clinical course of acute pulmonary tuberculosis. The study was performed in three steps: upon admission before treatment, followed by repeated examination at 2 and 4 months. The patients before study were divided into the two groups: (1) 33 patients received standard antituberculosis drug therapy (SDT) and (2) 35 cases after standard antituberculosis drug therapy accompanied by neurothechnological anti-stress therapy (NAT). Patients from the NAT group received a regular audio-visual-vibrotactile stimulation as additional therapy (2 to 3 30-min sessions per week during 4 months). By the time of hospitalization, the groups did not differ in their general immune state. The percentages of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺ as well as indexes of phagocyte activity showed some changes after 2 and 4 months of therapy. The patients from both groups before treatment exhibited lymphocytosis, decreased phagocyte activity, when compared to healthy individuals. By the end of therapy (4 months), the patients from the NAT group showed increased phagocytosis by monocytes ($p < 0.01$) and granulocytes ($p < 0.05$) which approached values of healthy control. The study demonstrated also that efficiency of combined therapy was higher in the NAT vs. SDT group: closure of lung destruction cavities was observed in 90.5% of patients from the NAT group vs 45% of patients from the STD group. The results present evidence for combined implementation of neurothechnological anti-stress therapies as a supplementary method for the standard specific drug therapy in primary infiltrative lung tuberculosis.

Keywords: pulmonary tuberculosis, antistress therapy, immune system, phagocytosis, NK cells, CD16⁺, lung destruction foci

Введение

Развитие, течение и исход туберкулезного процесса во многом определяются состоянием иммунной системы организма. Изучение механизмов сложного и многогранного иммунного ответа организма на *M. tuberculosis*, а также точной роли каждого из его компонентов необходимо для оценки их клинической значимости при различных вариантах течения туберкулезного процесса, что в свою очередь может облегчить диагностику и прогнозирование исходов заболевания. В настоящее время накоплены достаточно глубокие знания об иммунных реакциях при туберкулезе. На фоне имеющихся изменений количества клеточных субпопуляций лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4/CD8, CD16⁺, CD19⁺) у больных туберкулезом нарушается координация клеточного взаимодействия и функциональная активность лимфоцитов [4, 7, 10, 11, 12, 17, 19, 21, 24, 25]. Однако одним из основных и ведущих нарушений в иммунной системе при туберкулезе является снижение активности фагоцитирующих клеток [5, 7, 10, 16]. Исследование показателей фагоцитарной активности свидетельствует об ухудшении как поглотительной, так и бактерицидной активности фагоцитарных

клеток у больных туберкулезом легких. Фагоцитарная активность клеток у этих больных отличается сниженным показателем фагоцитоза моноцитами [11], а тенденция к восстановлению этой функции в условиях стандартной химиотерапии весьма низкая [3, 16]. Известно, что противотуберкулезные препараты оказывают токсическое влияние на системы неспецифической резистентности организма и специфический иммунитет, которые обеспечивают регрессию туберкулезного воспаления [3, 5]. Длительное применение сразу нескольких противотуберкулезных препаратов (ПТП) на фоне снижения общей реактивности организма может приводить к истощению клеточных гомеостатических механизмов, что не исключает возможности прямого повреждающего действия ПТП на иммунокомпетентные клетки крови. Выраженное в той или иной степени иммуносупрессивное действие ПТП ограничивает возможности организма в борьбе с туберкулезной инфекцией и требует своевременной диагностики и коррекции иммунных нарушений на всех этапах комбинированной противотуберкулезной химиотерапии [4, 12]. В связи с этим особую актуальность приобретают вопросы повышения эффективности комплексного лечения

больных туберкулезом с привлечением дополнительных альтернативных методов коррекции иммунного статуса. По результатам единичных исследований известно, что включение в комплекс лечения специальных нефармакологических методов коррекции психологического и эмоционального статуса пациентов (например, психотерапии) приводит к существенному повышению эффективности терапии [2, 9, 14, 18]. Доказано, что нарушения психологического и эмоционального статусов отмечаются у больных с различными формами туберкулеза легких, проявляются на разных стадиях специфического процесса — в периоды обследования, лечения и диспансерного наблюдения и, несомненно, оказывают серьезное влияние на течение и исходы заболевания туберкулезом [6, 9, 18].

Метод антистрессовой нейротехнологической коррекции, предлагаемый авторами, основан на использовании эффектов слабых ритмических световых, звуковых и вибротактильных воздействий в частотных диапазонах активности электроэнцефалограммы (4,5–16 Гц). Применение метода АВВС приводит к снятию психического и соматического напряжения, синхронизации гомеостатических систем, нормализации баланса между ветвями симпатической и парасимпатической нервной системы, улучшению функционального состояния иммунной системы, нормализации биоэлектрической активности мозга и межполушарных взаимоотношений. Эффекты релаксации сопровождаются генерацией ярких зрительных образов и ощущением переживания возникающих положительных эмоций всем телом [9, 15, 20, 23]. Мы установили, что сочетание применения метода АВВС повышает эффективность стандартной химиотерапии больных туберкулезом, оказывая влияние на иммунный ответ посредством нормализации психонейро-вегетативных функций.

Целью настоящей работы явилась оценка динамики иммунных показателей у больных впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких в процессе стандартной противотуберкулезной терапии в ответ на сочетанное применение метода психофизиологической коррекции, а также оценка клинического эффекта по показателям динамики закрытия полостей распада в легких и частоты развития побочных реакций на противотуберкулезные препараты.

Материалы и методы

Исследование проведено на больных в возрасте 17–39 лет с впервые выявленной инфильтративной формой туберкулеза. Все больные находились в клинике Новосибирского научно-исследовательского института туберкулеза. В исследование не включали больных, имеющих сопутствующие заболевания сердечно-сосудистой

системы, эндокринной системы, центральной и периферической нервной систем. Группу контрольных здоровых испытуемых (КИ) составили сопоставимые по возрасту, полу практически здоровые добровольцы ($n = 20$, 6 мужчин и 14 женщин). В зависимости от вида лечения больные были разделены на две группы: группа сравнения, принимающая стандартную противотуберкулезную терапию (СПТ, $n = 33$, мужчин — 18, женщин — 15, средний возраст 25,8 лет); группа нейротехнологической коррекции (НТК, $n = 35$, мужчин — 19, женщин — 16, средний возраст 27,0 лет), которой, наряду со стандартным лечением, дополнительно проводили сеансы аудио-визуально-вибротактильной стимуляции (АВВС). Сеансы АВВС (2–3 сеанса в неделю в течение всего периода наблюдения, длительность одного сеанса составляла 30 мин) проводили с помощью системы SENSORIUM (InnerSense, США) [1]. В процессе сеанса АВВС больной находился на специализированном кресле в горизонтальном положении. Источником вибротактильных сигналов являлись 2 сабвуфера мощностью 40 Вт, смонтированные в кресло с проекцией в область грудной клетки и ног пациента. Зрительная и слуховая стимуляция осуществлялась с помощью специальных фотодиодных очков и наушников. Перед началом каждого сеанса АВВС создавалось психотерапевтическое пространство. В первую половину периода наблюдения (до двух месяцев) программы АВВС индуцировали глубокую психическую релаксацию с длительной прогрессивной мышечной релаксацией с выходом в состояние активного бодрствования, во второй половине — аналогичная программа без выхода в состояние активного бодрствования, а с переходом в физиологический сон.

Иммунофенотипирование и определение некоторых функций иммунокомпетентных клеток проводились методом проточной цитофлуориметрии с помощью аналитической системы FACSCalibur (Becton Dickinson, США), с использованием моноклональных антител («Сорбент», «МедБиоСпектр», Москва) к субпопуляциям мононуклеаров периферической крови $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$ и $CD19^+$ лимфоцитам, согласно инструкции, прилагаемой к прибору, отработанной с модификациями В.С. Кожевникова [8]. На проточном цитофлуориметре определялся также процент фагоцитирующих латекс гранулоцитов и моноцитов. Для этого гепаринизированную кровь больного смешивали в соотношении 1:5 с частицами латекса, меченными ФИТЦ в круглодонных планшетах для иммунологических реакций («Медполимер», Санкт-Петербург), и инкубировали 60 мин при 37 °С во влажной камере. Затем содержимое лунок суспендировали, отмывали и переносили в цитометрические пробирки с 450 мкл лизирующе-фиксирующего раствора

(ЛФР) с последующим проведением цитофлуориметрии.

Полученные данные анализировали с помощью методов параметрической (t-тест Стьюдента для сопряженных и независимых выборок) и непараметрической (тесты Вилкоксона и Манна–Уитни) статистики. Достоверность полученных результатов оценивалась при уровнях значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При поступлении в стационар и до начала специфической противотуберкулезной терапии по данным клинических показателей и исследуемым иммунным показателям группы больных нейротехнологической коррекции (НТК) и стандартной противотуберкулезной терапии (СПТ) значимо между собой не различались. Средние значения относительного количества субпопуляций лимфоцитов до лечения и в динамике наблюдения двух клинических групп пациентов и группы КИ представлены в таблице 1. До лечения значения общего количества лимфоцитов у пациентов группы НТК составили 2454 ± 220 , а у пациентов группы СПТ – 2367 ± 149 и достоверно отличались от показателей группы контрольных испытуемых КИ – 1468 ± 119 ($p < 0,05$). К концу 4-го месяца наблюдения в группе СПТ снижение общего количества лимфоцитов происходит достоверно более значимо (2367 ± 149 ; $p < 0,05$), чем у пациентов группы НТК (2177 ± 171 ; $p < 0,05$), однако значения данного показателя и к концу периода наблюдения в обеих группах сравнения были достоверно выше, чем в группе КИ. До лечения и в процессе терапии в обеих клинических группах сравнения относительное количество субпопуляций лимфоцитов $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ значимо не изменялось (табл. 1), за исключением субпопуляции лимфоцитов $CD16^+$, количество которых достоверно уменьшалось в группе СПТ ($14,1 \pm 1,3$; $p < 0,05$).

Особое внимание привлекают результаты исследования в отношении фагоцитирующих моноцитов и гранулоцитов. До лечения у больных обеих клинических групп при сравнении с контрольными испытуемыми наблюдалось выраженное подавление фагоцитоза на гранулоцитах (НТК – $67,8 \pm 2,88$; $p < 0,001$; СПТ – $65,0 \pm 3,97$; $p < 0,001$) и моноцитах (НТК – $42,7 \pm 3,71$; $p < 0,001$; СПТ – $34,7 \pm 3,76$; $p < 0,001$) (табл. 1). В процессе лечения через 2 месяца наблюдения пациенты группы НТК демонстрировали тенденцию к усилению фагоцитарной активности, которая, однако, не достигала, уровня статистической значимости ($p = 0,134$). В группе СПТ наблюдалось дальнейшее снижение показателей количества и активности фагоцитирующих клеток. К концу 4-го месяца терапии показатели фагоцитарной активности иммунной системы

у пациентов обеих клинических групп были достоверно ниже, чем данные показатели в группе КИ. Однако результаты носили разнонаправленный характер: у пациентов группы НТК фагоцитарная активность продолжала расти и уровень ее к 4-му месяцу наблюдений был достоверно выше как на гранулоцитах ($75,3 \pm 3,65$; $p < 0,017$), так и на моноцитах ($52,7 \pm 4,42$; $p < 0,017$), в то время как в группе СПТ наблюдалась, напротив, отрицательная динамика изменений данных показателей (фагоцитоз на гранулоцитах – $63,0 \pm 3,1$; $p < 0,002$, фагоцитоз на моноцитах – $34,0 \pm 3,1$; $p < 0,002$) (табл. 1).

Клинически в процессе терапии в обеих группах у подавляющего большинства пациентов отмечена положительная клиническая динамика по показателям переносимости противотуберкулезных препаратов (ПТП), срокам продолжительности бактериовыделения и закрытия полостей распада. Однако пациенты группы НТК демонстрировали достоверно более выраженную положительную динамику.

В процессе лечения у пациентов обеих групп регистрировалось побочное действие противотуберкулезных препаратов в виде токсических, аллергических и токсико-аллергических реакций (табл. 2). По общему количеству случаев возникновения побочных реакций на противотуберкулезные препараты (ПТП) в процентном соотношении динамика снижения данного показателя оказалась более благоприятной в группе НТК по сравнению с группой СПТ. При оценке показателя распределения пациентов в зависимости от переносимости ПТП оказалось, что в процессе терапии в группе НТК доля случаев возникновения побочных реакций достоверно ниже уже после 1-го месяца применения метода психофизиологической коррекции, а также к 4-му месяцу терапии, по сравнению с группой СПТ ($p < 0,05$).

В исследованных группах пациентов туберкулезный процесс сопровождался образованием полостей распада, которые в группе НТК составляли 59,85% ($n = 21$), а в группе СПТ – 60,60% ($n = 20$). Однако, как видно из таблицы 3, в группе НТК динамика по терапевтическому закрытию полостей распада и срокам прекращения бактериовыделения оказалась достоверно более благоприятной: на 4-м месяце наблюдения в этой группе полости закрылись у 71,4% пациентов, а в группе СПТ – у 20% больных ($p < 0,05$). Срок прекращения бактериовыделения в группе СПТ составил $2,00 \pm 0,24$ месяца, а в группе НТК – $3,27 \pm 0,37$ месяца ($p < 0,05$).

Одним из важных звеньев иммунного ответа при заболевании туберкулезом легких является количество и активность фагоцитирующих клеток. Учитывая данные литературы и данные, полученные нами, уровень фагоцитоза во многом определяет течение и исходы туберкулезного воспаления. У всех пациентов обнаружено выражен-

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ ($M \pm m$) ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ГРУППЕ КОНТРОЛЬНЫХ ИСПЫТУЕМЫХ И ПАЦИЕНТОВ В ГРУППАХ НТК И СПТ (ДАННЫЕ ПАЦИЕНТОВ ПРЕДСТАВЛЕНЫ В ДИНАМИКЕ – ДО ЛЕЧЕНИЯ, ЧЕРЕЗ 2 И 4 МЕСЯЦА ОТ НАЧАЛА ТЕРАПИИ)

TABLE 1. MEAN VALUES ($M \pm m$) IMMUNE-SYSTEM VALUES IN THE REFERENCE AND IN THE GROUPS NAT AND SDT – BEFORE TREATMENT, IN 2 AND 4 MONTHS SINCE THE BEGINNING OF THE TREATMENT

Иммунные показатели Immune system values	Группа контроля Control	Туберкулез легких (инфильтративный, впервые выявленный) Acute pulmonary tuberculosis					
		Группа НТК Group NAT			Группа СПТ Group SDT		
		до лечения before treatment	2 месяца in 2 months	4 месяца in 4 months	до лечения before treatment	4 месяца in 2 months	4 месяца in 4 months
Лимфоцитоз Lymphocytosis	1468±119	2454±220 [#]	2421±237 [#]	2177±171* [#]	2367±149 [#]	2188±170 [#]	1931±92* [#]
CD3 ⁺ , %	57,80±3,65	65,40±2,31	68,00±2,03	64,00±2,09	66,30±2,20	65,30±2,87	62,0±3,0
CD4 ⁺ , %	35,3±2,0	43,70±1,77	41,60±1,79	44,40±2,18	48,10±2,02	45,30±2,54	42,4±2,3
CD8 ⁺ , %	23,20±1,91	32,30±1,88	29,80±1,87	31,80±2,26	30,90±2,28	30,00±2,09	29,0±2,3
CD4/CD8, %	1,50±0,11	1,47±0,09	1,54±0,10	1,53±0,10	1,70±0,13	1,64±0,14	1,63±0,13
CD19 ⁺ , %	9,90±1,44	13,90±1,29	11,90±1,06	11,10±0,85	14,70±1,67	15,30±1,28	15,2±1,7
CD16 ⁺ , %	19,40±2,22	19,80±1,56	18,90±1,68	19,20±1,63*	17,70±1,64	15,60±1,28	14,1±1,3* [#]
Латекс-ФИТЦ гранулоциты, % Phagocytic granulocytes, %	94,60±1,71	67,80±2,88 [#]	67,40±3,51 [#]	75,30±3,65* [#]	65,00±3,97 [#]	71,10±3,08 [#]	63,0±3,1* [#]
Латекс-ФИТЦ моноциты, % Phagocytic monocytes, %	80,10±5,39	42,70±3,71 [#]	50,40±4,31 [#]	52,70±4,42* [#]	34,70±3,76 [#]	41,20±2,94 [#]	34,0±3,1* [#]

Примечание. * – достоверные различия между группами НТК и СПТ ($p < 0,05$); # – достоверные различия ($p < 0,05$) групп НТК и СПТ от контроля.

Note. *, valid differences between groups NAT and SDT ($p < 0.05$); #, valid differences ($p < 0.05$) between groups NAT and SDT from control group.

ное снижение показателей фагоцитарной активности. Показатели фагоцитоза не возвращались к норме и к окончанию 4-го месяца терапии. Это согласуется с данными литературы о том, что при туберкулезе легких, вне зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным химиопрепаратам, до и на фоне лечения отмечается подавление фагоцитарной активности [5, 7, 11, 16]. Однако в группе комплексного лечения с сочетанным применением метода аудио-визуально-вибротактильной стимуляции динамика показателей активности фагоцитоза была значительно более благоприятной, чем в группе стандартной терапии. Учитывая данные нашего исследования, можно говорить о том, что метод АВВС способствует повышению фагоцитарной активности и, как следствие, эффективности лечения больных впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких. Это хорошо иллюстрируется и результатами динамики закрытия полостей распада в легких и нивелированием нежелательных побочных реакций на противо-

туберкулезные препараты. Тот факт, что исследуемые иммунные показатели не нормализуются и в процессе комплексной противотуберкулезной терапии, может быть обусловлен не только туберкулезным воспалением, но и токсическим действием противотуберкулезных препаратов [4].

Таким образом, на основании полученных нами данных можно сделать вывод о том, что у больных впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких отмечаются нарушения показателей фагоцитарной активности. Включение в комплексное лечение больных туберкулезом легких метода антистрессовой нейротехнологической коррекции может оказывать влияние на фагоцитарную активность иммунной системы, что в свою очередь благоприятно воздействует на общие клинические показатели, переносимость противотуберкулезных препаратов, а в случае деструктивных форм инфильтративного туберкулеза легких – на динамику закрытия полостей распада в легких.

ТАБЛИЦА 2. ПЕРЕНОСИМОСТЬ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИДА РЕАКЦИИ, КОЛИЧЕСТВА СЛУЧАЕВ И СРОКОВ ИСЧЕЗНОВЕНИЯ В ГРУППАХ СТАНДАРТНОЙ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ТЕРАПИИ (СПТ) И НЕЙРОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ (НТК)

TABLE 2. TOLERANCE ANTI-TB DRUGS DEPENDING ON THE REACTION, NUMBER OF CASES AND DISAPPEARANCE REACTIONS IN THE GROUPS NAT AND SDT

Срок лечения Time Вид реакции Reaction		НТК NAT (n = 35)				СПТ SDT (n = 33)			
		1 месяц 1 month	2 месяца 2 months	3 месяца 3 months	4 месяца 4 months	1 месяц 1 month	2 месяца 2 months	3 месяца 3 months	4 месяца 4 months
Токсические реакции Toxic reactions	абс. abs %	7 20	2 5,7	0 0	0 0	2 6	1 3	2 6	0 0
Аллергические реакции Allergic reactions	абс. abs %	4 11,4	0 0	0 0	0 0	4 12,1	3 9	0 0	0 0
Токсико-аллергические реакции Toxic with allergic reactions	абс. abs %	3 8,6	0 0	1 2,9	0 0	8 24,2	4 12,1	2 6	2 6
Всего человек Total	абс. abs %	14 40	2 5,7	1 2,9	0 0	14 42,4	8 24,2	4 12,1	2 6

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ГРУПП СРАВНЕНИЯ (НТК И СПТ) К КОНЦУ 4-ГО МЕСЯЦА НАБЛЮДЕНИЯ

TABLE 3. CLINICAL INDICATORS IN THE GROUPS NAT AND SDT 4 MONTHS SINCE THE BEGINNING OF THE TREATMENT

Признак Clinical indicator		Группы пациентов Groups	Группа НТК Group NAT (n = 35)	Группа СПТ Group SDT (n = 33)
Закрытие полостей Closing cavities	абс. abs %		15 71,4*	4 20*
Без закрытия полостей Without closing cavities	абс. abs %		6 28,6*	16 80*
Сроки закрытия (мес.) Closure dates (months)	абс. abs		3,18±0,53*	5,20±0,55*
Продолжительное бактериовыделение (> 3 мес.) (кол-во чел.) Prolonged bacterioexcretion (> 3 months) (of persons)	абс. abs %		6 28,6*	10 50*
Сроки прекращения бактериовыделения (мес.) Time termination of bacterioexcretion (months)	абс. abs		2,00±0,24*	3,27±0,37*

Примечание. Количество больных с наличием распада для группы НТК n = 21, для группы СПТ – n = 20. * – p < 0,05 достоверность между группами НТК и СПТ.

Note. Persons with cavities in the group NAT, n = 21; in the group SDT, n = 20. *, p < 0.05 valid differences between groups NAT and SDT.

Список литературы / References

1. Афтanas Л.И., Байдузжа В.П., Гришчук И.В., Морозова Н.Б., Новопашина А.В., Труфакин В.А. Способ немедикаментозной коррекции психоэмоционального, нейрогормонального и иммунного статусов человека. Патент РФ № 2314132 от 10.01.2008. [Aftanas L.I., Bayduzha V.P., Grishchuk I.V., Morozova N.B., Novopashina A.V., Trufakin V.A. Method of non-pharmacological correction of psychoemotional, neurohormonal and immune status of a person. Patent of the Russian Federation No. 2314132 from 10.01.2008].
2. Баранова Г.В., Золотова Н.В., Стрельцов В.В., Харитонов Н.Ю., Ахтямова А.А., Васильева И.А. Динамика психоэмоционального состояния больных туберкулезом легких на фоне психологического сопровождения противотуберкулезной химиотерапии // Туберкулез и болезни легких, 2016. № 3. С. 46-51. [Baranova G.V., Zolotova N.V., Streltsov V.V., Kharitonova N.Yu., Akhtyamova A.A., Vasilyeva I.A. Changes in psychological and emotional state of pulmonary tuberculosis changes with anti tuberculosis chemotherapy accompanied by psychological support. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2016, no. 3, pp. 46-51. (In Russ.)]
3. Вольф С.Б., Гельберг И.С., Кроткова Е.Н., Мороз В.Л., Тис А.А. Показатели иммунорезистентности у больных туберкулезом с наличием факторов риска // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2004. № 2. С. 105-110. [Wolf S.B., Gelberg I.S., Krotkova E.N., Moroz V.L., Tis A.A. Indices of immunoresistance in patients with tuberculosis having risk factors. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2004, no. 2, pp. 105-110. (In Russ.)]
4. Воронкова О.В., Уразова О.И., Серебрякова В.А. Структурно-функциональные свойства лимфоцитов крови у больных лекарственно устойчивым туберкулезом легких в динамике химиотерапии // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 2-3. С. 254-255. [Voronkova O.V., Urazova O.I., Serebryakova V.A. Structural and functional properties of blood lymphocytes in patients with drug-resistant pulmonary tuberculosis in the dynamics hemoterapy. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 2-3, pp. 254-255. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2006-2-3-254-255.
5. Земляная Н.А., Филинчук О.В., Уразова О.И., Воронкова О.В. Активность фагоцитирующих клеток периферической крови у больных туберкулезом легких до и в процессе противотуберкулезной терапии // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 2-3. С. 266. Zemlyanaya N.A., Filinyuk O.V., Urazova O.I., Voronkova O.V. Cell-wall bloom phagocytosis in the dynamics treatment of pulmonary tuberculosis patients. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 2-3, p. 266. (In Russ.)]
6. Иванова Д.А., Борисов С.Е. Спектр и факторы риска нежелательных побочных реакций при лечении впервые выявленных больных туберкулезом // Туберкулез и болезни легких, 2017. Т. 95, № 6. С. 22-28. [Ivanova D.A., Borisov S.E. Profile and risk factors of adverse reactions in new tuberculosis cases receiving treatment. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, Vol. 95, no. 6, pp. 22-28. (In Russ.)]
7. Кисина Т.Е., Фрейдлин И.С., Кноринг Б.Е., Арчакова Л.И., Скворцова Л.А. Изменения субпопуляционного состава циркулирующих лимфоцитов в динамике лечения больных инфильтративным туберкулезом легких // Иммунология инфекций, 2005. Т. 7, № 2-3. С. 163. [Kisina T.E., Freydlin I.S., Knoring B.E., Archakova L.I., Skvortsova L.A. Modification subpopulation of cell-wall blood lymphocytes in the dynamics treatment of infiltrative pulmonary tuberculosis patients. *Immunologiya infektsiy = Immunology of Infections*, 2005, Vol. 7, no. 2-3, p. 163. (In Russ.)]
8. Кожевников В.С. Современная методология иммунодиагностики // Материалы конференции «Актуальные вопросы иммунологии и аллергологии». СПб., 1998. С. 23-30. [Kozhevnikov V.S. Modern methodology immunoassay. Conference materials]. St. Petersburg, 1998, pp. 23-30.
9. Колесникова О.В., Краснов В.А. Антистрессовая психофизиологическая коррекция в комплексной терапии больных впервые выявленным туберкулезом легких // Туберкулез и болезни легких, 2015. № 7. С. 70-71. [Kolesnikova O.V., Krasnov V.A. Anti-stress psycho-physiological managemt in the complex therapy of new pulmonary tuberculosis patients. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2015, no. 7, pp. 70-71. (In Russ.)]
10. Колосова А.Е. Факторы супрессии иммунного ответа при туберкулезе легких: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2011. 22 с. [Kolossova A.E. Factors suppression to immune response in pulmonary tuberculosis. Autoref. cand. med. sci. diss. Tomsk, 2011. 22 p. (In Russ.)]
11. Комогорова Е.Э., Костенко Е.В., Стаханов В.А. Особенности иммунологических показателей у больных с различными формами туберкулеза легких // Клиническая иммунология, 2005. № 1. С. 45-49. [Komogorova E.E., Kostenko E.V., Stakhanov V.A. The specificity of immunologic indices patients with different-form TB. *Klinicheskaya immunologiya = Clinical Immunology*, 2005, no. 1, pp. 45-49. (In Russ.)]
12. Новицкий В.В., Стрелис А.К., Уразова О.И., Воронкова О.В. Особенности функциональной активности лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких // Иммунология, 2006. № 2. С. 76-79. [Novitsky V.V., Strelis A.K., Urazova O.I., Voronkova O.V. The features of blood lymphocyte functional activity in pulmonary tuberculosis patients. *Immunologiya = Immunology*, 2006, no. 2, pp. 76-79. (In Russ.)]
13. Степанова Н.А., Стрельцова Е.Н., Галимзянов Х.М., Кантемирова Б.И. Нежелательные побочные реакции на противотуберкулезные препараты основного ряда // Туберкулез и болезни легких, 2016. Т. 94, № 5. С. 42-45. [Stepanova N.A., Streltsova E.N., Galimzyanov Kh.M., Kantemirova B.I. Unfavorable side effects to first line anti-tuberculosis drugs. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2016, Vol. 94, no. 5, pp. 42-45. (In Russ.)]
14. Таран Д.В., Леликова В.Л., Стерликов С.А., Корниенко С.В., Морозова Т.И. Итоги реализации проекта «Пациент-ориентированное сопровождение» // Туберкулез и болезни легких, 2015. № 4. С. 32-35.

[Taran D.V., Lelikova V.L., Sterlikov S.A., Korniyenko S.V., Morozova T.I. Outcomes of the project on patient-oriented approach. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2015, no. 4, pp. 32-35. (In Russ.)]

15. Труфакин В.А., Афтanas Л.И., Морозова Н.Б. Руководство по реабилитации лиц, подвергшихся стрессорным нагрузкам. М., 2004. 400 с. [Taran D.V., Lelikova V.L., Sterlikov S.A., Korniyenko S.V., Morozova T.I. Manual on rehabilitation of persons who have been subjected stress loads]. Moscow, 2004. 400 p.

16. Филинчук О.В., Уразова О.И., Новицкий В.В., Стрелис А.К. Функциональная активность фагоцитов при туберкулезе легких // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2006. № 1. С. 79-81. [Filinyuk O.V., Urazova O.I., Novitsky V.V., Strelis A.K. Functional activity of phagocyte blood cells in pulmonary tuberculosis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2006, no. 1, pp. 79-81. (In Russ.)]

17. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Воронкова О.В., Новицкий В.В., Наследникова И.О., Колосова А.Е., Никулина Е.Л. Роль Т-лимфоцитов в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции // Туберкулез и болезни легких, 2011. № 3. С. 3-7. [Churina E.G., Urazova O.I., Voronkova O.V., Novitsky V.V., Naslednikova I.O., Kolosova A.E., Nikulina E.L. Implication of t lymphocytes in the immunopathogenesis of tuberculosis infection. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2011, no. 3, pp. 3-7. (In Russ.)]

18. Шерстнева Т.В., Скорняков С.Н., Подгаева В.А., Шерстнев С.В., Цветков А.И. Мультидисциплинарный подход в работе по формированию приверженности лечению больных туберкулезом // Туберкулез и болезни легких, 2017. Т. 95, № 1. С. 34-40. [Sherstneva T.V., Skorniyakov S.N., Podgaeva V.A., Sherstnev S.V., Tsvetkov A.I. Multidisciplinary approach to supporting treatment compliance in tuberculosis patients. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, Vol. 95, no. 1, pp. 34-40. (In Russ.)]

19. Aleman M., Garcia A., Saab M. *Mycobacterium tuberculosis* – induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis. *American Journal Respir Cell. Mol. Biol.*, 2002, Vol. 27, pp. 583-592.

20. Brauchli P., Michel C.M., Zeier H. Electrocutaneous, autonomic and subjective responses to rhythmic audiovisual stimulation. *Int. J. Psychophysiol.*, 1995, Vol. 19, no. 1, pp. 53-66.

21. Deveci F., Akbulut H.H., Celik I., Muz M.H., Ilhan F. Lymphocyte subpopulations in pulmonary tuberculosis patients. *Mediators Inflamm.*, 2006, Vol. 2, p. 89070.

22. Rey A.D., Mahuad C.V., Bozza V.V., Bogue C., Farroni M.A., Bay M.L., Bottasso O.A., Besedovsky H.O. Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav. Immun.*, 2007, Vol. 21, no. 2, pp. 171-179.

23. Teplan M., Krakovska A., Stolic S. EEG Responses to long-term audiovisual stimulation. *Int. J. Psychophysiol.*, 2006, Vol. 59, no. 2, pp. 81-90.

24. Yildiz P., Kadakal F., Tutuncu Y., Deniz G., Gürel N., Adın S., Yilmaz V. Natural killer cell activity in multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *Respiration*, 2001, Vol. 68, pp. 590-594.

25. Zhang R., Zheng X., Li B., Wei H., Tian Z. Human NK cells positively regulate gammadelta T cells in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, pp. 2610-2616.

Авторы:

Колесникова О.В. — к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Петренко Т.И. — д.м.н., главный научный сотрудник ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры туберкулеза ФПК и ППВ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Колпакова Т.А. — д.м.н., профессор кафедры туберкулеза ФПК и ППВ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Труфакин В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный консультант ФГБУ «Томский научно-исследовательский центр» СО РАН, г. Томск, Россия

Authors:

Kolesnikova O.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russian Federation

Petrenko T.I., PhD, MD (Medicine), Main Research Associate, Novosibirsk Tuberculosis Research Institute; Professor, Department of Tuberculosis, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Kolpakova T.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Tuberculosis, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Trufakin V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Research Advisor, Tomsk Research Medical Center, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russian Federation

Поступила 26.02.2018

Отправлена на доработку 06.03.2018

Принята к печати 22.03.2018

Received 26.02.2018

Revision received 06.03.2018

Accepted 22.03.2018

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ АПОПТОЗА В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТАБИЛЬНЫМ СТРОНЦИЕМ

Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Кривцов А.В.,
Старкова К.Г., Отавина Е.А.

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Резюме. Высокорегулируемую форму запрограммированной смерти клетки с характерными морфологическими и биохимическими признаками определяют как апоптоз. Разнообразные факторы, в том числе и металлы, способны оказывать воздействие на интенсивность протекания реакции запрограммированной клеточной гибели. Цель работы – моделирование в системе *in vitro* апоптоза в условиях экспозиции стабильным стронцием. Обследовали детское население, потребляющее питьевую воду с повышенным содержанием стронция (Sr^{2+}) ($n = 49$). Уровень апоптоза лимфоцитов определяли на проточном цитометре с помощью окрашивания аннексином V, конъюгированным с FITC (AnnV-FITC), и пропидиум йодидом (PI), определяли AnnV-FITC⁺PI⁺ – ранний апоптоз, AnnV-FITC⁺PI⁺ – поздний апоптоз и некроз. Лейкоциты, выделенные у обследуемого контингента, инкубировали со Sr^{2+} в концентрации 7,0 мг/дм³ (концентрация, соответствующая ПДК для воды водных объектов) в течение 4 часов при 37 °С. Экспрессию маркеров апоптоза CD95 и p53 проводили методом проточной цитометрии с использованием меченых моноклональных антител. Экспозиция стронцием *in vitro* характеризовалась достоверным снижением уровня экспрессии регуляторных факторов апоптоза мембранного маркера CD95 и внутриклеточного транскрипционного белка p53 в 1,56 раза и в 1,68 раза соответственно. Одновременно отмечено достоверное уменьшение в 1,68 раза количества AnnV-FITC⁺PI⁺ клеток, а также статистически значимое повышение в 1,35 раза процентного содержания AnnV-FITC⁺PI⁺ клеток. Кроме того, во всех пробах количество AnnV-FITC⁺PI⁺ лимфоцитов было ниже физиологической нормы и контрольных значений, а количество проб, где содержание AnnV-FITC⁺PI⁺ лимфоцитов превышало установленные нормативы и контрольные значения, составляло 30,8%. Таким образом, экспериментально доказано, что стронций в концентрации, соответствующей ПДК для водных объектов, с высокой степенью достоверности ингибирует гибель клетки по пути апоптоза с переключением на реализацию клеточной гибели путем некроза по критерию содержания фосфатидилсерина, выявляемого в тесте с аннексином V. Полученные данные выявили способность стронция оказывать существенное воздействие на показатели регуляции и поддержания клеточного гомеостаза, влияя на интенсивность протекания процесса апоптоза смещением баланса в сторону реализации клеточной гибели путем некроза и снижая экспрессию регуляторных факторов. Результаты исследования могут использоваться для идентификации и обоснования маркерных показателей нарушений иммунного ответа при оценке внешнесредового воздействия стронция на здоровье населения в условиях специфического факторного окружения.

Ключевые слова: иммунный статус, клеточный маркер, апоптоз, стабильный стронций, экспериментальное моделирование, проточная цитометрия

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 Vladimirovich
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:

О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, Д.Г. Дианова, А.В. Кривцов, К.Г. Старкова, Е.А. Отавина «Экспериментальное моделирование апоптоза в условиях экспозиции стабильным стронцием» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 137–140.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-137-140
© Долгих О.В. и соавт., 2019

For citation:

O.V. Dolgikh, N.V. Zaitseva, D.G. Dianova, A.V. Krivtsov, K.G. Starkova, E.A. Otavina "Experimental modeling of apoptosis under conditions of stable strontium exposure", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 137–140.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-137-140
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-137-140

EXPERIMENTAL MODELING OF APOPTOSIS UNDER CONDITIONS OF STABLE STRONTIUM EXPOSURE

Dolgikh O.V., Zaitseva N.V., Dianova D.G., Krivtsov A.V., Starkova K.D., Otavina E.A.

Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Abstract. Apoptosis is defined as a highly regulated form of programmed cell death with typical morphological and biochemical features. A variety of factors, including heavy metals, may influence the intensity of programmed cell death. The aim of the work was to simulate apoptosis in an *in vitro* system under the conditions of stable strontium exposure. The children's population consuming drinking water with high strontium (Sr^{2+}) content ($n = 49$) was observed. The level of lymphocyte apoptosis was determined with flow cytometry technique, by means of labeled annexin V-FITC conjugate (AnnV-FITC) and propidium iodide (PI) staining. AnnV-FITC⁺PI⁻ cells were regarded as early apoptotic forms, whereas late apoptotic and/or necrotic cells were AnnV-FITC⁺PI⁺. The isolated leukocytes were incubated with Sr^{2+} at a concentration of 7.0 mg/l, the maximal permitted concentration (MPC) for water of aqueous objects, for 4 hours at 37 °C. Expression of CD95 and p53 apoptosis markers was performed by flow cytometry using labeled monoclonal antibodies. *In vitro* exposure to strontium was associated with significantly decreased expression of apoptosis-regulating factors, i.e., membrane marker CD95 and intracellular transcription protein p53, 1.56- and 1.68-fold, respectively. Meanwhile, we revealed a significantly (4.68-fold) decreased amounts of AnnV-FITC⁺PI⁻ -cells, as well as a statistically significant (1.35-fold) increase of the AnnV-FITC⁺PI⁺ -cells. Moreover, the amounts of AnnV-FITC⁺PI⁻ -lymphocytes in all samples were below the physiological ranges and control values. The number of samples with higher contents of AnnV-FITC⁺PI⁺ -lymphocyte exceeding the established standards and control values, was 30.8%. Thus, it has been experimentally proven that strontium, at a concentration corresponding to MPC for water objects may significantly inhibit cell death along apoptotic pathways, with switching to necrotic cell death mechanisms, according to phosphatidylserine contents, as detected by annexin V binding test. The data have revealed an ability of strontium to have a significant effect upon the parameters of regulation and maintenance of cellular homeostasis, by influencing the apoptosis intensity, due to shifting a balance towards necrosis and reducing expression of apoptosis-regulating factors. The results of this study may be used in order to identify some marker indexes of immune disorders potentially induced by external influence of strontium upon human health under specific environmental factors.

Keywords: immune status, cell markers, apoptosis, stable strontium, experimental modeling, flow cytometry

Неблагоприятное влияние факторов окружающей среды на здоровье населения определяется в том числе и функциональными сдвигами в системе иммунной резистентности организма, играющей ключевую роль в реализации стратегии адаптации к постоянно меняющимся факторам внутренней и внешней среды [2, 5]. Изменения иммунных реакций загрязнителями окружающей среды могут приводить к повышению риска развития ряда заболеваний, причинами которых часто являются нарушения, связанные с генетически детерминированной клеточной гибелью [6, 7, 8].

Высокорегулируемую форму запрограммированной смерти клетки с характерными морфологическими и биохимическими признаками определяют как апоптоз [3]. Разнообразные факторы способны индуцировать апоптоз или препятствовать ему. Металлы, в том числе и стронций, также могут оказывать воздействие на интенсивность протекания реакции запрограммированной клеточной гибели [1, 4, 9], поэтому исследование особенностей запуска, изменения и регуляции процесса апоптоза в условиях химической транс-

формации среды обитания представляется актуальной задачей.

Цель работы — моделирование в системе *in vitro* апоптоза в условиях экспозиции стабильным стронцием.

Обследовали детское население, потребляющее питьевую воду с повышенным содержанием стронция (Sr^{2+}) ($n = 49$). Детекцию апоптоза проводили на проточном цитометре FACSCalibur фирмы Becton Dickinson (BD, США). Уровень апоптоза лимфоцитов определяли с помощью окрашивания аннексином V, конъюгированным с FITC (AnnV-FITC), и пропидиум йодидом (PI) согласно протоколу фирмы-производителя (BD, США). Определяли AnnV-FITC⁺PI⁻ — ранний апоптоз, AnnV-FITC⁺PI⁺ — поздний апоптоз и некроз. Для изучения влияния Sr^{2+} на включение клеток в апоптоз суспензию лейкоцитов, выделенных у обследуемого контингента, инкубировали со Sr^{2+} в концентрации 7,0 мг/дм³ (концентрация, соответствующая ПДК для воды водных объектов) в течение 4 часов при 37 °C (опытная проба). После инкубации 100 мкл клеточной суспензии переносили в пробирки и подвергали

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ АПОПТОЗА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ОБСЛЕДОВАННЫХ ДЕТЕЙ С УЧЕТОМ КОНТАМИНАНТНОЙ НАГРУЗКИ СТРОНЦИЕМ, n = 49, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF BLOOD LEUKOCYTE APOPTOSIS INDICATORS OF CHILDREN, TESTED WITH THE CONTAMINANT LOAD BY STRONTIUM, n = 49, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Index	Проба без добавления стронция Sr^{2+} (контроль) Sample without addition of strontium Sr^{2+} (control)	Проба с добавлением стронция Sr^{2+} (опыт) Sample with the addition of strontium Sr^{2+} (experience)	p
CD95 %	12,5 (11,0-14,0)	8,0 (7,10-11,0)	0,001
p53, %	0,42 (0,40-0,62)	0,25 (0,15-0,40)	0,00001
Annexin V-FITC $^{+}$ PI $^{-}$, %	0,89 (0,60-1,19)	0,19 (0,18, 0,35)	0,00003
Annexin V-FITC $^{+}$ PI $^{+}$, %	9,16 (8,47-10,98)	12,33 (10,42-15,01)	0,02092

Примечание. p – различие между контрольной и опытной пробой по U-критерию Манна–Уитни.

Note. p, the difference between the control and experimental sample according to the Mann–Whitney U-test.

стандартной процедуре окрашивания с помощью аннексина V и PI. Раствор стронция готовили из «Государственного стандартного образца состава раствора ионов стронция» ГСО 7145-95 (ООО «Эколан», Россия). В качестве контроля использовали лейкоцитарные клетки без добавления Sr^{2+} , которые инкубировали при таких же условиях. Исследование экспрессии маркеров апоптоза CD95 и p53 проводили методом проточной цитометрии с использованием меченых моноклональных антител согласно протоколу фирмы-производителя (BD, США).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для оценки значимости межгрупповых различий в случае отклонения от нормального распределения использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы (Me) и процентиля ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости (p), при этом уровень значимости принимался равным 0,05.

Для изучения воздействия стронция в эксперименте *in vitro* получали образцы крови у детского населения, постоянно проживающего в условиях повышенного содержания металла в воде хозяйственно-бытового водоснабжения (стронциевая геохимическая провинция). Экспериментально доказано, что стронций в концентрации 7 мг/дм³, соответствующей ПДК для водных объектов, с высокой степенью достоверности ($p < 0,05$) ингибирует гибель клетки по пути апоптоза с переключением на реализацию клеточной гибели путем некроза по критерию содержания фосфатидилсерина, выявляемого в тесте с аннексином V (табл. 1).

Экспозиция стронцием *in vitro* характеризовалась статистически значимым снижением уровня экспрессии регуляторных факторов апоптоза мембранного маркера CD95 и внутриклеточного транскрипционного белка p53 в 1,56 раза и в 1,68 раза соответственно ($p < 0,05$). Одновременно отмечено достоверное уменьшение в 4,68

раза количества AnnV-FITC $^{+}$ PI $^{-}$ клеток, а также статистически значимое повышение в 1,35 раза процентного содержания AnnV-FITC $^{+}$ PI $^{+}$ клеток ($p < 0,05$). Кроме того, установлено, что во всех пробах количество AnnV-FITC $^{+}$ PI $^{-}$ лимфоцитов было ниже физиологической нормы (1,5-2,5%) и контрольных значений, а количество проб, где содержание AnnV-FITC $^{+}$ PI $^{+}$ лимфоцитов превышало установленные нормативы (7,0-11,0%) и контрольные значения, составляло 30,8%. Следует отметить, что во всех анализируемых пробах после внесения стронция в суспензию лейкоцитов отмечалось повышение содержания AnnV-FITC $^{+}$ PI $^{+}$ клеток на 10-50% от исходного уровня.

Таким образом, проведенное исследование особенностей регуляции процесса апоптоза у детского населения, экспонированного стронцием, в условиях экспериментального воздействия металлом *in vitro* показало:

1) снижение экспрессии мембранных и внутриклеточных регуляторных маркеров апоптоза (CD95, p53);

2) уменьшение количества вступающих в апоптоз AnnV-FITC $^{+}$ PI $^{-}$ клеток и возрастание AnnV-FITC $^{+}$ PI $^{+}$ лимфоцитов с проявлением признаков некроза.

Полученные данные выявили способность стронция оказывать существенное воздействие на показатели регуляции и поддержания клеточного гомеостаза, влияя на интенсивность протекания процесса апоптоза смещением баланса в сторону реализации клеточной гибели путем некроза и снижая экспрессию регуляторных факторов. Экспериментально установлено, что стабильный стронций в концентрации, соответствующей предельно допустимой для водных объектов, ингибирует гибель клетки по пути апоптоза. Результаты исследования могут использоваться для идентификации и обоснования маркерных показателей нарушений иммунного ответа при оценке внешнесредового воздействия стронция на здоровье населения в условиях специфического факторного окружения.

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 immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 2 (1), pp. 129-131. (In Russ.)]
2. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Особенности иммунологических и генетических нарушений человека в условиях дестабилизации среды обитания. Пермь: Издательство Пермского национального исследовательского политехнического университета, 2016. 300 с. [Zaytseva N.V., Dolgikh O.V., Dianova D.G. Immunological and genetic features of human disorders in conditions of environmental destabilization]. Perm: Publishing House of the Perm National Research Polytechnic University, 2016. 300 p.
3. Agostini M., Tucci P., Melino G. Cell death pathology: perspective for human diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, Vol. 414, no. 3, pp. 451-455.
4. Aimaiti A., Maimaitiyiming A., Boyong X., Aji K., Li C., Cui L. Low-dose strontium stimulates osteogenesis but high-dose doses cause apoptosis in human adipose-derived stem cells via regulation of the ERK1/2 signaling pathway. *Stem Cell Res. Ther.*, 2017, Vol. 8, no. 1, p. 282.
5. 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.
6. Favalaro B., Allocati N., Graziano V., di Ilio C., de Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, 2012, Vol. 4, no. 5, pp. 330-349.
7. Li K., Wu D., Chen X., Zhang T., Zhang L., Yi Y., Miao Z., Jin N., Bi X., Wang H., Xu J., Wang D. Current and emerging biomarkers of cell death in human disease. *Biomed. Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 690103. doi: 10.1155/2014/690103.
8. Nagata S., Tanaka M. Programmed cell death and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 5, pp. 333-340.
9. Pilmane M., Salma-Ancane K., Loca D., Locs J., Berzina-Cimdina L. Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2017, Vol. 78, pp. 1222-1230.

Авторы:

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

Зайцева Н.В. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Дианова Д.Г. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Кривцов А.В. — к.м.н., заведующий лабораторией иммуногенетики 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

Отавина Е.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Authors:

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

Zaitseva N.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Dianova D.G., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Diagnostics, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Krivtsov A.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunogenetics, 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

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

Поступила 28.03.2018

Отправлена на доработку 05.04.2018

Принята к печати 18.04.2018

Received 28.03.2018

Revision received 05.04.2018

Accepted 18.04.2018

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА- 1 β В РАЗВИТИИ ПРЕИМУЩЕСТВЕННО СЕНСОРНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩЕЙ ПОЛИНЕВРОПАТИИ

Попова Т.Е.¹, Шнайдер Н.А.², Петрова М.М.², Таппахов А.А.¹

¹ ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Россия

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

Резюме. Целью работы было изучение ассоциаций полиморфных аллельных вариантов 3954C>T (rs1143644) и -511C>T (rs16944) гена *IL1B* в группах пациентов с преимущественно сенсорной хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатией (ПС-ХВДП) из Красноярского края и Республики Саха (Якутия). Всего обследовано 95 человек, разделенных на 2 группы по территории проживания. Первую группу составили 42 пациента, проживающие на территории Республики Саха (Якутия), в возрасте от 15 до 62 лет. Вторая группа включала 53 пациента, проживающих на территории Красноярского края, в возрасте от 5 до 78 лет. Установлено, что в локусе 3954C>T носительство гомозиготного генотипа *CC* чаще выявляется у пациентов из Республики Саха (Якутия), а носительство генотипа *TT* характерно исключительно у пациентов из Красноярского края. По частоте встречаемости различных генотипов в локусе -511C>T между двумя группами пациентов статистически значимые различия не выявлены. Носительство генотипа *CC* в локусе 3954C>T статистически значительно повышает шанс заболевания у пациентов из Республики Саха (Якутия), в то время как носительство генотипов *CT* и *TT* в локусе 3954C>T и генотипа *TT* в локусе -511C>T, напротив, повышает риск болезни среди пациентов Красноярского края. По частоте встречаемости носительства различных генотипов в локусах 3954C>T и -511C>T гена *IL1B* среди пациентов из Республики Саха (Якутия) превалировала ассоциация генотипов *CC/CT* ($p = 0,005$), у пациентов из Красноярского края с равной частотой выявлено преобладание генотипов *CC/CC* и *CC/CT* ($p = 0,023$). Однако статистически значимого различия по частоте встречаемости отдельных генотипов в двух изучаемых группах не выявлено. При анализе частоты носительства высокопродуктивных аллелей 3954C и -511C у пациентов ПС-ХВДП показано, что они статистически значимо чаще встречались как среди пациентов из Республики Саха (Якутия), так и среди пациентов из Красноярского края по сравнению с низкопродуктивными аллелями 3954T и -511T. При этом аллель 3954C чаще встречался в якутской группе ($p = 0,001$), а аллель -511C – в красноярской группе пациентов ($p = 0,05$). Наличие аллелей 3954C и -511C повышает вероятность развития ПС-ХВДП у пациентов из Республики Саха (Якутия), а наличие аллеля 3954T – у пациентов из Красноярского края.

Ключевые слова: ПС-ХВДП, *IL-1 β* , ген *IL1B*, однонуклеотидные полиморфизмы, генетика, анализ ассоциаций

Адрес для переписки:

Попова Татьяна Егоровна
ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный
университет имени М.К. Аммосова»
677013, Россия, г. Якутск, ул. Ойунского, 27.
Тел.: 8 (4112) 36-30-46.
Факс: 8 (4112) 49-68-26.
E-mail: tata2504@yandex.ru

Address for correspondence:

Popova Tatiana E.
M. Ammosov North-Eastern Federal University
677013, Russian Federation, Yakutsk, Oyunsky str., 27.
Phone: 7 (4112) 36-30-46.
Fax: 7 (4112) 49-68-26.
E-mail: tata2504@yandex.ru

Образец цитирования:

Т.Е. Попова, Н.А. Шнайдер, М.М. Петрова,
А.А. Таппахов «Роль полиморфизма гена интерлейкина-
1 β в развитии преимущественно сенсорной
хронической воспалительной демиелинизирующей
полиневропатии» // Медицинская иммунология, 2019.
Т. 21, № 1. С. 141–148.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-141-148
© Попова Т.Е. и соавт., 2019

For citation:

T.E. Popova, N.A. Shnayder, M.M. Petrova,
A.A. Tappakhov "The role of interleukin 1 β gene
polymorphism in development of predominant sensory chronic
inflammatory demyelinating polyneuropathy", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019,
Vol. 21, no. 1, pp. 141–148.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-141-148
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-141-148

THE ROLE OF INTERLEUKIN 1 β GENE POLYMORPHISM IN DEVELOPMENT OF PREDOMINANTLY SENSORY CHRONIC INFLAMMATORY DEMYELINATING POLYNEUROPATHY

Popova T.E.^a, Shnayder N.A.^b, Petrova M.M.^b, Tappakhov A.A.^a

^a M. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russian Federation

^b V. Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The aim of the present study was a search for associations between the polymorphic allelic variants 3954C>T (rs1143644) and -511C>T (rs16944) of *IL1B* gene in the patients with sensory predominant chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies (SP-CIDP) from Krasnoyarsk Region and the Sakha (Yakutia) Republic. A total of 95 people were examined, having been divided into 2 groups according to their residence. The first group consisted of 42 patients living in the Sakha (Yakutia) Republic. The second group included 53 patients living in the Krasnoyarsk Region. It was revealed that the carriers of homozygous CC genotype in the 3954C>T locus were more often detected in patients from the Sakha (Yakutia) Republic, and the carriage of TT genotype is found exclusively in the patients from Krasnoyarsk Region. When comparing the different genotype frequencies in the -511CT locus, we did not reveal any statistically significant differences between the two groups of patients. Presence of the CC genotype of the 3954C>T locus was associated with a significantly increased risk of disease in the patients from Sakha (Yakutia) Republic, while carrying CT and TT genotypes at the locus 3954C>T and the TT genotype at the locus -511C>T, is associated with increased risk disorder among patients of the Krasnoyarsk Region. The frequency of carriage of various genotypes in the 3954C>T and -511C>T loci of the *IL1B* gene was prevalent among the patients from the Sakha (Yakutia) Republic, the association of genotypes of CC/CT prevailed in patients from the Krasnoyarsk Region ($p = 0.005$), as well as prevalence of CC/CC and CC/CT ($p = 0.023$). However, there was no statistically significant difference in occurrence of individual genotypes between the two study groups. When analyzing the carrier frequency of high-producing alleles of 3954C and -511C in patients with SP-CIDP, it was shown that they were significantly more common among patients from the Sakha (Yakutia) Republic and patients from the Krasnoyarsk Region than the low-producing 3954T and -511T alleles. Moreover, the 3954C allele was more often found in the Yakut group ($p = 0.001$), and in the -511C allele for the Krasnoyarsk group of patients ($p = 0.05$). The presence of 3954C and -511C alleles increases the risk of SP-CIDP development in patients from the Sakha (Yakutia) Republic, as well as carriage of 3954T allele in patients from the Krasnoyarsk Region.

Keywords: SP-CIDP, IL-1 β , gene *IL1B*, single nucleotide polymorphisms, genetic, association analysis

Преимущественно сенсорная хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия (ПС-ХВДП) — хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся поражением миелиновой оболочки периферических нервов и проявляющееся преобладанием в клинической картине чувствительных нарушений [5, 8, 10]. Она является приобретенной невропатией, в развитии которой большое значение играют изменения иммунологической реактивности организма и возникновение аутоиммунного процесса [6, 13]. Одним из основных провоспалительных цитокинов, учитывающих во всех этапах иммунного ответа, является интерлейкин-1 β (IL-1 β). Установлено, что ген *IL1B* влияет на развитие ряда мультифакторных заболеваний, таких как язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, atopическая бронхиальная астма, риносинусит и др. [3, 7, 9]. Однако исследования, посвященные значению полиморфизма

гена *IL1B* в развитии ПС-ХВДП, в доступной литературе не обнаружены.

Таким образом, представляется актуальным изучение полиморфизма гена *IL1B* при ПС-ХВДП в прогнозировании течения заболевания с точки зрения региональных особенностей.

Цель работы — изучение ассоциаций полиморфных аллельных вариантов 3954C>T (rs1143644) и -511C>T (rs16944) гена *IL1B* в группах пациентов с ПС-ХВДП из Красноярского края и Республики Саха (Якутия).

Материалы и методы

Собственные клинико-лабораторные исследования проводились на базе Университетской клиники ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» (г. Красноярск) и Клиники Медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им.

М.К. Аммосова» (г. Якутск) в рамках совместных комплексных исследований по теме: «Эпидемиологические, генетические и нейрофизиологические аспекты заболеваний нервной системы (центральной, периферической и вегетативной) и превентивная медицина» (гос. рег. 0120.0807480). Работа одобрена Этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 51/2013 от 28.10.2013 г.).

Объектом исследования выбрана группа пациентов с ПС-ХВДП. Критерии включения: наличие верифицированного диагноза ПС-ХВДП, мужской и женский пол, возраст пациентов от 5 лет и старше, регистрация постоянного места жительства обследуемых на территории Красноярского края и Республики Саха (Якутия). Критерии исключения: наличие периферических невропатий другого генеза.

Всего обследовано 95 человек, разделенных на 2 группы по территории проживания. Первую группу составили 42 пациента, проживающие на территории Республики Саха (Якутия), в возрасте от 15 до 62 лет. Вторая группа включала 53 пациента, проживающих на территории Красноярского края, в возрасте от 5 до 78 лет. Сравнительная характеристика исследованных групп приведена в таблице 1.

Для молекулярно-генетического исследования использовали образцы крови из кубитальной вены, собранные в вакутейнер с EDTA в объеме 5 мл. Забор крови для ПЦР-диагностики проводился после подписания пациентом информированного согласия. Выделение ДНК из свежей крови проводили сорбционным методом, используя комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» (Applied Biosistem). ДНК-типирование проводилось методом ПЦР в режиме реального времени с использованием образцов олигонуклеотидных, меченных флуорофором агентов, технологией TaqMan. Генотипы были определены в зависимости от наличия или отсутствия продукта амплификации с использованием двух ДНК-зондов (в 2 направлениях полиморфизма промотора гена *IL1B*), каждый из которых содержал флуоресцентный знак и супрессоры флуоресценции. Наличие того или иного полиморфизма *3954C>T* (rs1143644) и *-511C>T* (rs16944) определяется наличием флуоресценции в амплифицированной смеси. Отрицательный контроль был включен в каждом эксперименте, где матрица ДНК для ПЦР была заменена на дистиллированную воду. ПЦР проводили в усилителе Rotor-Gene 6000 (Corbet Life Science, Австралия).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием прикладных программ

IBM SPSS Statistics 19. Описательная статистика для качественных учетных признаков представлена в виде абсолютных значений и процентных долей. Вид распределения определялся с помощью критерия Шапиро–Уилка и путем анализа квантильных кривых. Учитывая преобладание в изучаемых выборках распределения, отличного от нормального, количественные данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го квартилей ($Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$), а сравнительный анализ двух независимых групп количественных данных проведен с использованием U-критерия Манна–Уитни. Описательная статистика номинальных данных представлена в виде абсолютных значений и процентных долей. Сравнение двух независимых групп качественных данных произведено с использованием χ^2 Пирсона. Для расчета количественной вероятности определенного исхода, в зависимости от наличия или отсутствия какого-либо фактора, вычислялся относительный шанс (ОШ, или OR – odds ratio) с 95% доверительными интервалом (ДИ). Критический уровень статистической значимости определен при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате исследования установлено, что частота носительства высокопродуктивного гомозиготного генотипа *CC* гена *IL1B* в локусе *3954C>T* (rs1143644) статистически значимо преобладает как у пациентов первой ($p < 0,0001$), так и у пациентов второй групп ($p = 0,005$). В локусе *-511C>T* (rs16944) более частое носительство гетерозиготного генотипа *CT* выявлено у пациентов 1-й группы ($p = 0,039$), в то время как пациенты 2-й группы чаще характеризовались носительством гомозиготного генотипа *CC* ($p = 0,001$).

Сравнительный анализ двух исследуемых групп показал, что в локусе *3954C>T* (rs1143644) носительство гомозиготного генотипа *CC* чаще выявляется у пациентов первой группы (86,1 против 52,8%, $p = 0,001$), а носительство генотипа *TT* характерно исключительно для пациентов второй группы (17,0%, $p = 0,014$). По частоте встречаемости различных генотипов в локусе *-511C>T* между двумя группами пациентов статистически значимые различия не выявлены (табл. 2).

Для изучения значимости гена *IL1B* в развитии ПС-ХВДП у пациентов из разных регионов были рассчитаны относительные шансы (табл. 3). В результате выявлено, что носительство генотипа *CC* в локусе *3954C>T* статистически значимо повышает относительный шанс заболевания у пациентов из Республики Саха (Якутия) в 4,7 раза (95% ДИ: 1,9–11,2), в то время как носительство генотипов *CT* и *TT* в локусе *3954C>T* и генотипа *TT* в локусе *-511C>T*, напротив, повышает риск болезни среди пациентов Красноярского

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДОВАННЫХ ГРУПП ПАЦИЕНТОВ С ПС-ХВДП

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH SP-CIDP

Характеристики Characteristics	Пациенты из Республики Саха (Якутия) (1-я группа) Patients from the Sakha Republic (Yakutia) (1 st group)	Пациенты из Красноярского края (2-я группа) Patients from the Krasnoyarsk Region (2 nd group)	р-уровень p value
Мужчины, n (%) Male, n (%)	4 (9,5)	22 (41,5)	0,0004
Возраст, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) лет Age, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) years	44 (32-51)	28 (19,0-38,5)	< 0,001
Принадлежность к этнической группе Belonging to the ethnic group			
Якутская, n (%) Yakut, n (%)	27 (64,3)	0	< 0,001
Русская, n (%) Russian, n (%)	14 (33,3)	48 (90,6)	< 0,001
Другая, n (%) Other, n (%)	1 (2,4)	5 (9,4)	0,15
Наличие повышенного уровня антител к вирусам Presence of an increased level of antibodies to viruses			
ВПГ, n (%) HSV, n (%)	37 (88,1)	47 (88,6)	0,93
ЦМВ, n (%) CMV, n (%)	37 (88,1)	36 (67,9)	0,02
ВЭБ, n (%) EBV, n (%)	2 (4,8)	34 (65,2)	< 0,001
Микст, n (%) Mix, n (%)	34 (78,6)	40 (75,5)	0,68
Клинические проявления ПС-ХВДП Clinical features of SP-CIDP			
Возраст дебюта, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) лет Onset age, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) years	43 (30-48)	27 (30-35)	< 0,001
Чувствительные нарушения по полиневритическому типу, n (%) Sensitive violations with polyneuritic type, n (%)	41 (97,6)	53 (100)	0,86
Болевая гиперестезия, n (%) Pain hyperesthesia, n (%)	30 (71,4)	48 (90,6)	0,02
Гипестезия, n (%) Hypesthesia, n (%)	12 (28,6)	6 (11,3)	0,03
Парестезии, n (%) Paresthesia, n (%)	21 (50)	20 (37,7)	0,23
Краampi, n (%) Crumpy, n (%)	7 (16,8)	5 (9,4)	0,3
Вегетативные нарушения*, n (%) Vegetative violations, n (%)	30 (71,4)	49 (92,5)	0,006
Моторные нарушения, n (%) Motor violations, n (%)	4 (9,3)	—	0,09

Примечание. * – дистальный гипергидроз в области кистей и стоп, акроцианоз, гипотермия на уровне дистальных отделов конечностей.

Note. *, distal hyperhidrosis in hands and feet, acrocyanosis, hypothermia at the distal regions of extremities.

края (соответственно, OR: 2,7 (95% ДИ: 0,9-7,6), 8,8 (95% ДИ: 1,1-72,4) и 12,7 (95% ДИ: 1,5-105,0)).

По частоте встречаемости носительства различных генотипов в локусах *3954C>T* и *-511C>T* гена *IL1B* среди пациентов первой группы превалировала ассоциация генотипов *CC/CT* ($p = 0,005$), у пациентов второй группы с рав-

ной частотой выявлено преобладание генотипов *CC/CC* и *CC/CT* ($p = 0,023$). Однако статистически значимого различия по частоте встречаемости отдельных генотипов в двух изучаемых группах не выявлено (табл. 4).

Следует отметить, что ассоциация генотипов *CC/CC* в локусах *3954C>T* и *-511C>T* у пациентов

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА ГЕНОТИПОВ *CC*, *CT*, *TT* ГЕНА *IL1B* У ПАЦИЕНТОВ С ПС-ХВДП

TABLE 2. THE FREQUENCY *CC*, *CT*, AND *TT* GENOTYPES OF *IL1B* GENE IN PATIENTS WITH SP-CIDP

Локус Locus	Генотип Genotype	1-я группа 1 st group (n = 43)	2-я группа 2 nd group (n = 53)	p-уровень p value
<i>3954C>T</i>	<i>CC</i> , n (%)	37 (86,1)	28 (52,8)	0,001
	<i>CT</i> , n (%)	6 (13,9)	16 (30,2)	0,063
	<i>TT</i> , n (%)	0	9 (17,0)	0,014
<i>-511C>T</i>	<i>CC</i> , n (%)	12 (27,9)	25 (47,2)	0,057
	<i>CT</i> , n (%)	22 (51,2)	23 (43,4)	0,435
	<i>TT</i> , n (%)	9 (20,9)	5 (9,4)	0,956

ТАБЛИЦА 3. ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ ШАНСЫ РАЗВИТИЯ ПС-ХВДП В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НОСИТЕЛЬСТВА РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ

TABLE 3. ODDS RATIOS OF DEVELOPING SP-CIDP DEPENDING ON THE CARRIERS OF DIFFERENT GENOTYPES

Локус Locus	Генотип Genotype	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	p-уровень p level
<i>3954C>T</i>	<i>CC</i>	4,7 (1,9-11,2)	< 0,001
	<i>CT</i>	0,4 (0,2-0,8)	0,003
	<i>TT</i>	0,2 (0,1-0,4)	< 0,001
<i>-511C>T</i>	<i>CC</i>	0,8 (0,5-1,3)	0,42
	<i>CT</i>	1,9 (0,6-1,9)	0,76
	<i>TT</i>	0,1 (0,05-0,4)	< 0,001

ТАБЛИЦА 4. ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ АССОЦИАЦИЙ ГЕНОТИПОВ В ЛОКУСАХ *3954C>T* И *-511C>T* ГЕНА *IL1B* У ПАЦИЕНТОВ С ПС-ХВДП

TABLE 4. THE FREQUENCY OF OCCURRENCE OF GENOTYPES ASSOCIATIONS IN THE LOCI *3954C>T* AND *-511C>T* OF THE *IL1B* GENE IN PATIENTS WITH SP-CIDP

Ассоциация генотипов Genotypes associations (<i>3954C>T</i> - <i>511C>T</i>)	1-я группа 1 st group (n = 43)	2-я группа 2 nd group (n = 53)	p-уровень p value
<i>CC/CC</i> , %	23	23	1,0
<i>CC/CT</i> , %	39	23	0,723
<i>CC/TT</i> , %	21	8	0,067
<i>CT/CT</i> , %	12	13	0,883
<i>CT/CC</i> , %	5	15	0,037
<i>CT/TT</i> , %	—	2	0,351
<i>TT/CC</i> , %	—	9	0,044
<i>TT/CT</i> , %	—	7	0,058
<i>TT/TT</i> , %	—	—	

ТАБЛИЦА 5. ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ ШАНСЫ РАЗВИТИЯ ПС-ХВДП В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АЛЛЕЛЕЙ

TABLE 5. ODDS RATIOS OF SP-CIDP DEVELOPMENT DEPENDING ON ALLELES

Аллели Alleles	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	р-уровень p value
3954C	11,7 (5,1-26,9)	< 0,001
3954T	0,4 (0,3-0,6)	< 0,001
-511C	1,8 (1,2-2,6)	0,003
-511T	0,7 (0,4-1,1)	0,14

из Республики Саха (Якутия) выявлена у 4 пациентов с тяжелым течением заболевания с вовлечением не только чувствительных, но и двигательных волокон периферических нервов.

При анализе частоты носительства высокопродуцирующих аллелей 3954C и -511C у пациентов ПС-ХВДП показано, что они статистически значимо чаще встречались как среди пациентов из Республики Саха (Якутия), так и среди пациентов из Красноярского края по сравнению с низкопродуцирующими аллелями 3954T и -511T. При этом аллель 3954C чаще встречался в якутской группе ($p = 0,001$), а аллель -511C — в красноярской группе пациентов ($p = 0,05$).

Были вычислены относительные шансы для всех аллелей изучаемых локусов (табл. 5). При этом показано, что наличие аллелей 3954C и -511C повышает вероятность развития ПС-ХВДП у пациентов из Республики Саха (Якутия), а наличие аллеля 3954T — у пациентов из Красноярского края.

Случаи ПС-ХВДП составляют 20-50% недиагностированных полиневропатий в амбулаторно-поликлиническом звене здравоохранения, особенно в регионах с тяжелыми климатогеографическими условиями [2]. Патогенез данного заболевания остается до конца не выясненным, но связан с иммунодефицитным состоянием с вовлечением Т-клеточного звена иммунитета, с нарушением гемато-неврального барьера, экспрессией фактора некроза опухоли альфа (TNF α), интерлейкинов, цитокинов, интерферонов, а также с участием гуморального звена иммунитета, что подтверждено эффективностью внутривенного введения иммуноглобулина класса G в опытах на крысах [8, 12]. При ПС-ХВДП в сыворотке крови больных выявляются разные классы аутоантител к ганглиозидам GM1 (IgG — в 23%, IgA — в 14% и IgM — в 7% случаев). Существенную роль в развитии демиелинизации при ПС-ХВДП играют макрофаги, отслаивающие миелин, что приводит к его дегенерации. Также в очагах воспаления обнаруживают CD4⁺ и CD8⁺ лимфоциты [12].

До настоящего времени специфические антигены, провоцирующие процесс демиелинизации, не идентифицированы. По данным некоторых авторов, в развитии ПС-ХВДП огромный вклад вносят нейротропные вирусы семейства *Herpes viridae* [8, 11]. Так, у 45% пациентов с ПС-ХВДП была верифицирована хроническая вирусная инфекция, вызванная вирусом простого герпеса 1 типа (ВПГ-1), в 4,5% случаев — цитомегаловирусная инфекция (ЦМВ) и инфекция, вызванная вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ), в 22,6% случаях выявлена микст-инфекция (сочетание ВПГ-1 и ВЭБ, ЦМВ и ВЭБ).

Особая роль в реализации аутоиммунных нарушений принадлежит провоспалительным цитокинам. *IL1B* активирует антигенпрезентирующие клетки и CD4-лимфоциты, влияет на дифференцировку Т- и В-лимфоцитов и других иммунокомпетентных клеток. Ген *IL1B* содержит 22 экзона, 20 из которых альтернативные (т.е. структурные вариации), и 9 интронов, альтернативных — 8 [3].

В 2008 г. описана локализация гена, кодирующего *IL1B*, на хромосоме 2q13-21 [4]. Полиморфизм гена *IL1B* оказывает существенное влияние на предрасположенность к ряду мультифакторных заболеваний в ответ на триггеры окружающей среды. У больных с гнойным риносинуситом гомозиготный генотип по высокопродуцирующему аллелю С в локусе 3953 гена *IL1B* выявлялся в 2 раза чаще по сравнению с практически здоровыми лицами [1]. В работах Н.В. Терсковой и соавт. показано значительное преобладание частоты гомозиготного носительства полиморфного варианта -511C (генотип CC) у детей с хроническим аденоидитом в сравнении с контролем (59,8 и 46,7% соответственно). Высока частота носительства высокопродуцирующего аллеля -511C, включая гомозиготное (CC) и гетерозиготное (CT) носительство у детей с хроническим аденоидитом (95,5%) [7].

Нами впервые проведено изучение ассоциации полиморфных аллельных вариантов 3954C>T (rs1143644) и -511C>T (rs16944) гена *IL1B* при ПС-ХВДП. Исследованием охвачены пациенты двух крупных регионов Российской Федерации — Республики Саха (Якутия) и Красноярского края. Следует подчеркнуть, что исследованные группы по половозрастному признаку не были сопоставимы, однако в исследование включались пациенты с уже установленным диагнозом, следовательно, на развитие заболевания данный факт влиять не мог. В то же время нельзя исключить влияние возраста и женского пола на более тяжелое течение заболевания у пациентов из Республики Саха (Якутия).

Несмотря на то что ассоциация генотипов СС/СС по локусам *3954C>T* (rs1143644) и *-511C>T* (rs16944) гена *IL-1B* среди пациентов с ПС-ХВДП в Красноярском крае встречалась с одинаковой частотой по сравнению пациентами в Республике Саха (Якутия), течение заболевания у пациентов из Красноярского края было более мягким, тяжелых форм заболевания с выраженным поражением сенсорных и моторных волокон периферических нервов не зарегистрировано. Следовательно, гомозиготное носительство генотипа СС по обоим исследованным нами локусам является фактором риска более тя-

желого поражения периферических нервов при ПС-ХВДП и прогрессивного течения заболевания, однако при этом, вероятно, имеется значимый вклад внешнесредовых факторов, к которым можно отнести более тяжелые климатогеографические условия проживания в Республике Саха (Якутия).

Таким образом, полиморфизм гена *IL1B*, кодирующего провоспалительный цитокин — интерлейкин-1 бета, в сочетании с внешнесредовыми факторами играет прогностическую роль в реализации ПС-ХВДП.

Список литературы / References

1. Азнабаева Л.Ф., Шарипова Э.Р., Арефьева Н.А., Зайнуллина А.Г., Симбирцев А.С. Иммуногенетические особенности продукции интерлейкина-1β при затяжной и хронической (рецидивирующей) форме бактериального воспаления верхних дыхательных путей (гнойного риносинусита) // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 4-5. С. 535-540. [Azanbaeva L.F., Sharipova E.R., Arepheva N.A., Zaynullina A.G., Simbirtsev A.S. Immunogenetic features of production of interleukin-1β with prolonged and chronic (recurrent) form of bacterial inflammation of the upper respiratory tract (purulent rhinosinusitis). *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 4-5, pp. 535-540. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2007-4-5-535-540.
2. Кантимирова Е.А., Шнайдер Н.А. Хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия: дефиниция, эпидемиология, классификация, диагностика // Вестник клинической больницы № 51, 2009. № 7. С. 22-25. [Kantimirova E.A., Schnayder N.A. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: definition, epidemiology, classification, diagnosis. *Vestnik klinicheskoy bolnitsy no. 51 = Bulletin of the Clinical Hospital no. 51*, 2009, no. 7, pp. 22-25. (In Russ.)]
3. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. СПб.: Гиппократ, 1992. 256 с. [Ketlinksky S.A., Simbirtsev A.S., Vorobyev A.A. Endogenic immunomodulators. St. Petersburg, 1992. 256 p. (In Russ.)]
4. Маев И.В., Кучерявый Ю.А., Оганесян Т.С. Аллельный полиморфизм интерлейкина 1β при гелибактериозе // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, 2008. Т. 18, № 5. С. 4-11. [Mayev I.V., Kucheryavyy Yu.A., Oganesyanyan T.C. Interleukin-1β allelic polymorphism at *H. pylori* infection. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2008, Vol. 18, no. 5, pp. 4-11. (In Russ.)]
5. Супонева Н.А., Никитин С.С., Пирадов М.А., Меркулова Д.М. Хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия с острым началом и дыхательной недостаточностью // Нервные болезни, 2007. № 1. С. 40-44. [Suponeva N.A., Nikitin S.S., Piradov M.A., Merkulova D.M. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with acute onset and respiratory failure. *Nervnye bolezni = Neurological Diseases*, 2007, no. 1, pp. 40-44. (In Russ.)]
6. Супонева Н.А. Клиническая и диагностическая роль аутоантител к ганглиозидам периферических нервов: обзор литературы и собственные данные // Нервно-мышечные болезни, 2013. № 1. С. 26-33. [Suponeva N.A. Clinical and diagnostic role of autoantibodies to gangliosides of peripheral nerves: literature review and own experience. *Nervno-myshechnye bolezni = Neuromuscular Diseases*, 2013, no. 1, pp. 26-34. (In Russ.)]
7. Терскова Н.В., Шнайдер Н.А., Вахрушев С.Г., Иконникова Е.В., Пилюгина М.С. Роль полиморфизма гена интерлейкина-1β в развитии воспаления глоточной миндалины // Российская оториноларингология, 2010. Т. 49, № 6. С. 87-93. [Terskova N.V., Shnayder N.A., Vakhrushev S.G., Ikonnikova E.V., Pilyugina M.S. The role of interleukin-1β gene polymorphism in pathogenesis of tonsillitis. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2010, Vol. 49, no. 6, pp. 87-93. (In Russ.)]
8. Шнайдер Н.А., Кантимирова Е.А. Эпидемиологическая и клиническая характеристика отдельных форм полиневропатий (на примере ЗАТО Железногорск Красноярского края) // Нервно-мышечные болезни, 2011. № 1. С. 34-40. [Schnayder N.A., Kantimirova E.A. Epidemiological and clinical characteristics of individual forms of polyneuropathies (in Zheleznogorsk, Krasnoyarsk Region). *Nervno-myshechnye bolezni = Neuromuscular Diseases*, 2011, no. 1, pp. 34-40. (In Russ.)]
9. Abuzarova E.R. Polymorphism of *Helicobacter pylori* genotypes and cytokines (IL1 and IL10) in patients with gastric and duodenal ulcer. *Helicobacter*, 2007, Vol. 12, no. 4, p. 401.
10. Dalakas M.C. Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP. *Nat. Rev. Neurol.*, 2011, Vol. 7, pp. 507-517.

11. Lünemann J., Tackenberg B., Stein A., Wandinger K., Oertel W., Wagner H., Münz C., Meisel H., Sommer N., Zipp F. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in patients with CIDP. *J. Neuroimmunol.*, 2010, Vol. 218, no. 1-2, pp. 107-111.
12. Stübgen J.-P. A review on the use biological agents for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J. Neuro. Sci.*, 2013, Vol. 326, pp. 1-9.
13. Vanasse M., Rossignol E., Hadad E. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Handb. Clin. Neurol.*, 2013, Vol. 112, pp. 1163-1169.

Авторы:

Попова Т.Е. — д.м.н., доцент, профессор кафедры неврологии и психиатрии Медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Россия

Шнайдер Н.А. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой медицинской генетики и клинической нейрофизиологии ИПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого», г. Красноярск, Россия

Петрова М.М. — д.м.н., профессор, проректор по научной работе ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого», г. Красноярск, Россия

Таппахов А.А. — аспирант кафедры неврологии и психиатрии Медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Россия

Authors:

Popova T.E., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Neurology and Psychiatry, Medical Institute, M. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russian Federation

Shnayder N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Medical Genetics and Clinical Neurophysiology, V. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Petrova M.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Vice-Rector for Research, V. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Tappakhov A.A., Postgraduate Student, Department of Neurology and Psychiatry, Medical Institute, M. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russian Federation

Поступила 24.03.2018
Отправлена на доработку 05.04.2018
Принята к печати 22.05.2018

Received 24.03.2018
Revision received 05.04.2018
Accepted 22.05.2018

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Чурина Е.Г.^{1,2}, Уразова О.И.¹, Новицкий В.В.¹, Ситникова А.В.¹,
Бармина С.Э.¹

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

Резюме. Заболеваемость туберкулезом легких (ТБ) приобретает широкие масштабы в связи с расширением спектра резистентности *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) к противотуберкулезным средствам и высокой вирулентностью инфицирующих штаммов МБТ. Антигены МБТ способны вызывать дисфункцию рецепторного аппарата и модулировать цитокинсекреторную функцию иммуокомпетентных клеток. Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов, которые вовлечены в механизмы защитных реакций врожденного иммунитета, определяет степень резистентности индивида к микобактериальной инфекции, а также тяжесть и продолжительность заболевания в случае его клинической манифестации. Цель работы: исследование связи аллельного полиморфизма генов *TNFA*, *IL2*, *IFNG* с изменениями *in vitro* секреции TNF α , IL-2, IFN γ мононуклеарными лейкоцитами у пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания.

Обследовано 334 больных (220 мужчин и 114 женщин) в возрасте от 23 до 50 лет с впервые выявленным инфильтративным ТБ (ИТБ) и диссеминированным ТБ (ДТБ). Группу сравнения составили 183 здоровых донора (130 мужчин и 53 женщины) аналогичного возраста. Материалом исследования являлись ДНК, экстрагированная из цельной крови, и супернатанты культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из венозной крови у здоровых добровольцев и больных ТБ. Оценку секреции цитокинов осуществляли путем измерения их концентрации в культуральных супернатантах мононуклеарных лейкоцитов методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Для исследования полиморфных участков генов цитокинов использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica for Windows Version 6.0 (StatSoft Inc., США).

Дисбаланс секреции провоспалительных цитокинов у больных ТБ ассоциирован с носительством полиморфных вариантов их генов. Продемонстрировано, что гипосекреция IL-2 определяется носительством аллеля *G* и генотипа *GG* (*T-330G*) гена *IL2* как в контрольной группе, так и у больных ТБ вне зависимости от клинической формы. У больных ДТБ — носителей гомозиготного генотипа *TT* (*T-330G*) гена *IL2* — установлена повышенная секреция белка. Максимальная секреция TNF α регистрировалась у лиц с генотипом *AA* (*G-308A*) гена *TNFA* в контрольной группе и у больных ИТБ, минимальная концентрация TNF α связана с носительством гомозиготного генотипа *GG* (*G-308A*) гена

Адрес для переписки:

Чурина Елена Георгиевна
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел.: 8 (3822) 90-11-01 (доп. 1742).
E-mail: Lena1236@yandex.ru

Address for correspondence:

Churina Elena G.
Siberian State Medical University
634050, Russian Federation, Tomsk, Moskovsky Trakt, 2.
Phone: 7 (3822) 90-11-01 (add. 1742).
E-mail: Lena1236@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, А.В. Ситникова, С.Э. Бармина «Функциональный полиморфизм генов провоспалительных цитокинов при туберкулезе легких» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 149–156.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-149-156
© Чурина Е.Г. и соавт., 2019

For citation:

E.G. Churina, O.I. Urazova, V.V. Novitsky, A.V. Sitnikova, S.E. Barmina "Functional polymorphism of the pro-inflammatory cytokine genes in pulmonary tuberculosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 149–156.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-149-156
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-149-156

TNFA во всех обследованных группах. У больных ИТБ и ДТБ повышение секреции $IFN\gamma$ мононуклеарными лейкоцитами крови не связано с носительством полиморфизма +874A/T гена *IFNG*.

Снижение секреции IL-2 и $TNF\alpha$ у больных ТБ ассоциировано с полиморфизмами их генов – (T-330G) гена *IL2* и (G-308A) гена *TNFA* соответственно. Полиморфизм (+874A/T) гена *IFNG* не оказывает модулирующего влияния на секрецию $IFN\gamma$ при ТБ вне зависимости от клинической формы болезни.

Ключевые слова: аллельный полиморфизм генов, провоспалительные цитокины, IL-2, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, туберкулез легких, иммунный ответ

FUNCTIONAL POLYMORPHISM OF THE PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE GENES IN PULMONARY TUBERCULOSIS

Churina E.G.^{a,b}, Urazova O.I.^a, Novitsky V.V.^a, Sitnikova A.V.^a,
Barmina S.E.^a

^a Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

^b National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. In the present time, incidence of pulmonary tuberculosis (TB) becomes broader, due to spreading resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) to anti-tuberculosis drugs and infection with highly virulent strains of *M. tuberculosis*. The MBT antigens can cause dysfunction of the receptors and modulate the cytokine secreting function of immunocompetent cells. Polymorphic genes of pro-inflammatory cytokines involved in the mechanisms of defense responses of innate immunity, determine the degree of resistance to individual mycobacterial infection, as well as severity and duration of the disease in cases of clinical manifestations. The aim of the study was to investigate the connections between allelic polymorphisms of *IL2*, *IFNG* and *TNFA* genes and changes in secretion of the corresponding pro-inflammatory cytokines IL-2, $IFN\gamma$, and $TNF\alpha$ *in vitro* in patients with the newly diagnosed pulmonary tuberculosis (TB), depending on the clinical form of the disease.

A total of 334 patients (220 men and 114 women) aged 23 to 50 years with newly diagnosed infiltrative and disseminated TB were enrolled into the study. The control group consisted of 183 healthy donors (130 men and 53 women) of corresponding age. The material of the research included DNA extracted from the whole blood and supernatants of culture suspensions of mononuclear leukocytes isolated from venous blood in healthy volunteers and patients with TB. The evaluation of cytokines secretion was performed by measuring their concentration in the blood mononuclear cell culture supernatants. using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To study polymorphic regions of cytokine genes, a polymerase chain reaction (PCR) was applied. Analysis of the obtained data was carried out by means of the program Statistica for Windows Version 6.0 (StatSoft Inc., USA).

It was found that the imbalance of secretion of pro-inflammatory cytokines in TB patients was associated with the polymorphic variants of genes of these cytokines. It was found that the hypo-secretion of IL-2 is determined by the carriage of the G allele and genotype GG (T-330G) of the *IL2* gene in both the control group and in patients with TB, regardless of the clinical form. In patients with DTB carriers of the homozygous genotype TT (T-330G) of the *IL2* gene, increased protein secretion was established. The maximum secretion of $TNF\alpha$ was recorded in patients with the AA genotype (G-308A) of the *TNFA* gene in the control group and in ITB patients; the minimum concentration of $TNF\alpha$ was associated with the carrier of the homozygous GG genotype (G-308A) of the *TNFA* gene in all the examined groups. In patients with ITB and DTB, an increase in $IFN\gamma$ secretion by mononuclear blood leukocytes is not associated with the carrier of polymorphism +874A/T of the *IFNG* gene.

Reduced secretion of IL-2 and $TNF\alpha$ in TB patients is associated with polymorphisms of their genes – (T-330G) of *IL2* gene and (G-308A) of *TNFA* gene, respectively. The polymorphism (+874A/T) of the *IFNG* gene does not have a modulatory effect on the secretion of $IFN\gamma$ in patients with TB, regardless of clinical form of the disease.

Keywords: allelic gene polymorphism, proinflammatory cytokines, IL-2, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, pulmonary tuberculosis, immune response

Работа осуществлена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК №16.512.11.2046), РФФИ (Проект №11-04-98057-р_сибирь_a), Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-614.2012.7, НШ-4184.2014.7, НШ-2690.2018.7).

Введение

Заболеемость туберкулезом легких (ТБ) приобретает широкие масштабы в связи с расширением спектра резистентности микобактерий туберкулеза (МБТ) к противотуберкулезным средствам и высокой вирулентностью инфицирующих штаммов МБТ. Антигены МБТ способны вызывать дисфункцию рецепторного аппарата и модулировать цитокинсекреторную активность иммунокомпетентных клеток [2, 5]. Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов, которые вовлечены в механизмы защитных реакций врожденного иммунитета, определяет степень резистентности индивида к микобактериальной инфекции, а также тяжесть и продолжительность заболевания в случае его клинической манифестации. ТБ относится к группе мультифакторных заболеваний, в основе которых лежит, наряду с действием болезнетворных факторов внешней среды, неблагоприятное сочетание аллельных вариантов генов, в частности генов иммунного контроля [1]. Это обусловлено полиморфностью системы цитокинов, их плеiotропным действием, а также тем, что конечный эффект воздействия на клетку формируется комплексом медиаторов. Таким образом, актуальным становится изучение взаимосвязи иммунопатогенетических факторов инфекционного заболевания с целым рядом аллельных вариантов генов цитокинов [1, 6].

В связи с изложенным **целью настоящего исследования** явилось установление взаимосвязи аллельного полиморфизма генов *TNFA*, *IL2*, *IFNG* с изменениями *in vitro* секреции соответствующих провоспалительных цитокинов TNF α , IL-2 и IFN γ мононуклеарными лейкоцитами у пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания.

Материалы и методы

Обследовано 334 пациента с впервые выявленным ТБ (220 мужчин и 114 женщин). Средний возраст обследованных лиц составил 43,10 $\pm$ 10,46 лет. Все обследованные пациенты находились на стационарном лечении в Томском фтизиопульмонологическом медицинском центре в отделении для больных туберкулезом. Выборка была однородной как по расовой принадлежности, так и по этническому происхождению (все

пациенты были русскими и не имели между собой родства). Диагноз ТБ устанавливался на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Все больные были обследованы до назначения специфической противотуберкулезной химиотерапии. Они были разделены на две группы по клинической форме заболевания: 177 больных с инфильтративным ТБ (ИТБ) и 157 больных диссеминированным ТБ (ДТБ).

В исследование не включались больные, получавшие на момент исследования терапию противотуберкулезными, нестероидными противовоспалительными средствами и глюкокортикостероидами; больные с тяжелыми сопутствующими заболеваниями (онкологические заболевания, сахарный диабет, бронхиальная астма); больные с иммунозависимыми, в том числе аутоиммунными и аллергическими заболеваниями, инфицированные вирусами гепатита и ВИЧ; больные, которым применялась иммунотерапия. Группу сравнения составили 183 здоровых донора (130 мужчин и 53 женщины) в возрасте от 23 до 50 лет (средний возраст — 41,31 $\pm$ 7,47 лет). У всех обследованных лиц было получено добровольное информированное согласие на проведение необходимых для исследования манипуляций.

Материалом исследования являлась ДНК и супернатанты культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из венозной крови, взятой утром натощак из локтевой вены в количестве 20 мл у больных ТБ до назначения специфической химиотерапии и у здоровых добровольцев.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из цельной крови выполняли на градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1077 \text{ кг/м}^3$) (Мед-биоспектр, Россия). Количество клеток в суспензии стандартизировали до $2,5 \times 10^6/\text{мл}$. Клетки культивировали в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640 (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), 10% инаktivированной эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «БиолоТ», Россия), 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина, при 37 °C и 5% CO $_2$ в течение 24 ч. Супернатанты использовали для измерения концентрации цитокинов TNF α , IL-2 и IFN γ с помощью твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» метода (ELISA). Процедуру иммуноферментного анализа выполняли по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем (Протеиновый контур, Россия; Biosource, США). Оптическую плотность содержимого ячеек планшета регистрировали на фотометре-анализаторе Multiscan EX (Финляндия) при длине волны 450 нм.

Выделение ДНК из крови выполняли согласно инструкции, прилагаемой к набору «ДНК-сорб-В» (ИнтерЛабСервис, Россия). Исследование полиморфных участков генов цитокинов осуществлялось с использованием аллель-специфичной амплификации специфических участков генома. Были исследованы полиморфные сайты *T-330G* гена *IL2* (rs2069762), *G-308A* гена *TNFA* (rs1800629), *+874A/T* гена *IFNG* (rs2340561). Исследованные аллельные варианты относятся к SNP-полиморфизмам, т.е. характеризуются заменой одного нуклеотида. Для выбора полиморфизмов использовали базы данных Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, <http://www.omim.org/>) и National Center for Biotechnological Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>), для подбора праймеров – программу Primer3 v0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Амплификацию осуществляли путем полимеразной цепной реакции (ПЦР), выбирая структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе, с применением амплификатора «Терцик МС2» («ДНК-технология», Россия).

Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica for Windows

Version 6.0 (StatSoft Inc., США). Проверку соответствия наблюдаемых частот генотипов исследуемых полиморфизмов генов ожидаемым их частотам при соответствии равновесию Харди–Вайнберга проводили с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей и генотипов в группах исследования использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность или (когда число наблюдений, по крайней мере, в одной из ячеек таблиц сопряженности было менее 5) точный тест Фишера. Об ассоциации исследуемых полиморфизмов с ТБ судили по величине отношения шансов (Odds Ratio (OR)) с расчетом 95% доверительного интервала. При $OR < 1$ судили об отрицательной связи между признаками, при $OR > 1$ – о положительной их связи. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты

Ген фактора некроза опухоли альфа (*TNFA*) находится в шестой хромосоме (6p21.3) и имеет функциональный полиморфизм *G-308A*. Проведенные нами исследования показали, что в контрольной группе максимальная секре-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ $TNF\alpha$ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРНЫХ СУСПЕНЗИЙ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ (ИТБ) И ДИССЕМНИРОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ (ДТБ) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ЛОКУСА *G-308A* ГЕНА *TNFA*, пг/мл, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. $TNF\alpha$ CONTENT IN SUPERNATANTS OF MONONUCLEAR BLOOD LEUKOCYTE CULTURE SUSPENSIONS IN HEALTHY DONORS AND IN PATIENTS WITH INFILTRATIVE (ITB) AND DISSEMINATED PULMONARY TUBERCULOSIS (DTB), DEPENDING ON THE GENOTYPE OF THE *TNFA* OF LOCUS *G-308A*, pg/ml, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Генотип Genotype	Характеристика обследованных лиц Characteristics of the examined persons		
	Здоровые доноры Healthy donors	Больные туберкулезом легких Patients with pulmonary tuberculosis	
		Больные ИТБ Patients with ITB	Больные ДТБ Patients with DTB
GG	131,57 (119,60-186,50) $p_{GG/GA}^* < 0,05$	37,31 (35,87-38,76) $p_1 < 0,05$ $p_{GG/GA} < 0,05$	38,76 (35,87-60,08) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_{GG/GA} < 0,05$
GA	216,60 (193,10-221,00) $p_{GA/AA}^* < 0,05$	106,90 (90,85-119,57) $p_1 < 0,05$ $p_{GA/AA} < 0,05$	99,85 (93,99-112,85) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_{GA/AA} > 0,05$
AA	356,60 (329,50-525,40) $p_{GG/AA}^* < 0,05$	193,80 (187,8-197,7) $p_1 < 0,05$ $p_{GG/AA} < 0,05$	

Примечание. * – $p_{GG/GA}$, $p_{GA/AA}$, $p_{GG/AA}$ – достоверность различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса *G-308A* гена *TNFA*.

Note. *, $p_{GG/GA}$, $p_{GA/AA}$, $p_{GG/AA}$, the reliability of the differences in indices depending on the allele variant of the *G-308A* locus of the *TNFA* gene.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ IL-2 В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРНЫХ СУСПЕНЗИЙ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ (ИТБ) И ДИССЕМИНИРОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ (ДТБ) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ЛОКУСА T-330G ГЕНА IL2, пг/мл, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. IL-2 CONTENT IN SUPERNATANTS OF MONONUCLEAR BLOOD LEUKOCYTE CULTURE SUSPENSIONS IN HEALTHY DONORS AND IN PATIENTS WITH INFILTRATIVE (ITB) AND DISSEMINATED PULMONARY TUBERCULOSIS (DTB), DEPENDING ON THE GENOTYPE OF THE IL2 OF LOCUS T-330G, pg/ml, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Генотип Genotype	Характеристика обследованных лиц Characteristics of the examined persons		
	Здоровые доноры Healthy donors	Больные туберкулезом легких Patients with pulmonary tuberculosis	
		Больные ИТБ Patients with ITB	Больные ДТБ Patients with DTB
TT	30,32 (26,70-36,50) $p_{TT/TG}^* < 0,05$	31,31 (12,50-50,40) $p_1 > 0,05$ $p_{TT/TG} > 0,05$	53,82 (52,10-59,04) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_{TT/TG} < 0,05$
TG	14,67 (13,93-17,50) $p_{TG/GG}^* < 0,05$	17,04 (10,89-24,77) $p_1 > 0,05$ $p_{TG/GG} > 0,05$	18,00 (12,86-32,46) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_{TG/GG} < 0,05$
GG	12,16 (11,04-13,28) $p_{TT/GG}^* < 0,05$	9,18 (7,86-19,21) $p_1 > 0,05$ $p_{TT/GG} > 0,05$	7,86 (5,10-10,81) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_{TT/GG} < 0,05$

Примечание. * – $p_{TT/GG}$, $p_{TG/GG}$, $p_{TT/TG}$ – достоверность различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса T-330G гена IL2.

Note. *, $p_{TT/GG}$, $p_{TG/GG}$, $p_{TT/TG}$, the reliability of the differences in indices depending on the allele variant of the T-330G locus of the IL2 gene.

ция TNF α регистрировалась у лиц с генотипом AA (G-308A) гена TNFA по сравнению с другими вариантами сочетаний аллелей исследуемого гена ($p_{GA/AA} < 0,05$; $p_{GG/AA} < 0,05$) (табл. 1).

В группе больных ДТБ лица, несущие генотип AA (G-308A) гена TNFA, отсутствовали. В группах больных ИТБ и ДТБ минимальная концентрация исследуемого цитокина регистрировалась у носителей гомозиготного генотипа GG (G-308A) гена TNFA по сравнению с лицами, несущими генотипы GA и AA ($p_{GG/GA} < 0,05$ и $p_{GG/AA} < 0,05$) (табл. 1). Следует отметить, что концентрация TNF α в супернатантах культуральных суспензий у больных ТБ в целом была значимо ниже, чем у здоровых доноров. Так, концентрация исследуемого цитокина оказалась ниже по сравнению с соответствующими показателями в группе контроля у больных с генотипом GG (G-308A) гена TNFA более чем в 3,4 раза, с генотипом GA – в 2 раза и с генотипом AA – в 1,8 раза (табл. 1).

Изменения в промоторной области влекут за собой изменение активности контролируемого гена. Поскольку известно, что полиморфизм T-330G расположен в области промотора гена IL2, то теоретически замена тимина на гуанин

в позиции -330 п.н. относительно стартовой точки транскрипции должна быть связана с уровнем экспрессии гена, а соответственно, и с уровнем синтеза и секреции кодируемого продукта. При анализе секреции IL-2 в зависимости от аллельного варианта полиморфизма T-330G гена IL2 было обнаружено, что в контрольной группе у носителей гомозиготного генотипа по аллелю T уровень секреции цитокина был максимальным, а у носителей гомозиготного генотипа по аллелю G – минимальным (табл. 2). В группе здоровых доноров у гетерозигот TG полиморфизма T-330G гена IL2 спонтанная секреция IL-2 оказалась ниже, чем у гомозигот по аллелю T ($p_{TT/TG} < 0,05$). Более низкий уровень спонтанной секреции IL-2 выявлялся также у гомозигот по аллелю G ($p_{TT/GG} < 0,05$) по сравнению с гомозиготами по аллелю T (T-330G) гена IL2 (табл. 2).

Интересным является факт, что у больных ДТБ с носительством гомозиготного генотипа TT полиморфизма T-330G гена IL2 уровень секреции IL-2 оказался значимо выше, чем в группе контроля ($p_1 < 0,05$), у больных ИТБ ($p_2 < 0,05$) (табл. 2) и у больных ДТБ с другими генотипами

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ $IFN\gamma$ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРНЫХ СУСПЕНЗИЙ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ (ИТБ) И ДИССЕМНИРОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ (ДТБ) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ЛОКУСА +874A/T ГЕНА *IFNG*, пг/мл, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. $IFN\gamma$ CONTENT IN SUPERNATANTS OF MONONUCLEAR BLOOD LEUKOCYTE CULTURE SUSPENSIONS IN HEALTHY DONORS AND IN PATIENTS WITH INFILTRATIVE (ITB) AND DISSEMINATED PULMONARY TUBERCULOSIS (DTB), DEPENDING ON THE GENOTYPE OF THE *IFNG* OF LOCUS +874A/T, pg/ml, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Генотип Genotype	Характеристика обследованных лиц Characteristics of the examined persons		
	Здоровые доноры Healthy donors	Больные туберкулезом легких Patients with pulmonary tuberculosis	
		Больные ИТБ Patients with ITB	Больные ДТБ Patients with DTB
AA	26,31 (21,42-26,75) $p_{AA/AT}^* < 0,05$	56,35 (39,28-79,84) $p_1 < 0,05$ $p_{AA/AT} < 0,05$	
AT	31,91 (30,20-37,18) $p_{AT/TT}^* < 0,05$	113,20 (98,17-154,30) $p_1 < 0,05$ $p_{AT/TT} > 0,05$	146,60 (116,60-163,20) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_{AT/TT} < 0,05$
TT	44,73 (42,60-86,60) $p_{AA/TT}^* < 0,05$	148,80 (147,30-165,76) $p_1 < 0,05$ $p_{AA/TT} < 0,05$	325,30 (321,10-337,30) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_{AA/TT} > 0,05$

Примечание. * – $p_{AA/AT}$, $p_{AT/TT}$, $p_{AA/TT}$ – достоверность различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса +874A/T гена *IFNG*.

Note. *, $p_{AA/AT}$, $p_{AT/TT}$, $p_{AA/TT}$, the reliability of the differences in indices depending on the allele variant of the +874A/T locus of the *IFNG* gene.

($p_{TT/TG} < 0,05$; $p_{TT/GG} < 0,05$ и $p_{TG/GG} < 0,05$) полиморфизма T-330G гена *IL2* (табл. 2).

Исследование функционального полиморфизма +874A/T гена *IFNG*, находящегося в длинном плече двенадцатой хромосомы человека (12q14), показало, что максимальный уровень секреции $IFN\gamma$ сочетается с гомозиготным генотипом по аллелю T, минимальный – с гомозиготным генотипом по аллелю A ($p_{AA/AT} < 0,05$, $p_{AA/TT} < 0,05$, $p_{AT/TT} < 0,05$) (табл. 3).

В группе больных ИТБ более низкая секреция $IFN\gamma$ отмечалась у лиц, несущих генотип AA полиморфного варианта +874A/T гена *IFNG*, по сравнению с таковой у носителей альтернативных генотипов ($p_{AA/AT} < 0,05$ и $p_{AA/TT} < 0,05$) (табл. 3). В группе больных ДТБ носителей генотипа AA (+874A/T) гена *IFNG* не было выявлено, а пациенты с гетерозиготным генотипом имели более низкое содержание $IFN\gamma$ в клеточных супернатантах по сравнению с больными с генотипом TT ($p_{AT/TT} < 0,05$). В целом у больных ИТБ и ДТБ уровень секреции $IFN\gamma$, вне зависимости от генотипа полиморфизма +874A/T гена *IFNG*, был значимо выше, чем у здоровых доноров ($p_1 < 0,05$) (табл. 3).

Обсуждение

В нарушении эффекторных механизмов врожденного иммунитета при инфекционных заболеваниях снижение секреции провоспалительных цитокинов – ключевой патогенетический фактор. Функциональный полиморфизм регуляторных участков генов цитокинов влияет на количество секретируемого белка, но не изменяет его аминокислотную последовательность. Известно, что полиморфизм G-308A повышает транскрипционную активность гена *TNFA* и, соответственно, продукцию цитокина, как конститутивную, так и индуцированную [3]. Роль полиморфного аллеля -308A при туберкулезной инфекции неоднозначна. Ряд авторов указывают на то, что аллель -308A гена *TNFA* значительно чаще встречается среди больных ТБ по сравнению со здоровыми лицами, то есть является фактором риска возникновения и развития ТБ [3, 6]. Другие авторы указывают на протективную роль -308A на первых этапах заболевания, однако при развитии деструктивных форм ТБ наличие такого высокопродуцирующего аллеля способствует ухудшению состояния и возникновению рецидивов [11].

В ходе проведенных нами исследований выявлено, что наиболее высокий уровень секреции TNF α определяется у носителей гомозиготного AA варианта полиморфного участка G-308A гена TNFA, а наиболее низкий — у носителей гомозиготного генотипа GG (табл. 1). Можно предположить, что генотип AA полиморфизма G-308A выполняет протективную функцию при ТБ, однако в целом секреция TNF α у обследованных нами больных была ниже, чем у здоровых лиц.

IL-2 активирует миграцию макрофагов в направлении локализации МБТ, повышает ферментативную и общую бактерицидную активность макрофагов, а также активирует процессы пролиферации, дифференцировки и секреторную функцию Т-лимфоцитов. Аллельный полиморфизм T-330G промотора гена IL2 еще недостаточно изучен, ведутся исследования его ассоциаций с различными инфекционными заболеваниями, в том числе ТБ. При изучении зависимости между содержанием IL-2 в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов и вариантом полиморфного сайта T-330G соответствующего гена было показано, что у индивидов (здоровых и больных ТБ) с генотипом GG уровень секреции IL-2 *in vitro* был значимо ниже, чем у носителей с генотипами TT и TG (табл. 2). Таким образом, аллельный полиморфизм T-330G гена IL2 оказывает влияние на уровень секреции IL-2. Наличие в генотипе человека генотипа GG полиморфного участка T-330G гена IL2 ассоциировано с низким уровнем продукции соответствующего белка, что может быть фактором риска развития ТБ, учитывая важную роль IL-2 в реакциях противотуберкулезного иммунитета как основного Т-клеточного фактора роста.

Другим ключевым провоспалительным и иммунорегуляторным цитокином, характеризующим эффективность ответа на МБТ при туберкулезной инфекции, является IFN γ . Повышение содержания IFN γ в цельной крови используется как тест, альтернативный туберкулиновой пробе. Известно, что наличие аллеля +874T в гене IFNG ассоциировано с повышенной экспрессией гена и, следовательно, с активацией продукции IFN γ [4, 9]. Полиморфизм +874A/T гена IFNG (замена аденина на тимин) связан с восприим-

чивостью к ТБ [4, 6]. Поскольку полиморфный сайт +874A/T находится в интроне гена IFNG, мы исследовали зависимость секреции IFN γ от аллельных вариантов соответствующего гена, которая в среднем у больных ТБ была выше нормы (табл. 3). Показано, что наиболее низкий уровень секреции IFN γ определяется у носителей гомозиготного AA варианта (табл. 3). Очевидно, что генетически детерминированная гипосекреция IFN γ — неблагоприятный фактор, потому как опосредует ослабление эффекторной функции макрофагов и их превращение из бактерицидных клеток в «резервуар» микобактериальной инфекции [8, 10, 12]. Ввиду того, что у больных ТБ гиперсекреция IFN γ *in vitro* регистрировалась вне зависимости от генотипов полиморфизма +874A/T гена IFNG (в том числе сочеталась с носительством «низкопродуцирующего» генотипа AA), можно полагать, что она не связана с данным полиморфизмом гена IFNG. По-видимому, она является результатом высокой иммуногенности *M. tuberculosis* и активирующего действия возбудителя ТБ на клетки-продуценты IFN γ . Известно, что регуляция первичной транскрипции, экспрессии и, как следствие, функциональный полиморфизм генов цитокинов во многом связаны с явлением альтернативного сплайсинга. В результате образуются разные матричные РНК и разные белки одного первичного транскрипта с различной функциональной активностью [7].

Таким образом, функциональный полиморфизм генов провоспалительных цитокинов TNF α , IL-2 и IFN γ является существенным фактором дисрегуляции секреторной функции иммунокомпетентных клеток, в связи с чем может predispose не только к развитию ТБ, но и к утяжелению и прогрессированию его течения. В то же время пока не ясно, какие мутации и каких именно генов имеют решающее значение. Вероятно, большую роль играют не столько отдельные аллели генов, сколько их сочетания. Перспективное направление иммуногенетических исследований цитокинов — изучение роли сочетаний аллелей в подверженности к инфицированию и длительному пребыванию возбудителя инфекции в организме.

Список литературы / References

1. Абрамов Д.Д., Кофиади И.А., Уткин К.В., Трофимов Д.Ю., Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Полиморфизм одиночных нуклеотидов в генах цитокинов и их рецепторов: биологический эффект и методы идентификации // Иммунология, 2011. № 5. С. 275-280. [Abramov D.D., Kofiadi I.A., Utkin K.V., Trofimov D.Yu., Khaitov R.M., Alekseev L.P. Single nucleotide polymorphism in the genes of cytokines and their receptors: biological effects and methods of identification. *Immunologiya = Immunology*, 2011, no. 5, pp. 275-280. (In Russ.)]
2. Тарабаева А.С., Ракишева А.С., Абиляева А.А., Омеляненко С.М., Ли В. Роль цитокинов Т-хелперов в патогенезе туберкулеза // Цитокины и воспаление, 2016. Т. 15, № 2. С. 140-147. [Tarabayeva A.S., Rakisheva A.S., Abilbayeva A.A., Omelyanenko S.M., Li V. The role of helper T-cell cytokines in the tuberculosis pathogenesis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2016, Vol. 15, no. 2, pp. 140-147. (In Russ.)]

3. Ates O., Mussellim B., Ongen G., Topal-Sarikaya A. Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- α genes polymorphisms in tuberculosis. *J. Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 28, pp. 232-236.
4. Bream J.H., Carrington M., O'Toole S., Dean M., Gerrard B., Shin H.D., Kosack D., Modi W., Young H.A., Smith M.W. Polymorphisms of the human *IFNG* gene noncoding regions. *Immunogenetics*, 2000, Vol. 51, pp. 50-58.
5. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V. The role of Foxp3-expressing regulatory T-cells and T-helpers in immunopathogenesis of multi-drug resistant pulmonary tuberculosis. *Hindawi Publishing Corporation, Tuberculosis Research and Treatment*, 2012, Vol. 2012, 931291, p. 9. doi: 10.1155/2012/931291.
6. Henao M.I., Montes C., Paris S.C., Garcia L.F. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis*, 2006, Vol. 86, pp. 11-19.
7. Kalsotra A., Cooper T.A. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nat. Rev. Genet.*, 2011, Vol. 12, no. 10, pp. 715-729.
8. Lerner T.R., Griffiths G., Gutierrez M.G. Lymphatic endothelial cells are a replicative niche for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Invest.*, 2017, Vol. 126, no. 3, pp. 1093-1108.
9. Mansouri F., Heydarzadeh R., Yousefi S. The association of interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-17 single-nucleotide polymorphisms with susceptibility to tuberculosis. *APMIS*, 2018, Vol. 126, no. 3, pp. 227-233.
10. Saini A., Mahajan S., Ahuja N., Bhagyaraj E., Kalra R., Janmeja A.K., Gupta P. An accord of nuclear receptor expression in *M. tuberculosis* infected macrophages and dendritic cells. *Scientific Reports*, 2018, Vol. 8, 2296. doi:10.1038/s41598-018-20769-4.
11. Wang S., Wei M., Han Y., Zhang K., He L., Yang Z., Su B., Zhang Z., Hu Y., Hui W. Roles of TNF- α gene polymorphisms in the occurrence and progress of SARS-Cov infection: A case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 2008, Vol. 8, no. 27 (2), pp. 1-10.
12. Yang R., Yang E., Shen L., Modlin R.L., Shen H., Chen Z.W. IL-12+IL-18 cosignaling in human macrophages and lung epithelial cells activates cathelicidin and autophagy, inhibiting intracellular mycobacterial growth. *J. Immunol.*, 2018, pii: j1701073. doi: 10.4049/jimmunol.1701073.

Авторы:

Чурина Е.Г. — д.м.н., профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры органической химии, ведущий научный сотрудник лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

Уразова О.И. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

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

Ситникова А.В. — аспирант кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Бармина С.Э. — к.м.н., доцент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Authors:

Churina E.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University; Professor, Department of Organic Chemistry, Leading Research Associate, Laboratory of Translational Cellular and Molecular Biomedicine, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

Urazova O.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Novitskiy V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Honored Scientist of Russia, Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Sitnikova A.V., Postgraduate Student, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Barmina S.E., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 21.03.2018

Отправлена на доработку 05.04.2018

Принята к печати 09.04.2018

Received 21.03.2018

Revision received 05.04.2018

Accepted 09.04.2018

ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ В ДИНАМИКЕ

Смирнова О.В.¹, Каспаров Э.В.¹, Перепечай Я.И.¹, Несытых А.А.²,
Беляев В.С.²

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

² КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского», г. Красноярск, Россия

Резюме. Рак прямой кишки — одно из самых распространенных злокачественных заболеваний не только в России, но и во всем мире, составляет 5–6% всех злокачественных опухолей человека. Нейтрофильные гранулоциты активно вовлекаются в реализацию противоопухолевого ответа. Ключевую роль в регрессии опухоли отводят активным формам кислорода, продуцируемым нейтрофилами.

В связи с этим целью нашей работы явилось изучение особенностей спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных раком прямой кишки до начала патогенетической терапии и в динамике.

В работе приведены результаты лабораторного исследования показателей функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов 36 больных раком прямой кишки, больные находились на разных стадиях онкологического процесса. Контрольная группа состояла из 112 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с группой обследованных больных. Объектом исследования служила венозная кровь, которую брали у пациентов из локтевой вены в вакуумные пробирки с литий-гепарином утром натощак до проведения оперативного лечения и на 7 сутки после операции. Оценку спонтанной и индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL 3606» (Россия). Определялись следующие характеристики: время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции (T_{max}), максимальное значение интенсивности хемилюминесценции (I_{max}), площадь под кривой хемилюминесценции (S). В качестве усилителя хемилюминесценции использовали люминол. Индуктором респираторного взрыва служил опсонизированный зимозан. Усиление хемилюминесценции, индуцированной опсонизированным зимозаном, оценивали по соотношению площади индуцированной (S_{инд.}) к площади спонтанной (S_{спонт.}) хемилюминесценции и обозначали индексом активации.

Анализ хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов показал достоверное увеличение активности спонтанной хемилюминесценции на III и IV стадиях заболевания. Индуцированная опсонизированным зимозаном продукция активных форм кислорода нейтрофильными гранулоцитами повышается во всех исследуемых группах относительно контрольных параметров.

Адрес для переписки:

Смирнова Ольга Валентиновна
Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Address for correspondence:

Smirnova Olga V.
Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zheleznyak str., 3g.
Phone: 7 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Смирнова, Э.В. Каспаров, Я.И. Перепечай, А.А. Несытых, В.С. Беляев «Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных раком прямой кишки в динамике» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 157–164. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-157-164
© Смирнова О.В. и соавт., 2019

For citation:

O.V. Smirnova, E.V. Kasparov, Ya.I. Perepechay, A.A. Nesytykh, V. Belyaev. "Features of neutrophil chemiluminescence in the patients with advanced rectal cancer", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 157–164. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-157-164
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-157-164

Площадь под кривыми спонтанной и индуцированной хемилюминесценции у больных раком прямой кишки на всех стадиях онкологического процесса меньше по отношению к контрольной группе, что, несмотря на высокие показатели максимальной активности хемилюминесценции, может свидетельствовать о недостаточной суммарной продукции активных форм кислорода. Показатели времени выхода на максимум кривых хемилюминесценции у больных раком прямой кишки на всех стадиях заболевания не имели статистически значимых различий от группы контроля.

Ключевые слова: спонтанная хемилюминесцентная активность, индуцированная хемилюминесцентная активность, нейтрофильные гранулоциты, рак прямой кишки

FEATURES OF NEUTROPHIL CHEMILUMINESCENCE IN THE PATIENTS WITH ADVANCED RECTAL CANCER

Smirnova O.V.^a, Kasparov E.V.^a, Perepechay Ya.I.^a, Nesytykh A.A.^b, Belyaev V.S.^b

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

^b Krasnoyarsk Regional A.I. Kryzhanovsky Clinical Cancer Center, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Colorectal cancer is one of the most common malignant diseases in Russia worldwide making up 5-6% of all human malignant tumors. Neutrophilic granulocytes are actively involved in development of antitumor response. A key role in tumor regression is assigned to active forms of oxygen produced by neutrophils. In connection with these pre-requisites, our goal was to study functional characteristics of spontaneous and induced chemiluminescent activity of neutrophil granulocytes in patients with rectal cancer before starting pathogenetic therapy and in subsequent dynamics. The paper presents some laboratory results, i.e., functional indices of neutrophilic granulocytes' activity in 36 patients with rectal cancer being at different stages of oncological process. The control group consisted of 112 practically healthy volunteers, comparable in sex and age to the group of patients under study. To perform the study venous blood was taken from patients to vacuum test tubes with lithium heparin in the morning time before surgical treatment, and on day 7 after the surgical intervention. Evaluation of spontaneous and induced chemiluminescence was performed for 90 minutes in a 36-channel "CL 3606" chemiluminescence analyzer (Russia). The following characteristics were determined: time of the curve transition to maximal chemiluminescence intensity (Tmax), maximal value of chemiluminescence intensity (Imax), integral area under the chemiluminescence curve (S). Luminol was used as the chemiluminescence enhancer. Opsonized zymosan was used to induce the respiratory explosion. Chemiluminescence amplification induced by opsonized zymosan was evaluated by the ratio of induced-to-spontaneous chemiluminescence ($S_{ind/spont}$) designated as an activation index.

Analysis of chemiluminescence activity in neutrophilic granulocytes showed a significant increase in spontaneous chemiluminescence activity at the stages III and IV of the disease. The production of active oxygen forms induced in neutrophilic granulocytes by opsonized zymosan increased in all the study groups, relative to control parameters. The area under the curves of spontaneous and induced chemiluminescence in patients with colorectal cancer at all stages of the oncological process is less, as compared to the control group, which, despite high indices of maximal chemiluminescence activity, may indicate insufficient total production of reactive oxygen species. The time-to-peak values of the chemiluminescence curves in patients with rectal cancer at all stages of the disease did not show statistically significant differences from the control group.

Keywords: spontaneous chemiluminescent activity, induced chemiluminescent activity, neutrophil granulocytes, rectal cancer

Введение

Рак прямой кишки (РПК) — сегодня одно из самых распространенных злокачественных заболеваний не только в России, но и во всем мире, рост заболеваемости раком прямой кишки наиболее выражен в экономически развитых странах. В структуре онкологической заболеваемости рак

прямой кишки занимает от 4 до 6% всех злокачественных опухолей человека [5]. В России среди онкологических больных рак прямой кишки составляет 8,7%. Подавляющее число заболевших находится в возрасте старше 50 лет [1].

Раковые опухоли прямой кишки характеризуются медленным ростом и постепенным появлением клинических симптомов. Выраженные про-

явления болезни возникают тогда, когда опухоль достигает больших размеров. Одним из первых, но вместе с тем достаточно поздним проявлением заболевания являются выделения из прямой кишки слизи, а затем крови и гноя [8]. До 80% больных поступают в клинику с III и IV стадиями заболевания, а у каждого третьего больного из числа оперированных диагностируют отдаленные метастазы, преимущественно в печень (до 70%) [3].

Важнейшим звеном патогенеза рака прямой кишки, как и новообразований иной локализации, является процесс взаимодействия генетически измененной опухолевой ткани с иммунной системой организма человека. Нейтрофильные гранулоциты активно вовлекаются в реализацию противоопухолевого ответа — участвуют в уничтожении мутировавших клеток и первыми из клеток иммунной системы мигрируют к опухоли на ранних стадиях ее формирования [7]. Нейтрофильные гранулоциты способны осуществлять как непосредственную цитотоксичность, которая проявляется при активации секретной дегрануляции, респираторного взрыва, антителозависимой клеточной цитотоксичности, так и опосредованную с помощью привлечения других клеток иммунной системы [7].

Одним из первых этапов взаимодействия организма с чужеродным объектом являются реакции неспецифического иммунитета, в частности респираторный взрыв. При этом потребление кислорода фагоцитом может увеличиться в течение нескольких секунд во много раз. В результате дыхательного взрыва образуются цитотоксичные метаболиты кислорода, свободные радикалы и перекисные продукты органических и неорганических соединений [2]. Образование АФК происходит в мембране фаголизосом за счет инициации фермента NADPH-оксидазы [6].

В то же время злокачественная опухоль неоднозначно влияет на функцию НГ, уменьшает их хемотаксическую активность, подавляя адаптивный иммунитет [10, 11, 12]. Несомненно, что от состояния противоопухолевого иммунитета будут зависеть как распространенность, так и скорость прогрессирования онкологического заболевания [4]. Продукция активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами направлена на уничтожение чужеродных объектов, при этом низкая продукция АФК может указывать на недостаточность защитного потенциала организма [5, 8]. Следовательно, способность нейтрофильных гранулоцитов продуцировать достаточное количество АФК может служить прогностическим признаком для оценки защитных сил организма [13]. Существуют различные способы оценки образования АФК, одним из наиболее чувстви-

тельных является хемилюминесцентный метод. В качестве активаторов хемилюминесценции (ХЛ) наиболее широко используются люминол и люцигенин. Известно, что существует химическая специфичность активаторов: люминол вступает в реакцию с АФК образуемыми различными ферментами, а люцигенин — только с супероксидным анион-радикалом. В качестве неспецифического индуктора дыхательного взрыва в хемилюминесцентной реакции применяют зимозан, который представляет собой полисахарид, получаемый из культуры *Saccharomyces cerevisiae* [14]. **Целью нашего исследования** явилось изучение особенностей спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных раком прямой кишки до начала патогенетической терапии и в динамике.

Материалы и методы

В исследование включены 36 больных раком прямой кишки в возрасте от 26 до 78 лет. Средний возраст обследованных больных составил $61 \pm 11,5$ лет. Среди пациентов с РПК мужчин было 43%, а женщин 57%. На I и II стадии заболевания находились 50% исследуемых больных (5 человек на I стадии и 13 человек на II стадии), на III стадии — 25% (9 пациентов) и на IV стадии — 25% (9 пациентов). Всем пациентам выполнена морфологическая верификация опухоли: высокодифференцированная аденокарцинома выявлена у 6 больных, умеренно дифференцированная — у 24, низкодифференцированная — у 4, перстневидноклеточный рак — у 1 больного, плоскоклеточный рак — у 1 больного. Всем больным выполнено хирургическое вмешательство в различных объемах. Контрольная группа состояла из 112 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с группой обследованных больных. Группа контроля была отобрана при профилактических осмотрах в ЛПУ города Красноярска. Исследование проводилось с разрешения этического комитета КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского» и ФГБНУ ФИЦ КНЦ СО РАН «НИИ медицинских проблем Севера», каждый участник исследования подписал форму добровольного информированного согласия. Объектом исследования служила венозная кровь, которую брали у пациентов из локтевой вены в вакуумные пробирки с литий-гепарином утром натощак до проведения оперативного лечения и на 7 сутки после операции.

В качестве метода изучения противоопухолевой активности нейтрофильных гранулоцитов использовался хемилюминесцентный анализ спонтанной и индуцированной продукции АФК

НГ больных РПК. Оценку спонтанной и индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе "CL 3607" (Россия). Регистрация результатов и управление анализатором осуществлялись через персональный компьютер. Определялись следующие характеристики: время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции (T_{max}), максимальное значение интенсивности хемилюминесценции (I_{max}), площадь под кривой хемилюминесценции (S). В качестве усилителя хемилюминесценции использовали люминол. Индуктором респираторного взрыва служил опсонизированный зимозан. Усиление хемилюминесценции, индуцированной опсонизированным зимозаном, оценивали по соотношению площади индуцированной ($S_{инд.}$) к площади спонтанной ($S_{спонт.}$) хемилюминесценции и обозначали индексом активации [9].

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008). Для всех данных определяли медиану (Me) и персентили ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$), статистическую значимость различий определяли с использованием рангового критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Люминол-зависимая хемилюминесценция формируется в системе миелопероксидазы и отражает суммарную активность кислородных и других радикалов. Анализ хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов показал достоверное увеличение активности спонтанной хемилюминесценции на III и IV стадиях заболевания. На I и II стадиях РПК спонтанная хемилюминесцентная активность НГ не имела достоверных отличий от контрольной группы, на III стадии спонтанная хемилюминесцентная активность НГ превышала показатели контрольной группы в 2,49 раза ($p < 0,05$), а на IV стадии в 2,83 раза ($p < 0,05$). Площадь под кривой спонтанной хемилюминесцентной активности НГ у больных РПК на всех стадиях была меньше относительно группы здоровых людей, на I-II стадиях в 5,25 раза ($p < 0,001$), на III стадии в 4,56 раза, а на IV стадии в 4,79 раза ($p < 0,001$). Время выхода кривой спонтанной хемилюминесценции НГ на максимум не имело статистически достоверных различий между группами.

После индукции хемилюминесцентного ответа опсонизированным зимозаном у больных РПК отмечалось статистически значимое увеличение интенсивности индуцированной хемилюминесцентной активности НГ на всех стадиях заболевания. На I-II стадиях заболевания в 2,84 раза

($p < 0,05$) относительно контроля, у пациентов на III стадии РПК активность индуцированной хемилюминесценции превышала таковую у здоровых людей в 3,36 раза ($p < 0,05$), а на IV стадии в 4,36 раза.

Таким образом, на фоне повышенной спонтанной активности дополнительная стимуляция «респираторного взрыва» нейтрофильных гранулоцитов опсонизированным зимозаном приводит к соответствующему увеличению продукции АФК нейтрофилами крови, что свидетельствует о наличии резервных метаболических возможностей данной клеточной популяции больных РПК.

Площадь под кривой индуцированной хемилюминесценции у пациентов с раком прямой кишки была статистически значимо меньше относительно контрольной группы на I-II стадиях в 3,86 раза ($p < 0,001$), на III стадии в 2,75 раза ($p < 0,05$). На IV стадии РПК площадь под кривой индуцированной хемилюминесценции достоверных отличий от контрольной группы не имела.

Анализ функциональной активности НГ не показал достоверного изменения времени выхода на максимум кривой индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов пациентов с раком прямой кишки относительно контроля. Индекс активации НГ у больных раком прямой кишки на I-II и на IV был выше, чем в группе здоровых людей в 1,55 ($p < 0,05$) и 1,60 ($p < 0,05$) раза соответственно (табл. 1).

На 7 сутки после операции активность спонтанной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов остается повышенной относительно группы здоровых людей. На III стадии РПК активность спонтанной хемилюминесцентной активности НГ в 2,49 раза ($p < 0,05$) выше активности в контрольной группе, а на IV стадии в 2,83 раза выше ($p < 0,05$) (табл. 2).

Площадь под кривой спонтанной хемилюминесценции у больных на всех стадиях онкологического процесса меньше по сравнению с группой контроля, на I-II стадиях в 5,25 ($p < 0,001$), на III стадии в 4,55 ($p < 0,05$) и на IV стадии в 4,79 раза ($p < 0,05$).

Изучение параметров зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов больных РПК после оперативного лечения показало достоверное усиление свечения на всех стадиях онкологического процесса по сравнению с аналогичным параметром в контрольной группе, у больных на I-II стадиях в 2,15 ($p < 0,05$), на III стадии в 4,01 ($p < 0,05$) и на IV стадии в 5,71 раза ($p < 0,05$).

Площадь под кривой индуцированной хемилюминесценции на всех стадиях болезни была меньше относительно показателя в контрольной группе, на I-II стадиях в 5,51 ($p < 0,001$), на III

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. INDICES OF SPONTANEOUS AND INDUCED CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN PATIENTS WITH RECTAL CANCER, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Контрольная группа Control group n = 112 (1)		Больные с РПК (I и II стадия) Patients with RC (I and II stages) n = 18 (2)		Больные с РПК (III стадия) Patients with RC (III stage) n = 9 (3)		Больные с РПК (IV стадия) Patients with RC (IV stage) n = 18 (4)	
Tmax спонтанная (сек.) Tmax spontaneous (sec.)	981	604-1522	1348	975-1798	1227	886-1416	1198	1055-1444
Imax спонтанная (y. e.) Imax spontaneous (c. u.)	7978	3148-19815	17358	5213-24177	19852	16262-40324	22612	9432-149772
Squr спонтанная ($\times 10^8$) Square spontaneous ($\times 10^8$)	2,78	1,42-7,27	0,53	0,21-0,69	0,61	0,34-1,50	0,58	0,33-2,03
			$p_{1,2} < 0,001$		$p_{1,3} < 0,05$		$p_{1,4} < 0,05$	
Tmax индуцированная (сек.) Tmax induced (sec.)	1117	766-1495	1084	853-1379	953	809-1396	944	861-1372
Imax индуцированная (y. e.) Imax induced (c. u.)	16864	6940,0-32096,5	47939	24201-80078	56783	25503-91785	73466	34305-229974
Squr индуцированная ($\times 10^8$) Square induced ($\times 10^8$)	6,06	2,21-12,70	1,57	0,68-1,91	2,20	1,20-2,93	3,20	1,58-3,84
			$p_{1,2} < 0,001$		$p_{1,3} < 0,05$		$p_{1,4} < 0,05$	
Индекс активации Activation index	1,71	1,31-2,45	2,65	1,36-3,88	2,52	1,88-5,47	2,40	2,31-2,78
			$p_{1,2} < 0,05$		$p_{1,3} < 0,05$		$p_{1,4} < 0,05$	

Примечание. $p_{1,2}$ – статистически значимые различия между группой больных с РПК (I-II стадия) и контрольной группой; $p_{1,3}$ – статистически значимые различия между группой больных с РПК (III стадия) и контрольной группой; $p_{1,4}$ – статистически значимые различия между группой больных с РПК (IV стадия) и контрольной группой.

Note. $p_{1,2}$ is a statistical significant difference between the group of patients with RC (I-II stages) and control group; $p_{1,3}$, statistically significant differences between the group of patients with RC (III stage) and control group; $p_{1,4}$, statistically significant differences between the group of patients with RC (IV stage) and a control group.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ НА 7 СУТКИ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. INDICES OF SPONTANEOUS AND INDUCED CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN PATIENTS WITH RECTAL CANCER ON THE 7 DAY AFTER OPERATION, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Контрольная группа Control group n = 112 (1)		Больные с РПК (I и II стадия) Patients with RC (I and II stages) n = 18 (2)		Больные с РПК (III стадия) Patients with RC (III stage) n = 9 (3)		Больные с РПК (IV стадия) Patients with RC (IV stage) n = 18 (4)	
Тmax спонтанная (сек.) Tmax spontaneous (sec.)	981	604-1522	1087	676-1505	1632	1024-1911	1025	861-1377
	981	604-1522	1087	676-1505	1632	1024-1911	1025	861-1377
Imax спонтанная (у. е.) Imax spontaneous (c. u.)	7978	3148-19815	20142	5588-33015	21277	5606-25979	27213	22740-50208
	2,78	1,42-7,27	0,39	0,13-0,69	0,56	0,17-0,64	0,78	0,59-1,22
Squr спонтанная ($\times 10^8$) Square spontaneous ($\times 10^8$)	1117	766-1495	1285	1120-1499	1632	1024-1911	1286	1001-1509
	16864	6940,0-32096,5	36311	26528-88430	69122	46090-78479	96281	48289-115587
Тmax индуцированная (сек.) Tmax induced (sec.)	6,06	2,21-12,70	1,11	0,48-1,22	1,91	0,93-2,42	3,20	1,58-3,84
	1,71	1,31-2,45	2,19	1,58-3,98	3,83	3,46-4,49	2,40	2,31-2,78
Imax индуцированная (у. е.) Imax induced (c. u.)	1117	766-1495	1285	1120-1499	1632	1024-1911	1286	1001-1509
	16864	6940,0-32096,5	36311	26528-88430	69122	46090-78479	96281	48289-115587
Squr индуцированная ($\times 10^8$) Square induced ($\times 10^8$)	6,06	2,21-12,70	1,11	0,48-1,22	1,91	0,93-2,42	3,20	1,58-3,84
	1,71	1,31-2,45	2,19	1,58-3,98	3,83	3,46-4,49	2,40	2,31-2,78
Индекс активации Activation index	1,71	1,31-2,45	2,19	1,58-3,98	3,83	3,46-4,49	2,40	2,31-2,78
	1,71	1,31-2,45	2,19	1,58-3,98	3,83	3,46-4,49	2,40	2,31-2,78

Примечание. $p_{1,2}$ – статистически значимые различия между группой больных с РПК (I-II стадия) и контрольной группой; $p_{1,3}$ – статистически значимые различия между группой больных с РПК (III стадия) и контрольной группой; $p_{1,4}$ – статистически значимые различия между группой больных с РПК (IV стадия) и контрольной группой.
Note. $p_{1,2}$ is a statistical significant difference between the group of patients with RC (I-II stages) and control group; $p_{1,3}$, statistically significant differences between the group of patients with RC (III stage) and control group; $p_{1,4}$, statistically significant differences between the group of patients with RC (IV stage) and control group.

стадии в 3,17 ($p < 0,001$) и на IV стадии в 1,89 раза ($p < 0,05$). Индекс активации нейтрофильных гранулоцитов больных РПК на 7 сутки после операции выше относительно контрольной группы на I-II стадии в 1,2 раза, а на IV стадии в 1,4 раза.

Хемилюминесцентный анализ функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, характеризующий уровень продукции первичных и вторичных АФК у больных РПК, не показал достоверного изменения времени выхода на максимум кривых спонтанной и индуцированной хемилюминесценции на всех стадиях заболевания относительно контроля.

Заключение

Проведенные исследования показали, что развитие рака прямой кишки сопровождается изменением функциональных свойств периферических нейтрофильных гранулоцитов. По мере прогрессирования заболевания наблюдается уве-

личение спонтанной продукции АФК нейтрофилами. Так, показатели спонтанной продукции АФК у больных РПК на III и IV стадии достоверно выше показателей контрольной группы, что доказывает роль нейтрофильных гранулоцитов не только как клеток первой линии неспецифической противомикробной защиты, но и как цитотоксических эффекторов на опухолевые клетки. Индуцируемая продукция АФК нейтрофилами повышается во всех исследуемых группах относительно контрольных параметров.

Площадь под кривыми спонтанной и индуцированной хемилюминесценции у больных раком прямой кишки на всех стадиях онкологического процесса меньше по отношению к контрольной группе, что, несмотря на высокие показатели максимальной активности хемилюминесценции, может свидетельствовать о недостаточной суммарной продукции активных форм кислорода.

Список литературы / References

1. Балканов А.С., Гуров А.Н., Катунцева Н.А., Белоусова Е.А. Заболеваемость раком прямой кишки населения Московской области в 2010–2014 гг. // Альманах клинической медицины, 2016. Т 44, № 5. С. 599–605. [Balkanov A.S., Gurov A.N., Katuntseva N.A., Belousova E.A. Incidence of rectal cancer in the population of the Moscow region in 2010–2014. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, Vol. 44, no. 5, pp. 599–605. (In Russ.)]
2. Грачева Т.А. Совершенствование хемилюминесцентного метода исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток // Клиническая лабораторная диагностика, 2008. № 2. С. 54–55. [Gracheva T.A. Improvement of the chemiluminescence technique for investigating the functional activity of phagocytes. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2008, no. 2, pp. 54–55. (In Russ.)]
3. Давыдов М.И., Патютко Ю.И., Личиницер М.Р., Расулов А.О., Ткачев С.И., Подлужный Д.В., Алиев В.А., Татаев И.Ш., Овчинникова А.И. Современная лечебная тактика при раке прямой кишки с синхронными отдаленными метастазами (клиническое наблюдение) // Онкологическая колопроктология, 2014. № 1. С. 33–39. [Davydov M.I., Patyutko Yu.I., Lichinitser M.R., Rasulov A.O., Tkachev S.I., Podluzhny D.V., Aliev V.A., Tataev I.Sh., Ovchinnikova A.I. Current treatment policy for rectal cancer with synchronous distant metastases (a clinical case). *Onkologicheskaya koloproktologiya = Colorectal Oncology*, 2014, no. 1, pp. 33–39. (In Russ.)]
4. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никпелова Е.А., Комарова Е.Ф. Состояние свободнорадикальных процессов в ткани злокачественной опухоли толстой кишки // Сибирское медицинское обозрение, 2014. № 1. С. 30–34. [Kit O.I., Frantsiyants E.M., Nikpelova E.A., Komarova E.F. Condition of free radical processes in the tissue of a malignant tumor of the colon. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, no. 1, pp. 30–34. (In Russ.)]
5. Кохнюк В.Т. Рак прямой кишки в Республике Беларусь: распространенность, диагностика и результаты лечения // Онкологическая колопроктология, 2013. № 2. С. 31–34. [Kokhniuk V.T. Rectal cancer in the Republic of Belarus: prevalence, diagnosis and treatment outcomes. *Onkologicheskaya koloproktologiya = Colorectal Oncology*, 2013, no. 2, pp. 31–34. (In Russ.)]
6. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли // Цитология, 2009. Т. 51, № 6. С. 467–474. [Maltseva V.N., Safronova V.G. Ambiguity role of neutrophils in oncogenesis. *Tsitologiya = Cytology*, 2009, Vol. 51, no. 6, pp. 467–474. (In Russ.)]
7. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евглевский А.А. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты // Иммунология, 2012. № 5. С. 281–285. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Yevglevsky A.A. The dual role of neutrophils in the antitumor protection. *Immunologiya = Immunology*, no. 5, pp. 281–285. (In Russ.)]
8. Райков Н.С., Чупин Р.Н., Попов И.Н., Сбродов О.В., Дорогина Л.В., Роговских А.Н. Рак прямой кишки // Тюменский медицинский журнал, 2010. № 3–4. С. 75–77. [Raykov N.S., Chupin R.N., Popov I.N.,

Sbrodov O.V., Dorogina L.V., Rogovskikh A.N. Rectal cancer. *Tyumenskiy meditsinskiy zhurnal = Tyumen Medical Journal*, 2010, no. 3-4, pp. 75-77. (In Russ.)]

9. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Агилова Ю.Н. Роль неспецифического иммунитета при прогрессировании миеломной болезни // Современные проблемы науки и образования, 2014. № 2. С. 515. [Smirnova O.V., Manchuk V.T., Agilova Yu.N. Role nonspecific immunity in the progression of myeloma diseases. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2014, no. 2, p. 515. (In Russ.)]

10. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S. Polarization of tumor-associated neutrophil (TAN) phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 2009, Vol. 16, no. 3. pp. 183-194.

11. Galdiero M.R., Garlanda C., Jaillon S., Montovani A. Tumor associated macrophages neutrophils in tumor progression. *J. Cell. Physiol.*, 2013, Vol. 228, no. 7. pp. 1404-1412.

12. Mishalian I., Bayuh R., Levy L., Zolotarov L., Michaeli J., Fridlender Z.G. Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013, Vol. 62, no. 11, pp. 1745-1756.

13. Prestwich R.J., Errington F., Hatfield P., Roodman D.G. The immune system – is it relevant to cancer development, progression and treatment? *Clin. Oncol.*, 2008, Vol. 20, pp. 101-112.

14. Schins R.P.F., Borm P.J.A., van Schooten F.J. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis*, 2006, Vol. 21, pp. 225-236.

Авторы:

Смирнова О.В. — д.м.н., заведующая лабораторией клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Каспаров Э.В. — д.м.н., профессор, директор Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера, заместитель директора ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Переpečай Я.И. — аспирант, младший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», г. Красноярск, Россия

Несытых А.А. — заведующий отделением онкоколонпроктологической хирургии, врач-онколог КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского», г. Красноярск, Россия

Беляев В.С. — врач-онколог КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского», г. Красноярск, Россия

Authors:

Smirnova O.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kasparov E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Medical Problems of the North, Deputy Director, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Perepechay Ya.I., Postgraduate Student, Junior Research Associate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Nesytykh A.A., Head, Department of Oncoproctological Surgery, Clinical Oncologist, Krasnoyarsk Regional A. Kryzhanovsky Clinical Cancer Center, Krasnoyarsk, Russian Federation

Belyaev V.S., Clinical Oncologist, Krasnoyarsk Regional A. Kryzhanovsky Clinical Cancer Center, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 24.11.2017

Принята к печати 28.11.2017

Received 24.11.2017

Accepted 28.11.2017

МАРКЕРЫ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ АЛЮМИНИЯ

Старкова К.Г., Долгих О.В., Отавина Е.А., Безрученко Н.В.,
Гусельников М.А., Мазунина А.А.

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Резюме. Исследование особенностей адаптации организма в условиях техногенного изменения среды обитания, особенно у детского населения, позволит сформировать комплекс маркерных диагностических критериев для оценки состояния здоровья и раннего выявления патологических тенденций формирования повышенной чувствительности к факторам внешнесредового окружения и повысить эффективность лечебно-профилактических мероприятий. Металлы способны изменять функциональную активность иммунной системы, оказывая, в зависимости от свойств металла, концентрации, источника и продолжительности воздействия, как иммуностимулирующее, так и супрессивное влияние на иммунную реактивность. Цель работы — исследование особенностей изменения маркеров гиперчувствительности у детей, проживающих в условиях внешнесредового воздействия алюминия. Проведено обследование детского населения школьного возраста от 7 до 11 лет (средний возраст $8,82 \pm 0,11$ лет), постоянно проживающего на территории активного промышленного воздействия, связанного с загрязнением среды обитания соединениями алюминия. Группу сравнения составили дети из «условно чистого» района с допустимыми показателями качества среды обитания. Оценивали особенности формирования сенсibilизации к алюминию с вовлечением как реактинового, так и альтернативного медиаторного (лейкотриены и простагландины) механизма, а также участие цитокинов в развитии повышенной чувствительности к металлу в эксперименте *ex vivo*. Показано, что повышенный уровень металла в крови детей группы наблюдения, в среднем в 1,43 раза от показателей группы сравнения (группа наблюдения $0,020 \pm 0,005$ мкг/мл, группа сравнения $0,014 \pm 0,003$ мкг/мл), сопровождается увеличением содержания IgE-антител в 2,13 раза относительно референтных значений ($213,55 \pm 88,10$ МЕ/мл при норме $< 100,0$ МЕ/мл), специфических IgG-антител к алюминию — в 1,55 раза относительно группы сравнения (группа наблюдения $0,157 \pm 0,054$ у. е., группа сравнения $0,101 \pm 0,041$ у. е.), а также повышением спонтанной продукции лейкотриенов C4/D4/E4 в 2,09 раза (группа наблюдения $80,60 \pm 19,44$ пг/мл; группа сравнения $38,51 \pm 2,40$ пг/мл), которая возрастала при экспериментальной стимуляции алюминием в 1,67 раза, при этом уровень простагландина F2 α у детей группы наблюдения был повышен в 1,9 раза (группа наблюдения $892,62 \pm 97,20$ пг/мл; группа сравнения $457,11 \pm 132,99$ пг/мл) ($p < 0,05$). В условиях экспериментального воздействия металла

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:

К.Г. Старкова, О.В. Долгих, Е.А. Отавина, Н.В. Безрученко, М.А. Гусельников, А.А. Мазунина «Маркеры гиперчувствительности у детского населения в условиях воздействия алюминия» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 165–170. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-165-170
© Старкова К.Г. и соавт., 2019

For citation:

K.G. Starkova, O.V. Dolgikh, E.A. Otavina, N.V. Bezruchenko, M.A. Guselnikov, A.A. Mazunina “Hypersensitivity markers in children under environmental aluminum exposure”, Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 165–170. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-165-170
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-165-170

ex vivo отмечены преимущественно угнетающие эффекты алюминия на продукцию цитокинов IL-4 в 2,13 раза по сравнению с контрольными значениями (группа наблюдения $0,64 \pm 0,23$ пг/мл; группа сравнения $1,36 \pm 0,09$ пг/мл), IL-17 – в 1,90 раза (группа наблюдения $1,08 \pm 0,27$ пг/мл; группа сравнения $2,05 \pm 0,37$ пг/мл) ($p < 0,05$). Исследованные показатели могут применяться в качестве маркеров повышенной чувствительности к алюминию и использоваться для мониторинга здоровья населения и прогнозирования.

Ключевые слова: маркеры гиперчувствительности, специфические антитела, лейкотриены, простагландины, цитокины, алюминий

HYPERSENSITIVITY MARKERS IN CHILDREN UNDER ENVIRONMENTAL ALUMINUM EXPOSURE

Starkova K.G., Dolgikh O.V., Otavina E.A., Bezruchenko N.V.,
Guselnikov M.A., Mazunina A.A.

Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Abstract. The studies in the organism adaptation for the conditions of technogenic environmental changes, especially in child population, will allow to design a set of diagnostic markers for assessing the health status and early detection of pathological trends for development of hypersensitivity to environmental substances and improve efficiency of therapeutic and preventive measures. Metals are capable to alter functional activity of immune system by producing both immunostimulating and suppressive effects on immune reactivity, dependent on the properties of the given metal, its environmental concentration, source and duration of exposure. The aim of the present study was to investigate the features of hypersensitivity markers in children under the conditions of external exposure to aluminum. We have conducted a survey of the schoolchildren aged from 7 to 11 y.o. (a mean of 8.82 ± 0.11 years), permanently inhabiting the territory of active industrial exposure associated with environmental contamination with aluminum compounds. The comparison group consisted of children from a “conventionally clean” area, with acceptable parameters of environmental quality. Specific features of sensitization developing to aluminum were evaluated, including both reactive and alternative mediator mechanisms (leukotrienes and prostaglandins), as well as participation of the cytokines in evolving sensitivity to the metal in the *ex vivo* experiments. We have shown a 1.43-fold increased level of metal in peripheral blood of the observation group, than in comparison group (respectively, observation group, 0.020 ± 0.005 $\mu\text{g/ml}$; comparison group 0.014 ± 0.003 $\mu\text{g/ml}$). Enhanced levels of IgE antibodies were found to be 2.13-fold higher compared to the reference values (213.55 ± 88.10 IU/ml against normal rates of < 100.0 IU/ml) accompanied by increased specific IgG antibodies to aluminum (1.55-fold relative to the controls, i.e., 0.157 ± 0.054 cu in observation group versus 0.101 ± 0.041 cu for the comparison group), as well as a 2.09-fold increased spontaneous production of leukotrienes C4/D4/E4 (80.60 ± 19.44 pg/ml for observation group; 38.51 ± 2.40 pg/ml in the comparison group), which was 1.67-fold enhanced by experimental aluminum stimulation. Prostaglandin F2 α levels among the children from observation group were increased 1.9-fold (observation group, 892.62 ± 97.20 pg/ml; comparison group, 457.11 ± 132.99 pg/ml, $p < 0.05$). Under the *ex vivo* experimental conditions, we observed mostly suppressive effects of aluminum upon the cytokine production. E.g., IL-4 production was inhibited by 2.13-fold, as compared with control values (observation group, 0.64 ± 0.23 pg/ml; comparison group, 1.36 ± 0.09 pg/ml); the suppression for IL-17 was 1.90 times (observation group, 1.08 ± 0.27 pg/ml; comparison group, 2.05 ± 0.37 pg/ml, $p < 0.05$). The parameters studied may be used as aluminum hypersensitivity markers and used for monitoring and predictions in public health care.

Keywords: hypersensitivity markers, specific antibodies, leukotrienes, prostaglandins, cytokines, aluminum

Введение

Особенности активации иммунных механизмов, ввиду высокой чувствительности иммунорегуляторных показателей, могут служить индикаторными диагностическими маркерами

состояния здоровья в условиях адаптации организма к техногенно измененной среде обитания [2, 3, 4]. Исследование патогенетических тенденций нарушения иммунной реактивности, ассоциированных с воздействием факторов внешнесредового окружения, прежде всего у дет-

ского населения, позволит обеспечить раннее выявление формирования повышенной чувствительности к компонентам химической нагрузки и повысить эффективность лечебно-профилактических мероприятий.

Металлы, поступающие в среду обитания из промышленных источников, способны воздействовать на систему иммунной регуляции, инициируя как угнетение, так и активацию функциональной активности [1, 5]. Так, негативные проявления экспозиции металлами могут реализовываться в развитии воспалительных, аутоиммунных или аллергических заболеваний. Алюминий также относится к элементам с иммуноотоксичным действием и способен индуцировать аллергические реакции, влияя на клетки иммунной системы, а также на связанные с ними клетки и растворимые медиаторы [8].

Цель работы — исследование особенностей изменения маркеров гиперчувствительности у детей, проживающих в условиях внешнесредового воздействия алюминия. Предполагалось изучить участие реактинового и лейкотриенового механизмов, а также простагландинов в развитии повышенной чувствительности при экспозиции алюминием, исследовать в условиях эксперимента особенности цитокинового компонента иммунной регуляции.

Материалы и методы

Проведено обследование 46 детей в возрасте от 7 до 11 лет (средний возраст $8,82 \pm 0,107$ лет, 41% мальчиков и 59% девочек), постоянно проживающих в г. Братске Иркутской области, в зоне влияния ОАО «Русал Братский алюминиевый завод», предприятия по производству первичного алюминия, глинозема, фтористых солей, деятельность которого сопровождается значительным загрязнением среды обитания. При этом группу сравнения составили 24 ребенка из «условно чистого» района, пос. Листвянка Иркутской области (средний возраст $8,19 \pm 0,111$ лет, 43% мальчиков и 57% девочек). Группы были сопоставимы по полу, возрасту и соматической заболеваемости.

Содержание металлов в биосредах выявляли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой в соответствии с МУК 4.1.3230-14 на масс-спектрометре Agilent 7500_{cx} (Agilent Technologies Inc., США). Уровни IgE общего, простагландинов E2 и F2 α исследовали с помощью иммуноферментного анализа на анализаторе ELx808IU (BioTek, США), лейкотриены C4/D4/E4 определяли на основе CAST ELISA (Cellular antigen stimulation test ELISA, Bühlmann

Laboratories AG, Швейцария), специфические антитела к алюминию — методом аллергосорбентного тестирования с ферментной меткой.

Для оценки влияния алюминия на иммунную регуляцию в эксперименте *ex vivo* определяли продукцию цитокинов интерлейкина IL-4, IL-17, интерферона IFN γ в супернатантах клеток цельной крови, используя тест-системы для иммуноферментного анализа АО «Вектор-Бест» (Россия). Для исследования получали образцы периферической крови детей, далее клетки цельной крови культивировали с помощью наборов химических реактивов «Цитокин-стимул» (АО «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкцией к набору. Воздействие металла на уровень продукции цитокинов клетками крови исследовали при инкубации проб с раствором алюминия в конечной концентрации 0,01 мг/мл, подобранной экспериментальным путем. Раствор алюминия готовили из «Государственного стандартного образца состава раствора ионов алюминия (III)» ГСО 7927-2001 (ООО «Экохим», Россия).

Статистический анализ полученных данных проводили методом вариационной статистики в пакете прикладных программ Statistica 6.0 (Statsoft, США), рассчитывая среднее арифметическое и его стандартную ошибку ($M \pm m$), по количественным признакам группы сравнивали с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты химико-аналитического исследования биосред детей группы наблюдения показали присутствие алюминия в крови обследованных на уровне, в 1,43 раза превосходящем показатели группы сравнения, при этом доля проб с повышенным содержанием металла составила 24,4% (группа наблюдения $0,020 \pm 0,005$ мкг/мл, группа сравнения $0,014 \pm 0,003$ мкг/мл, $p < 0,05$).

Одновременно у 50,0% обследованных детей отмечено достоверное возрастание общей сенсibilизации по сравнению с возрастной нормой по критерию содержания IgE общего ($213,55 \pm 88,098$ МЕ/мл при норме $< 100,0$ МЕ/мл, $p < 0,05$). Специфическую сенсibilизацию к алюминию оценивали по концентрации специфических антител IgG к алюминию, которая была повышена относительно референтного диапазона в 50,0% случаев ($p < 0,05$) и превосходила уровни в группе сравнения в 1,55 раза (группа наблюдения $0,157 \pm 0,054$ у. е., группа сравнения $0,101 \pm 0,041$ у. е., референтный диапазон

ТАБЛИЦА 1. СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ АЛЮМИНИЕМ ПРОДУКЦИЯ ЛЕЙКОТРИЕНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ EX VIVO (n = 8)

TABLE 1. SPONTANEOUS AND INDUCED BY ALUMINUM PRODUCTION OF LEUKOTRIENES IN THE EX VIVO EXPERIMENT (n = 8)

Показатель Index	Группа наблюдения Observation group	Группа сравнения Comparison group
Спонтанная продукция лейкотриенов C4/D4/E4, пг/мл Spontaneous production of leukotrienes C4/D4/E4, pg/ml	80,60±19,44*	38,510±2,382
Индукцированная алюминием продукция лейкотриенов C4/D4/E4, пг/мл Induced by aluminum production of leukotrienes C4/D4/E4, pg/ml	134,770±29,731*	334,540±26,537

Примечание. * – разница достоверна относительно группы сравнения ($p < 0,05$).

Note. *, the difference is reliable relative to the comparison group ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 2. СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ АЛЮМИНИЕМ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ EX VIVO (n = 8)

TABLE 2. SPONTANEOUS AND INDUCED BY ALUMINUM PRODUCTION OF CYTOKINES IN THE EX VIVO EXPERIMENT (n = 8)

Показатель продукции цитокинов Index of cytokine production		Группа наблюдения Observation group	Группа сравнения Comparison group
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	Спонтанная Spontaneous	1,090±0,246	1,340±0,055
	Индукцированная алюминием Induced by aluminum	0,640±0,230*	1,360±0,085
IL-17, пг/мл IL-17, pg/ml	Спонтанная Spontaneous	2,200±0,404	1,640±0,623
	Индукцированная алюминием Induced by aluminum	1,080±0,265*	2,050±0,367
IFNγ, пг/мл IFN γ , pg/ml	Спонтанная Spontaneous	4,650±0,552	4,200±0,942
	Индукцированная алюминием Induced by aluminum	3,800±0,562	2,960±0,913

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

0–0,1 у.е.), различия достоверны по кратностям превышения нормы.

В то же время отмечено повышение уровня спонтанного синтеза неспецифических медиаторов лейкотриенов C4/D4/E4 у детей группы наблюдения в 2,09 раза (табл. 1), при этом превышения референтного значения (< 150 пг/мл) не наблюдалось в обеих группах. Экспериментальное воздействие при антигенной стимуляции клеток алюминием (0,01 мг/мл) приводило к активации высвобождения *de novo* лейкотриенов в группе наблюдения в 1,67 раза, причем данный эффект был значительно более выражен в группе сравнения – в 8,69 раза соответственно ($p < 0,05$).

Уровни провоспалительного медиатора простагландина E2 достоверно не отличались в обеих группах (группа наблюдения $363,85 \pm 85,759$ пг/мл; группа сравнения $462,34 \pm 202,532$ пг/мл), однако показано значительное повышение содержания простагландина F2 α , в среднем в 1,9 раза (группа наблюдения $892,62 \pm 97,222$ пг/мл; группа сравнения $457,11 \pm 132,99$ пг/мл, $p < 0,05$).

Одновременно в эксперименте *ex vivo* проведено исследование продукции межклеточных иммунных медиаторов цитокинов, которое показало преимущественно угнетающие эффекты экспозиции металлом в группе наблюдения в ус-

ловиях предварительной сенсibilизации. Так, при отсутствии достоверных межгрупповых различий изменения уровня IFN γ (табл. 2) наблюдалось достоверное снижение индуцированного алюминием синтеза IL-4 в 2,13 раза относительно группы сравнения ($p < 0,05$). В то же время продукция IL-17 в присутствии металла была снижена в 1,90 раза ($p < 0,05$).

Таким образом, выполненное исследование особенностей иммунной регуляции у детского населения в условиях промышленного загрязнения алюминием выявило:

- 1) повышенную чувствительность организма по маркерам общей и специфической сенсibilизации (IgE общий, IgG к алюминию);
- 2) возрастание продукции регуляторных медиаторов простагландина F2 α и лейкотриенов C4/D4/E4;
- 3) снижение уровня цитокинпродуцирующей активности (IL-4, IL-17).

Полученные данные указывают на значительные изменения иммунного медиаторного механизма регуляции в условиях экспозиции алюминием, что соответствует существующим представлениям о способности алюминия индуцировать патологическую реактивность иммунной системы, а также оказывать иммуносупрессивное воздействие на функциональное состояние иммунокомпетентных клеток [6, 7]. При этом развитие гиперчувствительности у обследованной группы, связанное с возрастанием уровня специфических антител к алюминию, реализуется также путем активации альтернативного неспецифического лейкотриенового механизма, в то время как в отношении цитокинов проявляются преимущественно ингибирующие эффекты. Исследованные показатели могут использоваться в качестве маркеров нарушений иммунного ответа для оценки влияния алюминия на здоровье и прогнозирования развития заболеваний.

Список литературы / References

1. Долгих О.В., Кривцов А.В., Бубнова О.А., Отавина Е.А., Безрученко Н.В., Колегова А.А., Мазунина А.А., Гусельников М.А. Анализ показателей иммунного статуса у детей в условиях аэрогенной экспозиции металлами // Гигиена и санитария, 2017. Т. 96, № 1. С. 26-29. [Dolgih O.V., Krivtsov A.V., Bubnova O.A., Otavina E.A., Bezruchenko N.V., Kolegova A.A., Mazunina A.A., Guselnikov M.A. Analysis of indicators of immune status in children in conditions of aerogenic exposition with metals. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2017, Vol. 96, no. 1, pp. 26-29. (In Russ.)]
2. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Особенности иммунологических и генетических нарушений человека в условиях дестабилизации среды обитания. Пермь: Издательство Пермского национального исследовательского политехнического университета, 2016. 300 с. [Zaytseva N.V., Dolgikh O.V., Dianova D.G. Immunological and genetic features of human disorders in conditions of environmental destabilization]. Perm: Publishing House of Perm National Research Polytechnic University, 2016. 300 p.
3. 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.
4. MacGillivray D.M., Kollmann T.R. The role of environmental factors in modulating immune responses in early life. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 434.
5. 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.
6. Zhu Y., Xu J., Sun H., Hu C., Zhao H., Shao B., Bah A.A., Li Y. Effects of aluminum exposure on the allergic responses and humoral immune function in rats. *Biomaterials*, 2011, Vol. 24, pp. 973-977.
7. She Y., Wang N., Chen C., Zhu Y., Xia S., Hu C., Li Y. Effects of aluminum on immune functions of cultured splenic T and B lymphocytes in rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2012, Vol. 147, pp. 246-250.
8. Zhu Y., Li Y., Miao L., Wang Y., Liu Y., Yan X., Cui X., Li H. Immunotoxicity of aluminum. *Chemosphere*, 2014, Vol. 104, pp. 1-6.

Авторы:

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

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

Authors:

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

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

Отавина Е.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Безрученко Н.В. — лаборант-исследователь лаборатории иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Гусельников М.А. — аспирант 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

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

Bezruchenko N.V., Laboratory Research Assistant, Laboratory of Immunology and Allergology, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Guselnikov M.A., Postgraduate Student, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Mazunina A.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunogenetics, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Поступила 19.12.2017

Отправлена на доработку 21.12.2017

Принята к печати 26.12.2017

Received 19.12.2017

Revision received 21.12.2017

Accepted 26.12.2017

ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ АУТОИММУНОЛОГИИ В МИРЕ (ПО МАТЕРИАЛАМ 11-ГО МЕЖДУНАРОДНОГО КОНГРЕССА В ЛИССАБОНЕ 16-20 МАЯ 2018 ГОДА).

СООБЩЕНИЕ I: ПЕРВАЯ АКАДЕМИЯ АУТОИММУНИТЕТА

**Корнева Е.А.^{1,2}, Петяева А.В.¹, Федоткина Т.В.^{1,3}, Чурилов Л.П.^{1,4},
Шенфельд И.^{1,5,6,7}**

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

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

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии»,
Санкт-Петербург, Россия

⁵ Центр аутоиммунных заболеваний П. Заблудовича, Тель-Хашомер, Рамат-Ган, Израиль

⁶ Медицинский центр имени Х. Шеба, Тель-Хашомер, Рамат-Ган, Израиль

⁷ Университет Тель-Авива, Тель-Авив, Израиль

Резюме. Обзорная статья написана по материалам 11-го международного конгресса по аутоиммунитету и Первой академии аутоиммунитета, прошедших с 14 по 20 мая 2018 г. в Лиссабоне. В первой части рассматриваются и обсуждаются формирование, основные проблемы и перспективы развития аутоиммунологии как интегральной отрасли фундаментальной и клинической медицины, занятой изучением, диагностикой, лечением и профилактикой аутоиммунных болезней различных органов и систем. Этих форм патологии насчитывают до 90. Дана сводка всех проведенных в рамках Академии аутоиммунитета лекций, включая обсуждение затронутых в ходе Академии новейших и дискуссионных аспектов развития современного учения об иммунной системе, аутоиммунитете и аутоиммунной патологии. Представлены сведения о проблемах современной иммунологии, связанных с использованием больших баз клиничко-лабораторных данных и с экстраполяцией на человека данных экспериментов на животных. Освещены новейшие представления о врожденном иммунитете, включая популяции врожденных лимфоидных клеток, о роли различных групп рецепторов системы врожденного иммунитета, об участии механизмов врожденного иммунитета в возникновении аутоиммунной патологии. Представлены современные концепции презентации антигенов, включая классификацию дендритных клеток, альтернативные пути активации макрофагов, костимуляторные и тормозные взаимодействия лигандов и рецепторов лимфоцитов и антигенпредставляющих клеток. Освещены новейшие представления о субпопуляциях Т-лимфоцитов и их роли, включая функции T_{fh}-клеток и взаимоотношения этих субпопуляций при различных иммунных ответах. Обсуждается влияние микробиоты на субпопуляции Т-клеток. Сформулированы основные закономерности явления имму-

Адрес для переписки:

Чурилов Леонид Павлович
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
университет»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Университетская наб., 7-9, пом. 1043.
Тел.: 8 (812) 326-03-26 (доб. 5215).
E-mail: elpach@mail.ru

Address for correspondence:

Churilov Leonid P.
St. Petersburg State University
199034, Russian Federation, St. Petersburg,
Universitetskaya emb., 7-9, room 1043.
Phone: 7 (812) 326-03-26 (add. 5215).
E-mail: elpach@mail.ru

Образец цитирования:

Е.А. Корнева, А.В. Петяева, Т.В. Федоткина,
Л.П. Чурилов, И. Шенфельд «Итоги и перспективы
развития аутоиммунологии в мире (по материалам 11-го
Международного конгресса в Лиссабоне 16-20 мая 2018
года). Сообщение I: Первая Академия аутоиммунитета»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 171–188.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-171-188

© Корнева Е.А. и соавт., 2019

For citation:

E.A. Korneva, A.V. Petyaeva, T.V. Fedotkina, L.P. Churilov,
Y. Shoenfeld "Synopsis and prospects of autoimmunology
development worldwide (after the materials of the 11th International
Congress in Lisbon, May 16-20, 2018). Proceeding I: First
Academy of Autoimmunity", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 171–188.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-171-188

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-171-188

нологической памяти. Освещены вопросы антителообразования и функций В-лимфоцитов с учетом недавно открытых механизмов внутриклеточного проникновения иммуноглобулинов и аффинного созревания лимфоидных клонов. Описаны связанные с воздействиями на В- и Т-лимфоциты новые терапевтические подходы в лечении аутоиммунных болезней. Освещены механизмы центральной и периферической аутоотолерантности с учетом данных о функции AIRE-гена и Т-регуляторов. Рассматривается роль Т-регуляторов при плацентогенезе. По-новому трактуется роль интерлейкина-2 и его рекомбинантных аналогов в иммунных взаимодействиях, с учетом не только их иммуностимулирующего, но и, в определенных условиях, — иммуносупрессорного потенциала. Уделено значительное внимание тормозным рецепторам Т-лимфоцитов и иммунобиотерапевтическим воздействиям на них. Кратко обсуждены история и современное состояние онкоиммунологии и применение ингибиторов тормозных рецепторов Т-лимфоцитов в онкологии, включая побочные эффекты такого лечения. Даны сведения о прошедшей 21-23 сентября 2018 г. Второй Академии аутоиммунитета в Санкт-Петербурге.

Ключевые слова: аутоиммунитет, презентация антигенов, врожденный иммунитет, субпопуляции лимфоцитов, активация макрофагов, интерлейкины, Т-регуляторы, аутоотолерантность, противоопухолевый иммунитет, тормозные рецепторы лимфоцитов, микробиота

SYNOPSIS AND PROSPECTS OF AUTOIMMUNOLOGY DEVELOPMENT WORLDWIDE (AFTER THE MATERIALS OF THE 11TH INTERNATIONAL CONGRESS IN LISBON, MAY 16-20, 2018). PROCEEDING I: FIRST ACADEMY OF AUTOIMMUNITY

**Korneva E.A.^{a, b}, Petyaeva A.V.^a, Fedotkina T.V.^{a, c}, Churilov L.P.^{a, d},
Shoenfeld Y.^{a, e, f, g}**

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

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

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

^d St. Petersburg Research Institute of Phthysiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

^e Zabudowicz Center for Autoimmune Diseases, Ramat Gan, Israel

^f Sheba Medical Center, Tel HaShomer, Ramat Gan, Israel

^g Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel

Abstract. A review article is an aftermath of the 11th International Congress on Autoimmunity and First Academy of Autoimmunity, happened 14th to 20th May, 2018 in Lisbon. The first part of paper discusses the formation, main problems and prospects for the development of Autoimmunology as a new integral branch of fundamental and clinical Medicine engaged in the research, diagnosis, treatment and prevention of autoimmune diseases of various organs and systems, totally circa 90 of them. A summary of all lectures conducted during the Academy of Autoimmunity is given, including a discussion of the newest and controversial aspects of the development of the modern concepts of the immune system, autoimmunity and autoimmune pathology. Article reviews data on the current problems of Immunology associated with the use of large databases of clinical and laboratory findings and extrapolation of animal experimentation data to humans. The newest ideas about congenital immunity, including the populations of innate lymphoid cells, on the role of various groups of receptors of the innate immunity system, on the participation of the mechanisms of innate immunity in pathogenesis of autoimmune disorders are highlighted. Modern concepts of antigen presentation are offered, including classification of dendritic cells, alternative pathways of macrophage activation, as well as on co-stimulatory and inhibitory interactions of ligands and receptors of lymphocytes and antigen-presenting cells. The latest data about the subpopulations of T lymphocytes and their role, including the functions of Tfh cells and the relationships of these subpopulations with various immune responses are highlighted. Influence of microbiota on T cell subpopulations is discussed. The main regularities of the phenomenon of immunological memory are formulated. The questions of antibody production and B lymphocyte functions are considered taking into account recently discovered mechanisms of intracellular penetration of immunoglobulins and details of affinity maturation of lymphoid clones. The new therapeutic approaches in the treatment of

autoimmune diseases associated with influences on B and T lymphocytes are described. Mechanisms of central and peripheral autotolerance have been highlighted, taking into account data on the function of the AIRE-gene and T regulators. The role of T regulators in placentation is considered. The role of interleukin-2 and its recombinant analogues in immune interactions is interpreted in a new way, taking into account not only their immunostimulating, but, under certain conditions, immunosuppressive potential also. Considerable attention has been paid to the inhibitory receptors of T lymphocytes and to immuno-biotherapeutic effects on them. The history and current status of Oncoimmunology and the use of blockers of inhibitory T lymphocyte receptors in Oncology, including the side effects of treatment with check-point inhibitors, are briefly discussed. Information was given on the held on 21-23 September 2018 2nd Academy of Autoimmunity in St. Petersburg

Keywords: autoimmunity, antigen presentation, innate immunity, lymphocyte subpopulations, macrophage activation, interleukins, microbiota, T regulators, autotolerance, antitumor immunity, inhibitory receptors of lymphocytes

Работа поддержана грантом Правительства РФ (договор № 14.W03.31.0009 от 13.02.2017 г.) о выделении гранта для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых.

В сфере изучения и лечения аутоиммунных болезней на наших глазах происходят интегративные процессы, ведущие к формированию новой отрасли медицины — аутоиммунологии. Развитие аутоиммунитета и аутоиммунных заболеваний, как полагают, зависит от взаимодействий генов, нейроэндокринных биорегуляторов и окружающей среды [1], что еще в 1989 г. было обозначено И. Шенфельдом и Д.А. Айзенбергом как «мозаика аутоиммунитета». Это сложное взаимодействие иммунной системы и различных внешних факторов, составляющих кусочки своего рода мозаичной «смальты», контролируется обширным набором механизмов, как генетически детерминированных, так и эпигенетических [6]. Частота аутоиммунной патологии повсеместно растет, ее спектр расширяется: описываются все новые аутоиммунные недуги, причем они затрагивают сферы приложения всех медицинских специальностей. Новое столетие ознаменовалось необычайными прорывами в понимании механизмов аутоиммунитета, что позволило в известной степени предсказывать и предупреждать развитие этих заболеваний [3, 5, 6]. Взаимодействие внешних факторов, таких как инфекционные агенты, вакцины, адъюванты [49], продукты питания [41] и лекарства, с эндогенными факторами: гормонами, в частности витамином D, ферритином [24], лептином, кортикоидами, половыми стероидами [44] и пролактином [42], а также с различными цитокинами, могут обуславливать аутоиммунное воспаление. Интенсивное изучение [6, 7, 8, 9, 10, 11] этих механизмов привело к разработке новых профилактических рекомендаций, позволяющих улучшить течение аутоиммунных процессов, избежать их или отложить их развитие. Среди таких мер сообщалось о надлежащей диете, избегании определенных гормональных воздействий (например, пероральных противоза-

чаточных средств), а также об ультрафиолетовом облучении, климатотерапии и приеме витамина D [12, 13, 14, 15, 16, 17, 23, 30].

Диагностика аутоиммунных и вызванных аутореактивным воспалением заболеваний всегда была непростой задачей. Центральное место в точной и ранней диагностике системных заболеваний заняли обнаружение аутоантител, таких как ревматоидные факторы, антинуклеарные и направленные против цитруллин-содержащих пептидов аутоантитела, а также недавно обнаруженные, например, антипентраксиновые аутоантитела в сочетании с разнообразными генетическими маркерами [18, 19, 20, 21]. Интригующий аспект состоит в том, что применительно к этиологии, патогенезу, профилактике и лечению сходство между аутоиммунными заболеваниями перевешивает их различия. Таким образом, многие из этих новых способов адресной терапии, как оказалось, помогают не при одном, а при нескольких аутоиммунных нарушениях. Все это создает основу для формирования новой отрасли медицины — аутоиммунологии. Интерес к вопросам аутоиммунитета традиционен для российской медицинской науки со времен основоположника иммунологии приват-доцента Императорского Санкт-Петербургского университета И.И. Мечникова. Он и его школа заложили представления о физиологической роли умеренного аутоиммунитета как регулятора онтогенеза организма и получили первые модели ряда аутоиммунных заболеваний на животных [5]. В дальнейшем в России были достигнуты значительные успехи в экспериментальном изучении роли антител как биорегуляторов (теория иммунологической регуляции клеточных функций и теория иммунологического клиренса) [2, 3], получены первые доказательства проникновения антител в живые клетки и их ядра, впервые в мире созданы представления о нейроиммунных взаимодействиях, но, к сожалению, в отечественной практической медицине долгое время аутоиммунитету уделяли пристальное внимание лишь ревматологи. В то же время на Западе в результате работ другого основоположника иммунологии, Пауля Эрлиха,

считавшего аутоиммунитет исключительно патологическим явлением [26, 27], всегда уделялось огромное внимание вопросам аутоиммунной патологии и ее лабораторной диагностике. В результате к настоящему периоду описаны уже около 90 аутоиммунных заболеваний, поражающих у человека практически любые системы и органы и актуальных для врачей самых разных специальностей, причем все новые формы патологии, до этого не связывавшиеся с аутоиммунитетом, подпадают под веские подозрения об участии аутоиммунитета в их патогенезе.

Аутоиммунология оформилась как область медицины, более широкая по своему спектру и задачам по сравнению с ревматологией, из которой она в прикладном аспекте «выросла». Важной вехой в развитии аутоиммунологии и в налаживании сотрудничества российских и зарубежных ученых и врачей в этой области стал проходивший во Дворце конгрессов португальской столицы Лиссабона с 16 по 20 мая 11-й Международный конгресс по аутоиммунитету. На нем под председательством И. Шенфельда собрались около 2200 участников со всех концов планеты: ученые, врачи, преподаватели и обучающиеся. 1178 устных и стендовых сообщений было отобрано

оргкомитетом для публикации. Приняла в конгрессе участие и делегация из Санкт-Петербурга, включавшая около 40 членов, главным образом сотрудников Лаборатории мозаики аутоиммунитета СПбГУ, а также специалистов из лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, из СЗГМУ им. И.И. Мечникова и СПбГПМУ. Работам петербургских ученых была посвящена специальная сессия конгресса (рис. 1). Конгрессу предшествовало уникальное научно-образовательное событие — Первая Академия аутоиммунитета, то есть курс общей и трансляционной иммунологии для аутоиммунологов, основанный на новейшем, только что вышедшем из печати девятом издании руководства под редакцией выдающегося патолога, профессора Калифорнийского университета (США) Абула К. Аббаса «Молекулярная и клеточная иммунология» [11] и пятом издании учебника «Основы иммунологии» тех же авторов [10]. Курс состоял из семи блистательных базовых лекций А.К. Аббаса по трансляционной иммунологии и пяти лекций ученых из Италии, Германии, Великобритании и США по избранным частным вопросам аутоиммунной патологии и занял 2 дня (14-15 мая 2018 г.), в течение кото-



Рисунок 1. Российские участники 11-го Международного конгресса по аутоиммунитету с президентом конгресса И. Шенфельдом (в центре на трибуне) и другими видными зарубежными учеными

Figure 1. Russian participants of the 11th International Congress on Autoimmunity with the president of Congress Y. Shoenfeld (stands in the centre behind the rostrum) and with other renowned foreign scholars

рых к нему было приковано пристальное внимание как научной молодежи, так и маститых специалистов.

В данном сообщении мы приводим краткую сводку некоторых важнейших аспектов этого лекционного курса и его обсуждения. А.К. Аббас осветил не только номенклатуру и принципиальные механизмы иммунологических явлений, но и актуальные факты и концепции применительно к их потенциальному клиническому и лечебному значению. Во вводной лекции он подчеркнул ключевую роль клонального разнообразия иммунных клеток для осуществления функций иммунной системы и широкое участие последней в этиологии и патогенезе болезней других органов и систем. По мнению А.К. Аббаса, взрывной рост объема иммунологических знаний и появление больших баз иммунологических данных, принося огромную пользу клинике, таит вместе с тем и ряд существенных сложностей. Большие базы данных порой трудно поддаются однозначной интерпретации и пока дают мало клинически значимых обобщений. Открытие множества клеточных субпопуляций иммунных клеток и путей передачи сигналов усложнило развитие трансляционной иммунологии. Результаты, получаемые на лабораторных линейных мышах, не могут автоматически переноситься на человека, хотя первые несколько сближаются с людьми по особенностям своей иммунной системы, если сосуществуют с обычными мышами, возможно, в силу изменений микробиоты. Также далеко не идентичны свойства и реактивность клеток в культуре и в организме, что создает проблему интеграции представлений, связанных с разными типами и условиями экспериментов. Возмож-

ность интеграции экспериментальных и клинических исследований во многом определяется успехами клинической иммунологии.

Специальную лекцию А.К. Аббас посвятил врожденному иммунитету и его участию в развитии аутоиммунных заболеваний. Важно отметить, что он уделит особое внимание новому взгляду на происхождение тканевых макрофагов и привел веские свидетельства того, что лишь часть их имеет костномозговое моноцитарное происхождение, и это, прежде всего, макрофаги, эмигрирующие в ткани, в частности кровеносные, при воспалении. Что же касается оседлых макрофагов внутренних органов, например клеток Купфера, микроглии ЦНС, альвеолярных и других резидентных макрофагов, то у них, согласно современным данным, иной источник происхождения — ранние клетки-предшественники из фетальной печени и желточного мешка. В противоположность классическим воззрениям, которые связывали лимфоидные клетки исключительно с адаптивным иммунитетом, в настоящее время лимфоциты считаются важной составной частью и в системе врожденного иммунитета. Речь идет о врожденных лимфоидных клетках (ВЛК), способных вырабатывать многие Т-клеточные цитокины, но лишенных Т-клеточных рецепторов. В связи с последним обстоятельством они отвечают не на антигены, а на аутоагенты, вырабатываемые клетками, в том числе цитокины эпителиоцитов. Три известных в настоящее время субпопуляции этих клеток развиваются под контролем разных цитокинов, при дирижирующей роли трех различных транскрипционных факторов, и, соответственно, играют ключевые роли в разных аспектах функциониро-

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИИ ВРОЖДЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК (ПО А.К. АББАСУ, 2018)

TABLE 1. INNATE LYMPHOID CELLS SUBSETS (A.K. ABBAS, 2018)

Субпопуляция ВЛК/ их свойства Subpopulation of innate lymphoid cells/it's functions	1	2	3
Индуктор дифференцировки Inducer of differentiation	IL-7, IL-15	IL-7 и др. IL-7 and other	IL-7 и др. IL-7 and other
Транскрипционный фактор Transcriptional factor	T-bet	GATA-3	ROR γ t
Управляющие цитокины Controlling cytokines	IL-12, IL-18	IL-25, IL-33, TSLP	IL-1, IL-33
Секретируемые цитокины Defining cytokines	IFN γ	IL-5, IL-13	IL-17, IL-22
Функции Functions	Противовирус- ный иммунитет Antiviral immunity	Индукция гиперергического воспаления Induction of hyperergic inflammation	Органогенез лимфоидных органов и барь- ерная функция кишечника Organogenesis of lymphoid organs and intestinal barrier function

вания системы врожденного иммунитета: ВЛК-1 обеспечивают противовирусную защиту, ВЛК-2 участвуют в развязывании гиперергического воспаления, а ВЛК-3 — в обеспечении барьерной функции слизистой кишечника и в органогенезе лимфоидных органов. Их характеристики приведены в таблице 1.

Существенную роль в целостной системе врожденного иммунитета (палеоиммунитета) играют и гуморальные факторы, причем в настоящее время выделяют не только значение комплемента, но и функции коллектинов (лектиновых активаторов комплемента) и пентраксинов (не-иммуноглобулиновых опсонизирующих молекул типа сывороточного амилоида и С-реактивного белка). Детализируя вопрос о распознающих функциях системы палеоиммунитета, А.К. Аббас подчеркнул, что узнаваемые рецепторами этой системы паттерны нередко не просто свойственны микроорганизмам, а представляют для последних важные агенты облигатной патогенности или выживания, что позволяет системе врожденного иммунитета атаковать даже мутирующие микроорганизмы, ускользающие из-под воздействий на мутировавшие лиганды. Рецепторы системы врожденного иммунитета, хотя они и инварианты и распределены не клонально, имеют множество (возможно, до 100) типов. Последнее позволяет им распознавать до 10^3 разных молекул. В противоположность этому клонально распределенные и широко варьирующие по структуре рецепторы системы адаптивного иммунитета имеют только 2 подтипа — иммуноглобулины и Т-клеточные рецепторы (что обеспечивает, тем не менее, распознавание более миллиарда разных антигенов). А.К. Аббас обратил внимание аудитории на то, что различные группы рецепторов в системе врожденного иммунитета распределены по-разному относительно компартментов клетки, так, чтобы покрыть весь спектр возможных внешних и внутриклеточных сигналов инфекции и/или опасности. TLR распознают бактерии и вирусы, а CLR — грибы, находясь на поверхности клеток; NLR — продукты повреждения клеток и внутриклеточные бактерии, а RLR — вирусы, находясь в цитозоле. TLR в эндосомах распознают нуклеиновые кислоты вирусов. В дополнение к давно сформулированному представлению о том, что активация рецепторов системы палеоиммунитета (TLR и NLR) приводит к развитию типового патологического процесса воспаления [33] и усиливает адаптивные иммунные реакции, А.К. Аббас подчеркнул, что существует альтернативный типовой вариант ответа, опосредованного TLR — индукция противовирусной резистентности без острого воспаления. Если первый типовой ответ реали-

зуется при инициации продукции IL-1, участии транскрипционного фактора NF- κ B и активации инфламмасомы, то второй осуществляется через индукторы интерферонов и сами интерфероны. Это позволяет ставить вопрос о введении в патофизиологию представлений о новом типовом патологическом процессе — противовирусном ответе. Касательно роли инфламмасом в норме и при патологии А.К. Аббас отметил, что этот квази-органويد участвует в устранении поврежденных клеток, причем при его самосборке необходимы каскадные прионоподобные изменения адаптерного белка ASC. При функциональных мутациях белков-компонентов инфламмасом, увеличивающих активность формирования последних, развиваются аутовоспалительные синдромы, сопровождающиеся периодической лихорадкой, идиопатическими сыпями, а в хронической перспективе и амилоидозом. Возможность активации рецепторов системы врожденного иммунитета эндогенными лигандами обуславливает развитие целого класса заболеваний, при которых рецидивирующее или хроническое асептическое воспаление вызвано метаболитами — холестеринем при атеросклерозе [48], кристаллами органических кислот — при подагре и псевдоподагре, липидами — при метаболическом синдроме, аномальными белковыми депозитами — при нейродегенеративных заболеваниях и т.д. Трудно переоценить значение индуцирующей роли факторов системы врожденного иммунитета в индукции активации Т- и В-лимфоцитов при реакциях адаптивного иммунитета. Согласно гипотезе опасности П. Матцингер [28], на сегодня получившей все необходимые подтверждения, активация Т-лимфоцитов при распознавании чужих или опасных (связанных с деструкцией тканей) антигенов и ее отсутствие — при заурядном распознавании собственных или симбионтных антигенов — зависят от того, что в первом случае участие системы врожденного иммунитета обеспечивает индукцию коstimуляторных молекул на лимфоците и продленное существование иммуносинапсов с антигенпредставляющими клетками. Для В-лимфоцитов такую же коstimуляторную роль «второго сигнала» играют факторы активированного в рамках палеоиммунитета комплемента: в любом случае именно адекватный ответ системы палеоиммунитета удерживает не-оиммунитет от развития избыточных аутоиммунных реакций. В то же время, по мнению А.К. Аббаса, врожденный иммунитет — обоюдоострое оружие: некоторые его проявления, например массивная индукция интерферонов, способствующих aberrантной экспрессии антигенов ГКГС II класса, или TLR-7/TLR-9-опосредованный ответ на нуклеиновые кислоты, могут способство-

вать развитию аутоиммунной патологии, в том числе системной красной волчанки, в частности при вирусной провокации.

В лекции, посвященной антигенпредставляющим клеткам, презентации антигенов и активации Т-лимфоцитов, А.К. Аббас остановился на том обстоятельстве, что малочисленность каждого отдельного антиген-специфичного клона наивных лимфоцитов делает невозможной эффективную активацию нужного клона, если антигены не будут транспортироваться к зонам, где различные рециркулирующие клетки могли бы контактировать с ними. В этом логистическая роль антигенпредставляющих клеток, которые в периферических лимфоидных органах локализуются совместно с наивными Т-лимфоцитами при посредстве β -хемокинов и их рецептора CCR7. В этом участвуют как классические $CD11c^+$ дендрциты кожи и слизистых, транспортирующие антигены в региональные лимфоузлы, так и плазматоидные интерферон-продуцирующие дендритные клетки крови, транспортирующие антигены в селезенку. Незрелые предшественники дендритных клеток презентуют в тканях собственные антигены и играют роль в формировании ауто толерантности. Лектор привел современную классификацию дендритных клеток по Т.Л. Мёрфи и соавт., насчитывающую четыре их разновидности и основанную на различиях в управляющих ими транскрипционных факторах [39]. Эти разновидности детерминированы на презентацию внутриклеточных патогенов (их транскрипционный фактор — BATF3), грибов и внеклеточных бактерий (Notch2), вирусов (E2-2) либо паразитов и экзоаллергенов (их транскрипционный фактор KLF4). Все функции Т-клеток опосредованы их взаимодействием с другими клетками (В-лимфоцитами — при синтезе антител, макрофагами — чтобы обеспечить деградацию фагоцитированных последними объектов, инфицированными или чужеродными клетками-мишенями — чтобы их уничтожить). Поэтому Т-клетки не распознают циркулирующие антигены, реагируя своими рецепторами лишь на антигены, экспонируемые молекулами ГКГС на поверхности других клеток. Молекулы ГКГС презентуют только пептиды, а Т-клетки видят только белковые антигены на поверхности других клеток. ГКГС-молекулы — самые полиморфные в биологии. Но это означает, что каждый вариант презентует только некоторые пептиды. Следовательно, подчеркнул А.К. Аббас, каждый человек распознает не одни и те же, а несколько различных пептидов антигенов, даже если они принадлежат белкам одних микроорганизмов или клеток. Вот почему аутоиммунитет, связанный с перекрестными взаимодействия-

ми своих и микробных антигенов — это не стандартное, а индивидуализированное и зависящее от реактивности явление.

Важнейшая роль антигенпредставляющих клеток в развитии иммунологических процессов связана не только с тем, что они захватывают антигены, транспортируют их в зоны контакта с наивными Т-клонами и представляют антигены в той форме, которая доступна для распознавания рецепторами лимфоцитов. Нельзя забывать, что именно антигенпредставляющие элементы обеспечивают «второй сигнал» для экспрессии костимуляторных молекул, без которых не формируются иммуносинапсы и не активируются Т-лимфоциты. А.К. Аббас указал, что костимуляция возможна не только при развитии реакций системы врожденного иммунитета на микробы. Таким же триггером «второго сигнала» могут быть маркеры опасности и дезинтеграции тканей, то есть эндогенные молекулы, образующиеся при гибели клеток, что важно при противоопухолевом и трансплантационном иммунитете.

Различные лиганд-рецепторные взаимодействия молекул антигенпредставляющих и лимфоидных клеток ведут к разным, порой полярным последствиям. Связывание B7 и CD28 инициирует активацию Т-клеток при иммунном ответе, а взаимодействие ICOS с его лигандом ICOS-L — помощь Т-хелперов В-клеткам в зародышевых центрах лимфоидных фолликулов при продукции антител. В то же время взаимодействие CTLA-4 и B-7 обеспечивает тормозной эффект, оказываемый на ранние Т-клеточные ответы в лимфоидных органах, а взаимодействие PD-1 с его лигандами — PD-1 и 2 — обеспечивает ингибирование функций эффекторных Т-клеток. Блокада активирующих костимуляторных взаимодействий, в частности химерным белком из внеклеточного домена CTLA-4 и Fc-фрагмента иммуноглобулинов (абатацепт), используется при лечении некоторых аутоиммунных болезней и в целях подавления трансплантационного иммунитета. Впрочем, несмотря на активное прикладное использование имеющихся знаний, в механизмах регуляции активации Т-клеток остается много неясного. В частности, не вполне ясны значение и механизмы весьма разной степени чувствительности различных Т-клеток к B7-CD28-взаимодействиям (наиболее чувствительны наивные и $CD4^+$ Т-лимфоциты, наименее — Т-клетки памяти и $CD8^+$). Неясно, каково значение двух лигандов для B7-рецептора и избыточны ли их эффекты? B7-CD28-взаимодействия требуются и для управления активностью Т-регуляторов, но не вполне понятно, оказывают ли эти взаимодействия обратный эффект на функции антигенпредставляющих клеток. Наконец, многие другие рецепторы

Т-лимфоцитов могут опосредовать понижающие и повышающие влияния на их активацию, помимо вышеназванных В7-CD28-взаимодействий. Так, возможными терапевтическими мишенями в этом отношении могут служить рецепторы семейства TNF.

Далее А.К. Аббас описал субпопуляции CD4⁺Т-лимфоцитов, их функции и патогенетическую роль при аутоиммунных заболеваниях, а также возможные связанные с ними терапевтические подходы.

Современные представления о субпопуляциях Т-хелперов суммированы в таблице 2. Новейшим их аспектом служат представления о специализированных фолликулярных Т-хелперах (Tfh), роль которых стала выясняться относительно недавно [32]. Данная субпопуляция Т-хелперов, в отличие от остальных, мигрирующих к очагам воспаления и инфекции, экспрессирует хемокиновый рецептор CXCR5, что позволяет остаться в лимфоидных органах и мигрировать в фолликулы, где эти клетки служат хелперами В-клеток при продукции высокоаффинных антител, а также дают начало клеткам памяти.

По мере накопления данных о свойствах субпопуляций Т-хелперов возникают пока не решенные вопросы: в частности, важно понять, специализированы ли одни Th17-клетки на продукции IL-22 и стимуляции регенерации, а другие — на продукции IL-17 и провоспалительном действии, и нельзя ли их фенотипически различить и оказать на них избирательное терапевтическое влияние? Обращает на себя внимание и явная преобладание эффектов и ролей врожденных лимфоидных клеток разных субпопуляций и различных видов Т-хелперов системы адаптивного иммунитета: так, ВЛК-1 корресси-

руются с Th1, в то время как ВЛК-2 — с Th2, а ВЛК-3 — с Th17-хелперами. Иммунология при изучении разнообразия Т-хелперов черпает материал и догадки из наблюдений клиницистов и патофизиологов. Так, при менделирующей наследственной предрасположенности к микобактериозам оказался дефектным Th1-зависимый домен адаптивного иммунитета (в силу мутаций генов белков, участвующих в IL-12/IFN γ -зависимых взаимодействиях); а при синдроме Иова с кандидозом покровов тела и бактериальными абсцессами страдает Th17-зависимый его домен (ввиду мутаций IL-17 или взаимодействующих с ним белков). Остаются в силе и представления об ассоциации аутоиммунных заболеваний с Th1- и Th17-зависимыми доменами иммунореактивности, а анафилактических аллергических заболеваний, например атопической бронхиальной астмы, — с Th2-зависимым. Единичные ранние свидетельства об исключениях из этого правила в последнее время опровергнуты. На основе этих представлений уже предложены новые средства иммунобиотерапии. Так, антитела к IL-13 оказались высокоэффективны при аллергической бронхиальной астме, антитела-блокаторы дифференцировки Th1- и Th17-лимфоцитов (анти-p40) — при широком спектре аутоиммунитетов, включая аутоиммунную болезнь кишечника и псориаз, а антитела-блокаторы эффектов IL-17 — только при псориазе, причем болезнь Крона они обостряли. На наших глазах в области трансляционной иммунологии сбываются пророческие слова отечественного патофизиолога Г.П. Сахарова, сказанные им еще в 1931 г., что настанет день, когда с помощью антител врач «будет изменять деятельность органов и систем по своему усмотрению, играя, если можно так выразить-

ТАБЛИЦА 2. СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ХЕЛПЕРОВ (ПО А.К. АББАСУ, 2018)

TABLE 2. T-HELPER SUBSETS (A.K. ABBAS, 2018)

Субпопуляции/ их свойства Subpopulations/ their functions	Th1	Th2	Th17	Tfh
Индукторы дифференцировки Inducers of differentiation	IL-12 дендритных клеток, IFN γ естественных киллеров IL-12 of dendritic cells, IFN γ of natural killers	IL-4	IL-6, IL-1 β , TGF- β , IL-23 (из дендритных клеток) IL-6, IL-1 β , TGF- β , IL-23 (of dendritic cells)	ICOS (Т-клеток), IL-6 ICOS (of T cells, IL-6)
Ключевые белки-транскрипционные факторы Key proteins-transcription factors	Tbet, STAT4, STAT1	GATA3, STAT6	ROR γ t, STAT3	BCL-6

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Субпопуляции/ их свойства Subpopulations/ their functions	Th1	Th2	Th17	Tfh
Основные секретируемые цитокины Main secreted cytokines	IFN γ	IL-4, IL-5, IL-13	IL-17, IL-22	IL-21, IL-4, IFN γ (?), IL-13 (?), IL-17 (?)
Основные клетки-мишени Main target cells	Макрофаги Macrophages	Эозинофилы Eosinophils	Нейтрофилы, эпителиоциты Neutrophils, epithelial cells	В-лимфоциты B lymphocytes
Защитная роль Host defense	Уничтожение внутриклеточных патогенов через фагоцитоз, классическая активация макрофагов по провоспалительному пути, с завершением фагоцитоза Fight intracellular pathogens by phagocytosis and classical activation of macrophages by pro-inflammatory way, with the completion of phagocytosis	Противопаразитарная защита (продукция В-лимфоцитами реагиновых антител, дегрануляция мастоцитов и базофилов, активация эозинофилов, усиление продукции слизи в ЖКТ и бронхах, перистальтики ЖКТ и бронхоспазма). Активация макрофагов альтернативным, противовоспалительным фибропластическим путем, фиброплазия, репаративные процессы, плацентогенез Fight parasites (production by B lymphocytes reagin antibodies, mastocyte and basophil degranulation, activation of eosinophils, stimulation of production of mucus in the gut and bronchi, gastrointestinal peristalsis and bronchospasm). Activation of macrophages by alternative, anti-inflammatory fibroplastic route, fibroplasia, reparative processes, placentogenesis	Уничтожение внеклеточных патогенов (стимуляция продукции естественных антибиотических пептидов эпителиями и нейтрофильного воспаления), восстановление целостности барьеров (стимуляция регенерации эпителиоцитов) Fight extracellular pathogens (stimulation of production of natural antibiotic peptides by epithelium and neutrophilic inflammation), restoration of integrity of barriers (stimulation of epithelial cells regeneration)	Обеспечение формирования зародышевых центров, гипермутирования, аффинного созревания, изотипического переключения при антителообразовании для борьбы с внеклеточными патогенами Formation of germinal centers, affinity maturation, isotype switching in the antibody production to fight extracellular pathogens
Патогенная роль Pathogenic role	Аутоиммунные болезни, хроническое воспаление Autoimmune diseases; chronic inflammation	Анафилаксия Anaphylaxis	Аутоиммунные болезни Autoimmune diseases	Аутоиммунные болезни Autoimmune diseases

ТАБЛИЦА 3. ПУТИ АКТИВАЦИИ МАКРОФАГОВ (ПО А.К. АББАСУ, 2018)

TABLE 3. WAYS OF ACTIVATION OF MACROPHAGES (A.K. ABBAS, 2018)

Паттерн активации/ его особенности Activation pattern / its features	M1 (классический) M1 (classic)	M2 (альтернативный) M2 (alternative)
Активирующие сигналы Activating signals	Лиганды TLR-рецепторов, IFN γ TLR receptor ligands, IFN γ	IL-13, IL-4
Клетки-активаторы Activator cells	Th1	Th2
Хемокины и их рецепторы Chemokines and their receptors	CCL19, CCL21, CCL7/CCR7 (поверхностный) CCL19, CCL21, CCL7/CCR7 (surface)	CCL7/CCR7 (цитозольный) CCL7/CCR7 (cytosolic)
Основные секреторные продукты Key secretory products	IL-1, IL-12, IL-23, хемокины, лизосомальные гидролазы, кислород- и галогенсодержащие свободные радикалы, NO (про-воспалительные аутоакоиды) IL-1, IL-12, IL-23, chemokines, lysosomal hydrolases, oxygen-containing and halogen-containing free radicals, NO (pro-inflammatory autacoids)	IL-10, TGF- β (противовоспалительные и фибропластические аутоакоиды) IL-10, TGF- β (anti-inflammatory and fibroplastic autacoids)
Патофизиологический результат Pathophysiologic result	Микробицидный и фунгицидный эффекты, завершённый фагоцитоз, воспаление Microbicidal and fungicidal effects, completed phagocytosis, inflammation	Фиброз, фиброплазия, репаративная регенерация, затухание острого воспаления Fibrosis, fibroplasia, reparative regeneration, attenuation of acute inflammation
Онкоиммунологический эффект Oncoimmunological effect	Противоопухолевый Antitumor	Промоция опухолевого роста Promotion of tumor growth

ся, на них с помощью антисывороток, как на клавиатуре, стимулируя одни, тормозя другие».

В контексте взаимодействий различных Т-хелперов с макрофагами, А.К. Аббас подытожил классические и новейшие представления об активации последних (таблица 3).

Резюмируя современные представления о субпопуляциях Т-хелперов, необходимо подчеркнуть наличие многих слабоизученных вопросов. Так, доказано, что микробиота существенно влияет на направление дифференцировки и соотношение субпопуляций Т-хелперов не только в ЖКТ, но и за его пределами, по крайней мере у грызунов, но для человека эти представления еще не адаптированы. В особенности чувствительны к различным влияниям микробиоты Th17-лимфоциты и Т-регуляторы. Нитчатые седиментирующие бактерии, комменсалы кишечника грызунов, восстанавливают при их введении животным-гнотобиотам популяцию Th17-клеток и чувствительность к индукции аутоиммунного артрита, утрачиваемую грызунами-гнотобиота-

ми [50]. Возможно, в дальнейшем аналогичные исследования у людей дадут новые пути профилактики и лечения аутоиммунных поражений. Пока остаются неясными и смысл существования субпопуляций с перекрывающимися спектрами секреции интерлейкинов, и само реальное количество таких субпопуляций, так как можно полагать, что четырьмя наиболее изученными дело не ограничивается. Неясны и их взаимные влияния.

Понятие иммунологической памяти в ходе развития иммунологии в значительной степени демистифицировалось, ушло от метафорического смысла и наполнилось конкретным содержанием. Иммунологическая память — просто совокупность всех отличий повторного и усиленного иммунного ответа от первичного ответа на антиген. Она не сосредоточена в каком-то одном клеточном типе, представители которого лишь «сидят, помнят и более ничего не делают». Память основана на изменении численности клонов после первичного ответа на антиген

и на том, что часть клеток-участниц первичного ответа избегает гибели и живет более или менее долго. Таким образом, клетки памяти — это часть долгоживущих эффекторных лимфоцитов. Вопрос в том, рекрутируются ли такие клетки случайно или же под влиянием определенных сигнал-рецепторных взаимодействий и из таких ли эффекторов, которые изначально имеют особенности? Переходя к Т-клеткам памяти, А.К. Аббас дал характеристику их подтипов: центрального, эффекторного и резидентно-тканевого. Клетки первого подтипа живут в лимфоидных органах, пролиферируя при ответе на антиген, они создают пул для вторичного, усиленного иммунного ответа. Т-клетки памяти эффекторного подтипа живут в тканях и обеспечивают быстрый эффекторный ответ на знакомый антиген. Резидентные Т-клетки памяти также распределены в тканях, но являются намного более долгоживущими. С возрастом параллельно уменьшению количества наивных Т-лимфоцитов при инволюции тимуса растет количество Т-клеток памяти.

Не менее информативной была и часть курса, посвященная В-лимфоцитам и антителопродукции, где рассматривались взаимодействия В- и Т-клеток и связанные с ними возможные пути терапевтических воздействий при иммунопатологических болезнях. Определенный интерес и терапевтическое значение в этой связи представляет относительно недавно изученный механизм, с помощью которого Fc-рецептор неонатального типа на эндотелиоцитах, костномозговых, антигенпредставляющих, а возможно, и других клетках захватывает иммуноглобулины и обеспечивает в обход лизосом их рециркуляцию на поверхность клетки, где в силу физиологического рН антитело отсоединяется от рецептора, возвращаясь в гуморальные среды организма [35]. Это значимо теоретически, так как еще раз демонстрирует, что внутриклеточное проникновение иммуноглобулинов — заурядное явление, а не исключение, на чем еще в последней четверти XX века, вопреки господствовавшему тогда всеобщему скепсису, настаивали первооткрыватели этого феномена Д. Аларкон-Сеговия и А.Ш. Зайчик [17, 23, 36, 37, 51]. Это значимо и для прикладной иммунобиотерапии, поскольку продлевает сроки циркуляции антител в крови и уже используется в химерных белках, где терапевтический лиганд связывают с Fc-фрагментом антител.

Как известно, активация В-клеток и антителогенез возможны и без участия Т-клеток, но только в отношении поливалентных антигенов, спаривающих иммуноглобулиновые рецепторы (капсульные бактериальные полисахариды, некоторые антигены капсидов вирусов), причем

ответ ограничивается IgM и происходит относительно быстро (1-2 дня) при низкой интенсивности, особенно у маленьких детей. Для полномасштабного (хотя и более медленного) ответа с изотипическим переключением классов иммуноглобулинов, а также для аффинного созревания — отбора в ходе ответа, ведущего к генерации высокоаффинных антител — необходимо участие Т-хелперов, что возможно только у антигенов, имеющих белковую составляющую. Взаимодействие В- и Т-клеток требует от них в лимфоидных органах сложной «хореографии», направляемой хемокиновыми взаимодействиями. Т-клетки после взаимодействия с дендритными клетками, несущими антиген, и В-клетки, распознавшие антиген в фолликулах лимфоузлов, мигрируют затем навстречу друг другу в Т-клеточную зону лимфоузла, где экстрафолликулярно происходит их начальное взаимодействие (экспрессия Т-хелперами CD40L, его связывание с В-лимфоцитарным CD40, активация, пролиферация и дифференцировка В-клеток под действием секретируемых экстрафолликулярными Т-хелперами цитокинов). Формируется ранний внефолликулярный очаг активации В-клеток с короткоживущими плазмочитами. Затем часть возвращающихся В- и Т-клеток мигрирует в лимфоидный фолликул, где во взаимодействии с описанными выше Tfh-хелперами происходит формирование зародышевых центров, возникают все новые плазмочиты, выделяются долгоживущие В-клетки памяти, путем соматического мутирования и отбора происходит аффинное созревание и ведется изотипическое переключение классов антител. Для всех этих процессов важнейшим служит влияние Tfh-клеток, а для гипермутирования и аффинного созревания, а также изотипического переключения — индукция в В-клетках фермента активационно-индуцируемой цитидиндезаминазы (AID) [36]. При отборе на аффинность производимых антител выживают при цитокиновом подкреплении именно те В-клоны, которые своим поверхностным иммуноглобулиновым рецептором способны наиболее аффинно фиксировать антиген, представленный фолликулярными интердигитирующими дендритными клетками и презентовать его фолликулярным Т-хелперам. В этом аспекте, как и в ряде других, полностью оправдывается ранняя идея И.И. Мечникова (1892) о решающей роли «внутренней борьбы за существование» между клетками одного организма для работы иммунной системы [38]. К сожалению, пока не разработаны эффективные методы определения у человека Tfh-клеток, дирижирующих процессами в зародышевых центрах. Процессы в зародышевых центрах лимфоидных фолликулов потен-

циально должны быть объектом медицинских воздействий — как для их усиления с целью более эффективных вакцинаций, так и в контексте возможной связи с гиперпродукцией аутоантител при аутоиммунной патологии.

В ходе иммунного ответа титры антител в плазме крови нарастают, но ни в лимфоузлах, ни и селезенке не обнаруживаются плазмocyты. Антитела производят плазматические клетки, мигрировавшие в костный мозг и ткани слизистых оболочек. Они могут там долго существовать, поддерживая гуморальный иммунитет.

В-клетки и плазмocyты становятся в современной трансляционной медицине объектами лечебных воздействий. К ним относятся антитела к CD20, направленные против В-лимфоцитов, антагонисты активатора В-клеток BAFF, проходят клинические испытания антитела против CD40 и CD40L, предложен иммунный ингибитор протеасом, в ряде случаев при аутоиммунной патологии применяют плазмаферез.

Наибольший интерес у участников конгресса по аутоиммунитету, конечно, вызвала лекция А.К. Аббаса об аутоотолерантности, регуляторных Т-клетках и ингибиторных рецепторах Т-лимфоцитов. Он охарактеризовал современные представления как о центральной толерантности, достигаемой при распознавании незрелыми лимфоидными клетками собственных антигенов, так и о толерантности периферической, заключающейся в торможении активности собственных зрелых аутореактивных лимфоцитов.

Как известно, центральная толерантность основывается на том, что, распознавая в тимусе собственные антигены, Т-лимфоциты или гибнут, или дифференцируются в Т-регуляторы. Для обеспечения этого, помимо убиквитарных и циркулирующих в крови аутоантигенов, тимус экспрессирует в минорных количествах в эпителиоцитах мозгового вещества ряд аутоантигенов периферических тканей с помощью специального, так называемого AIRE-зависимого механизма. Его открытие связано с изучением патофизиологии аутоиммунного полиэндокринного синдрома I типа (синдром Уитэйкер—Торпа—Хэндли). Носители этого синдрома имеют дефект гена AIRE, у них нарушено формирование центральной толерантности, и имеются аутоиммунные поражения различных эндокринных клеток, а также эктодермальная дистрофия и кандидоз. У нокаутных мышей без гена AIRE формируется аутоиммунное поражение ряда эндокринных органов и сетчатки. AIRE кодирует транскрипционный фактор, переключающий экспрессию ряда белков, которые свойственны нетимическим клеткам, в основном нейроэндокринным. Минорная

экспрессия этих генов нужна для негативной селекции Т-клонов и продукции соответствующих клонов Т-регуляторов. Важным новым аспектом проблемы аутоотолерантности служит то обстоятельство, что Т-клетки располагают тормозными рецепторами. Физиологическая функция этих рецепторов — сдерживание аутореактивных иммунных ответов. Ряд вирусов (гепатита С, ВИЧ-инфекции), а также опухолевые клоны при онкологических заболеваниях влияют на эти рецепторы для подавления противоопухолевой или противовирусной иммунореактивности. Эти рецепторы и их лиганды на клетках принадлежат к семейству В7-CD28. Взаимодействие тормозного лиганда В7-2 (CD86) на поверхности клеток с узнающими его рецепторами CD28 и CTLA-4 на Т-клетках опосредует торможение ранних иммунных ответов в лимфоидных органах и супрессорную функцию Т-регуляторов. Взаимодействия лигандов PD-L1/PD-L2 (синонимы: В7-H1/В7-DC или CD274/CD273) с их Т-лимфоцитарным рецептором PD-1 опосредуют торможение эффекторных Т-лимфоцитов в периферических тканях. CTLA-4 и CD28 являются рецепторами реципрокными по эффектам. При этом первый за счет более высокой аффинности к одним и тем же лигандам способен блокировать взаимодействие CD28 с такими лигандами и прерывать процесс костимуляции, предупреждая выраженный иммунный ответ. При наследственных дефектах первого наступают лимфопролиферативные и полиорганные воспалительные нарушения. Экспрессия тормозного регулятора CTLA-4 приводит к терминации ответа Т-клона, который его экспрессировал, а если это клон Т-регуляторов, то экспрессия им CTLA-4 позволяет этому клону осуществить подавление ответа другого Т-клона на антиген, представленный антигенпредставляющей клеткой и распознанный последним. Как полагают в настоящее время, Т-клоны «выбирают», экспрессией какого именно рецептора — стимуляторного или ингибиторного — ответить на презентуемый антиген на основании простого уровня экспрессии костимуляторного лиганда В7. Если антигенпредставляющая клетка экспрессирует много В7 (например, в условиях антигенной агрессии, тканевого повреждения), в ответ экспрессируется относительно низкоаффинный стимуляторный CD28. В случае отсутствия опасности и деструкции антигенпредставляющие элементы экспрессируют мало В7, что заставляет Т-клоны экспрессировать его высокоаффинный рецептор CTLA-4, для поддержания термодинамического равновесия, а последний служит тормозом иммунного ответа! При этом совершенно не нужно ни «помнить всех своих наперечет», ни «знать заранее в лицо всех будущих

врагов». Таким образом, развитие естественнонаучных основ иммунологии дезавуирует те ранние мифологемы, которые вызвали столько споров и недоумения на начальных этапах развития этой дисциплины.

Другой тормозной рецептор Т-клеток — PD-1 — распознает широко распространенные в организме лиганды PD-L1/L2, а его мутации также вызывают аутоиммунные поражения, хотя и менее тяжелые, чем при выпадении функций CTLA-4. Его функция — дефосфорилирование и деактивация с помощью фосфатазы фосфорилированных и активированных звеньев пострецепторной передачи сигнала от активирующего рецептора CD28. Вероятно, эта функция наиболее важна при хронической антигенной стимуляции, возможно, что при патологии именно с этим рецептором связано снижение иммунного ответа в течение хронических инфекций или опухолевых заболеваний. В противоположность тормозным сигналам от CTLA-4, которые более активно действуют на Т-хелперы, ингибирующее влияние от PD-1 сильнее сказывается на Т-эффекторах. Завершающая часть данной лекции А.К. Аббаса была посвящена Т-регуляторам, количество информации о которых в последние годы лавинообразно нарастало. Это и понятно: аутоиммунологов волнуют перспективы терапевтических воздействий с целью замещения или активации супрессорных функций Трег при аутоиммунных недугах.

Считается твердо доказанным, что эти клетки могут дифференцироваться после контакта с собственными антигенами под управлением транскрипционного фактора FoxP3, экспрессия которого запускается деметилированием некодирующей промотерной последовательности CNS2; располагают маркерами CD4 и CD25 (высокоаффинным рецептором IL-2, причем последнего цитокина они сами не образуют, хотя он нужен для их выживания); а CTLA-4 необходим для реализации их супрессорных функций. Известно, что мутация FoxP3 лежит в основе развития IPEx-синдрома у человека, характеризующегося мультисистемными аутоиммунными поражениями. У нокаутных по гену FoxP3 мышей введение полноценных Т-регуляторов облегчает подобные нарушения, но в отношении патогенетической роли дефектов Т-регуляторов и/или ответа на их воздействия при аутоиммунной патологии человека данные пока неполны и противоречивы. Одна из причин этого — несовершенство имеющихся методов определения функций Трег, которые не учитывают их главного эффекта — понижающего влияния на экспрессию В7 антигенпредставляющими клетками. Помимо этого способа снижения костимулятор-

ной активности при взаимодействии последних с Т-лимфоцитами, тормозящего CD28-зависимые эффекты, Трег могут оказывать супрессорные воздействия еще несколькими путями: через продукцию IL-10 и других тормозных цитокинов (что особенно важно в регуляции местного иммунитета слизистых), через элиминацию захватываемого IL-2 и т.п. В настоящее время до стадии клинических испытаний доведены попытки использовать наработанные *ex vivo* аутологичные Трег с целью терапии аутоиммунных заболеваний (в частности, инсулинозависимого сахарного диабета 1-го типа), а также для противодействия отторжению трансплантата. Хотя эти исследования свидетельствовали в пользу безопасности метода, убедительных данных об его эффективности у человека пока недостаточно, ибо эффекты индивидуально весьма разнятся. Помимо применения самих Трег, делаются попытки стимулировать их дифференцировку введением антигенов без адъювантов и/или цитокинами. А.К. Аббас привлек внимание аудитории к двум новейшим аспектам представлений о Трег. Во-первых, существует эволюционная связь между появлением у млекопитающих периферических Трег и возникновением плацентации. Отцовские антигены семиаллогенного плода индуцируют долгоживущие материнские Трег. Их утрата у мышей в эксперименте приводит к рассасыванию плода. Возможно, дефекты функции Трег лежат в основе некоторых форм невынашивания и у человека, хотя это пока не доказано. Всеобщее внимание привлекли очень интересные данные, ставящие под сомнение традиционную версию о роли и эффектах IL-2. Сложившиеся представления об IL-2 трактуют этот цитокин исключительно как иммуностимулирующий фактор для Т-клеток, несущий функцию ростового фактора, а для В-лимфоцитов и естественных киллеров — по крайней мере, стимулятора. Именно в этом качестве он и его аналоги (например, отечественный ронколейкин) и нашли применение в практической медицине, в том числе в нашей стране [40]. Но, как кратко выразился А.К. Аббас, по новейшим данным, «С IL-2 все не так просто...». Оказалось, что у мышей, нокаутных по гену самого IL-2 либо любой из цепей его рецептора, не развивается теоретически ожидаемого иммунодефицита. Напротив, имеют место аутоиммунные и лимфопролиферативные нарушения! В частности, аутоиммунный процесс у таких мышей поражает головной мозг, в особенности септо-гиппокампальную область [31, 41, 42].

Следовательно, роль данного цитокина в иммунной системе двоякая. Не дублируется другими регуляторами присущая IL-2 функция супрессорного контроля за иммунными ответами,

поскольку он необходим для появления Treg. Практика его применения как иммуностимулятора нуждается в этой связи в переосмыслении. Похоже, что малые дозы данного цитокина могут использоваться для преимущественной связи с его высокоаффинным, то есть присущим Treg, рецептором. Возможно, удастся видоизменить молекулу рекомбинантного IL-2 так, чтобы она связывалась только с CD25. Тогда клиническая иммунология получит новое средство подавления аутоиммунитета.

В заключительной лекции А.К. Аббас остановился на вопросах онкоиммунологии. Со времен, когда в начале минувшего века П. Эрлих впервые гипотетически поставил вопрос о существовании иммунного надзора над опухолевым ростом, а Н.Н. Финогенов получил первые патоморфологические свидетельства того, что лимфоидная инфильтрация действительно может задерживать рост опухолей [9], данная отрасль иммунологии прошла большой и противоречивый путь. А.К. Аббас главным образом коснулся современных методов иммунотерапии в онкологии и их побочных эффектов. Хотя на сегодня несомненно, что иммунная система отвечает на антигены опухолевых клеток и участвует в иммунном надзоре за ними, неоплазии свойственно изменять эффекты действия клеток иммунной системы в свою пользу. Поэтому в ряде случаев иммунный ответ на опухоли приводит к развитию толерантности, а некоторые иммунные реакции даже способствуют опухолевому росту. А.К. Аббас в историческом ключе обрисовал эволюцию идей в области иммунотерапии рака, отметив ряд вех, в основном остановившись на прорывных достижениях недавнего периода [43]. Были упомянуты классические описания Р. Вирховым круглоклеточной инфильтрации опухолей (1863), лечение опухолей «токсиком Кули» (1898), применение вакцины БЦЖ в терапии рака мочевого пузыря (1976), использование в онкотерапии IL-2 (1983), адаптивная клеточная терапия рака (1985), давшая начало его лечению Т-клетками (2002), открытие и генетический анализ (на примере меланомы) опухолевых антигенов, распознаваемых Т-клетками у человека (1991-94) [45], появление вакцины против папилломавирусов (2009), введение в клиническую практику дендритоклеточной вакцины от рака простаты (2010), моноклональных антител против CTLA-4 (2011) и против PD-1 (2014) и, наконец, разработка лечения лейкоза с помощью CAR-T-клеток — Т-лимфоцитов с химерными искусственно сконструированными антигенными рецепторами (после 2014 г.) — вплоть до ее внедрения в практику (2017). Особенное внимание он уделил онкотерапевтическим подходам с применением Т-клеток. Поскольку

опухолеспецифические Т-клетки в кровотоке обнаруживаются редко, целесообразно внести в аутологичные Т-клетки опухолеспецифический антигенный рецептор и наработать этот клон *ex vivo*. Но какой рецептор вводить и как обеспечить его экспрессию? Эти задачи и решаются технологией CAR-T [47]. В Т-клетки индивида вводится химерный рецептор, содержащий распознающий фрагмент от противоопухолевого моноклонального антитела, соединительный участок, трансмембранный фрагмент, один (в CAR-T второго поколения) или два (в CAR-T третьего поколения) костимуляторных домена и сигнальный домен Т-клеточного рецептора CD3 ξ [22]. Первые результаты такой терапии оказались многообещающими при некоторых формах лейкоза [29]. Но пока не удалось эффективно подействовать на солидные опухоли. Технически трудоемкий и высокотехнологичный метод очень дорог. Выявились проблемы истощения пула введенных Т-клеток и возникновения резистентности из-за утраты неопластическими элементами антигена-мишени химерных рецепторов; но главное — из-за одновременной активации множества Т-клеток побочным результатом может быть избыточное системное действие цитокинов («цитокиновый шторм»), что проявляется не только гиперпиретической лихорадкой и крайне выраженным острофазовым ответом, но в ряде случаев симптомами недостаточности кровообращения и полиорганной недостаточности в связи с развитием от системного действия медиаторов воспаления опасного для жизни токсического шока. Для борьбы с этим синдромом есть успешный опыт применения антител к рецепторам IL-6, хотя и не все его проявления к такой терапии чувствительны, ибо не один этот интерлейкин принимает участие в шокогенном системном действии воспалительных аутокинов, — как следствие, например, поражение мозга таким лечением не предотвращается.

Многообещающие перспективы и новые проблемы онкоиммунотерапии связаны не только с инструментами клеточного, но и гуморального иммунитета. Блокирование описанных выше тормозных рецепторов Т-лимфоцитов с помощью антител и их аналогов растормаживает иммунные ответы против опухолей, но также и повышает уровень аутореактивности вплоть до аутоиммунных осложнений. Впечатляющие результаты получены в онкологии при лечении ингибиторами CTLA-4 и, в особенности, анти-PD-1. Если первые работают на стадии активации прайминга, то вторые доказывают возможность реактивации подавленных ответов Т-эффекторов. Сравнивая методы лечения ингибиторами тормозных рецепторов и противоопухолевыми вакцинами,

А.К. Аббас отметил, что вакцины, поскольку в данном случае большинство из них терапевтические, а не профилактические, действуют уже на фоне запущенных неопластическими клетками механизмов ослабления и извращения противоопухолевых ответов, в то время как лечение ингибиторами тормозных лимфоцитарных рецепторов как раз и направлено против индуцируемой опухолью толеризации, что потенциально сулит преимущества. Однако аутоиммунные осложнения такой терапии представляют существенную, в ряде случаев тяжелую проблему. Они могут развиваться при терапии ингибиторами CTLA-4, по клинической картине бывают разнообразны: артриты, миокардит, колит, сахарный диабет 1 типа. Весьма часто индуцируется аутоиммунный тиреоидит, бывает аутоиммунный адреналит, и очень типично аутоиммунное поражение гипофиза, клетки которого и в норме экспрессируют, подобно Т-лимфоцитам, антиген CTLA-4. В дискуссии по этим вопросам одним из авторов данной статьи (ЛПЧ) было высказано предположение, что ингибиторы тормозных рецепторов Т-лимфоцитов могут оказаться особенно эффективны при терапии опухолей гипофиза, чего, однако, пока никто не проверял.

В специальной части Первой Академии аутоиммунитета Аннегрет Кун из Германии осветила проблемы аутоиммунных дерматологических заболеваний, в основном кожных форм красной волчанки, а также новых методов их лечения и согласованных критериев ремиссии [34]. В лекции Наоми Шлезинджер (США) речь шла о связях между кристаллическими артритом и аутоиммунным поражением суставов [45]. Выступление

Марии Куадрадо (Великобритания) касалось оптимизации применения стероидной терапии при системной красной волчанке и других ревматологических заболеваниях с целью уменьшения побочных эффектов [46]. О стратегии прицельной терапии системной красной волчанки (“treat-to-target”) шла речь в лекции итальянского ревматолога Андреа Дориа [25]. И, наконец, о новых аспектах иммунобиотерапии и иммуногистохимической диагностики гигантоклеточного артериита рассказал другой итальянский специалист — Карло Сальварани [52]. Вторая академия аутоиммунитета, где был полностью повторен с учетом первого опыта авторский лекционный курс профессора Абула К. Аббаса и проведены лекции других ведущих ученых и клиницистов из России и ряда зарубежных стран, прошла 21-23 сентября 2018 г. в Санкт-Петербургском государственном университете, в Актовом зале его исторического «Здания 12-ти коллегий». Для российских студентов-медиков и всех обучающихся в СПбГУ регистрация и участие в ней были безвозмездны. Для российских дипломированных специалистов и для специалистов из стран СНГ и стран с низким доходом действовали льготные условия регистрации. Ознакомиться с программой и условиями участия, а также зарегистрироваться можно было по ссылке [53]. Приглашаем всех читателей журнала «Медицинская иммунология» на Третью Академию аутоиммунитета во Флоренцию 13-14 марта 2019 г.

Все авторы внесли равный вклад в написание текста данной работы и заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Ватад А., Шенфельд И. Новые факторы, оркеструющие мозаику аутоиммунитета – 2017 // Клиническая патофизиология, 2016. Т. 22, № 4. С. 3-5. [Vatad A. Shoenfeld I. New factors, which orchestrate the mosaic of autoimmunity – 2017. *Klinicheskaya patofiziologiya = Clinical Pathophysiology*, 2016, Vol. 22, no. 4, pp. 3-5. (In Russ.)]
2. Зайчик А.Ш. Изменения специфических клеточных функций под влиянием антител // Цитология, 1978. Т. 20, № 9. С. 1070-1074. [Zaychik A.Sh. Change in the specific functions of cells under the influence of antibodies. *Tsitologiya = Cytology*, 1978, Vol. 20, no. 9, pp. 1070-1074. (In Russ.)]
3. Корнева Е.А. Основные этапы и тенденции развития иммунофизиологии (к 20-летию основания Международного научного общества по нейроиммуномодуляции) // Медицина. XXI век, 2007. № 6. С. 16-23. [Korneva E.A. Main stages and development trends of Immunophysiology (on the 20th anniversary of the foundation of The International Society on Neuroimmunomodulation). *Meditina. XXI vek = Medicine. XXI Century*, 2007, no. 6., pp. 16-23. (In Russ.)]
4. Корнева Е.А., Хай Л.М. О влиянии раздражения различных структур промежуточного мозга на протекание иммунологических реакций // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова, 1967. Т. 53, № 1. С. 42-47. [Korneva E.A., Khay L.M. On the effect of stimulation of various structures of the Diencephalon on the course of immunological reactions. *Fiziologicheskiy zhurnal SSSR im. I.M. Sechenova = I. Sechenov Physiological Journal of the USSR*, 1967, Vol. 53, no. 1, pp. 42-47. (In Russ.)]
5. Поземковская М., Чурилов Л.П. Илья Ильич Мечников и всемирное значение его наследия // Клиническая патофизиология, 2016. Т. 22, № 3. С. 3-28. [Pozemkovskaya M., Churilov L.P. I.I. Metchnikov and global importance of his legacy. *Klinicheskaya patofiziologiya = Clinical Pathophysiology*, 2016, Vol. 22, no. 3, pp. 3-28. (In Russ.)]

6. Руководство по аутоиммунным заболеваниям для врачей общей практики. Под. ред. Шенфельда И., Мерони П.Л., Чурилова Л.П. СПб.: Элби-СПб, 2017. 416 с. [Guide in autoimmune diseases for general medical practice. Ed. Shoenfeld Y., Meroni P.L., Churilov L.P.]. St. Petersburg: Elbi-SPb., 2017. 416 p.
7. Сахаров Г.П. Проблема цитотоксинотерапии в эндокринологии // Проблемы эндокринологии, 1931. Т. 3. С. 291-293. [Sakharov G.P. Problem of cytotoxin therapy in endocrinology. *Problemy endokrinologii* = *Problems of Endocrinology*, 1931, Vol. 3, pp. 291-293. (In Russ.)]
8. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Останин А.А., Никонов С.Д., Жданов О.А., Черных Е.Р. Интерлейкин-2 в коррекции анергии Т-клеток у больных легочным туберкулезом // Проблемы туберкулеза и болезней легких, 2006. Т. 1. С. 48-51. [Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Nikonov S.D., Zhdanov O.A., Chernykh E.R. Interleukin-2 in the correction of T cell anergy in patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh* = *Problems of Tuberculosis and Lung Diseases*, 2006, Vol. 1, pp. 48-51. (In Russ.)]
9. Ковалев А.В., Коровин А.Е., Чурилов Л.П., Сысоев А.Е., Шевченко В.А. Военный врач Николай Николаевич Финогенов – провозвестник онкоиммунологии // Клиническая патофизиология, 2017. Т. 23, № 3. С. 107-116. [Kovalev A.V., Korovin A.E., Churilov L.P., Sysoev A.E., Shevchenko V.A. Military doctor Nikolai Nikolaevich Finogenov – harbinger of oncomimunology. *Klinicheskaya patofiziologiya* = *Clinical Pathophysiology*, 2017, Vol. 23, no. 3, pp. 107-116. (In Russ.)]
10. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Basic Immunology. 5th ed. Elsevier: Amsterdam a.e., 2016. 352 p.
11. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 9th ed. Elsevier: Amsterdam a.e., 2017. 608 p.
12. Agmon-Levin N., Blank M., Zandman-Goddard G., Orbach H., Meroni P.L., Tincani A., Doria A., Cervera R., Miesbach W., Stojanovich L., Barak V., Porat-Katz B.S., Amital H., Shoenfeld Y. Vitamin D: an instrumental factor in the anti-phospholipid syndrome by inhibition of tissue factor expression. *Ann. Rheum. Dis.*, 2011, Vol. 70, no. 1, pp. 145-150.
13. Agmon-Levin N., Lian Z., Shoenfeld Y. Explosion of autoimmune diseases and the mosaic of old and novel factors. *Cell. Mol. Immunol.*, 2011, Vol. 8, pp. 189-192.
14. Agmon-Levin N., Paz Z., Israeli E., Shoenfeld Y. Vaccines and autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2009, Vol. 5, pp. 648-652.
15. Agmon-Levin N., Shoenfeld Y. Prediction and prevention of autoimmune skin disorders. *Arch. Dermatol. Res.*, 2008, Vol. 301, no. 1, pp. 57-64.
16. Akilesh S., Christianson G.J., Roopenian D.C., Shaw A.S. Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 7, pp. 4580-4588.
17. Alarcon-Segovia D., Ruiz-Arguelles A., Fishbein E. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature*, 1978, Vol. 271, no. 5640, pp. 67-69.
18. Arnson Y., Amital H., Agmon-Levin N., Alon D., Sánchez-Castañón M., López-Hoyos M., Matucci-Cerinic M., Szűcs G., Shapira Y., Szekanecz Z., Shoenfeld Y. Serum 25-OH vitamin D concentrations are linked with various clinical aspects in patients with systemic sclerosis: retrospective cohort study and review of the literature. *Autoimmun. Rev.*, 2011, Vol. 10, pp. 490-494.
19. Bassi N., Ghirardello A., Blank M., Zampieri S., Sarzi-Puttini P., Mantovani A., Shoenfeld Y., Doria A. IgG anti-pentraxin 3 antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, Vol. 69, pp. 1704-1710.
20. Boon T. Toward a genetic analysis of tumor rejection antigens. *Adv. Cancer Res.*, 1992, Vol. 58, pp. 177-210.
21. Bryant V.L., Ma C.S., Avery D.T., Li Y., Good K.L., Corcoran L.M., de Waal Malefyt R., Tangye S.G. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5⁺ T follicular helper cells. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 12, pp. 8180-8190.
22. Ciccica F., Ferrante A., Guggino G., Cavazza A., Salvarani C., Rizzo A. CD3 immunohistochemistry is helpful in the diagnosis of giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2018, Vol. 57, no. 8, pp. 1377-1380.
23. Cutolo M., Pizzorni C., Sulli A. Vitamin D endocrine system involvement in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun. Rev.*, 2011, Vol. 11, pp. 84-87.
24. da Costa R., Szyper-Kravitz M., Szekanecz Z., Csépany T., Dankó K., Shapira Y., Zandman-Goddard G., Orbach H., Agmon-Levin N., Shoenfeld Y. Ferritin and prolactin levels in multiple sclerosis. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2011, Vol. 13, no. 2, pp. 91-95.
25. Doria A., Cervera R., Gatto M., Chehab G., Schneider M. The new targeted therapy in systemic lupus erythematosus: Is the glass half-full or half-empty? *Autoimmun. Rev.*, 2017, Vol. 11, pp. 1119-1124.
26. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 1909, Vol. 5, no. 1, pp. 273-290.
27. Ehrlich P., Morgenroth J. Über Haemolisine. V. Fünfte Mitteilung. *Berl. Klin. Wschr.*, 1900, Vol. 37, pp. 453-458.
28. Fuchs E.J., Matzinger P. Is cancer dangerous for immune system? *Semin. Immunol.*, 1996, Vol. 8, no. 5, pp. 271-280.
29. Gill S., June C.H. Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies. *Immunol. Rev.*, 2015, Vol. 263, no. 1, pp. 68-89.
30. Harari M., Dramsdahl E., Shany S., Baumfeld Y., Ingber A., Novack V., Sukenik S. Increased vitamin D serum levels correlate with clinical improvement of rheumatic diseases after Dead Sea climatotherapy. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2011, Vol. 13, pp. 212-215.

31. Huang Z., Dauer D.J., Ha G.K., Lewis M.H., Petitto J.M. Interleukin-2 deficiency-induced T cell autoimmunity in the mouse brain. *Neurosci. Lett.*, 2009, Vol. 463, no. 1, pp. 44-48.
32. Iobagiu C., Magyar A., Nogueira L., Cornillet M., Sebbag M., Arnaud J., Hudecz F., Serre G. The antigen specificity of the rheumatoid arthritis-associated ACPA directed to citrullinated fibrin is very closely restricted. *J. Autoimmun.*, 2011, Vol. 37, pp. 263-272.
33. Kivity S., Agmon-Levin N., Blank M., Shoenfeld Y. Infections and autoimmunity – friends or foes? *Trends Immunol.*, 2009, Vol. 30, pp. 409-414.
34. Kuhn A., Wenzel J., Bijl M. Lupus erythematosus revisited. *Semin. Immunopathol.*, 2016, Vol. 38, no. 1, pp. 97-112.
35. Leung P.S., Shu S.A., Kenny T.P., Wu P., Tao M. Development and validation of gene therapies in autoimmune diseases: Epidemiology to animal models. *Autoimmun. Rev.*, 2010, Vol. 9, pp. A400-A405.
36. Liu X., Meng F.L. Generation of genomic alteration from cytidine deamination. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2018, Vol. 1044, pp. 49-64.
37. Lleo A., Invernizzi P., Gao B., Podda M., Gershwin M.E. Definition of human autoimmunity – autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.*, 2010, Vol. 9, pp. A259-A266.
38. Metchnikoff E. La lutte pour l'existence entre les diverses parties de l'organisme. *Rev. Sci.*, 1892, Vol. 11, p. 324.
39. Murphy T.L., Grajales-Reyes G.E., Wu X., Tussiwand R., Briseño C.G., Iwata A., Kretzer N.M., Durai V., Murphy K.M. Transcriptional control of dendritic cell development. *Annu. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 34, pp. 93-119.
40. Petitto J.M., Meola D., Huang Z. Interleukin-2 and the brain: dissecting central versus peripheral contributions using unique mouse models. *Methods Mol. Biol.*, 2012, Vol. 934, pp. 301-311.
41. Powell J.J., Faria N., Thomas-McKay E., Pele L.C. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J. Autoimmun.*, 2010, Vol. 34, pp. 226-233.
42. Praprotnik S., Agmon-Levin N., Porat-Katz B.S., Blank M., Meroni P.L., Cervera R., Miesbach W., Stojanovich L., Szyper-Kravitz M., Rozman B., Tomsic M., Shoenfeld Y. Prolactin's role in the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 2010, Vol. 19, pp. 1515-1519.
43. Rosenberg S.A., Restifo N.P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, 2015, Vol. 348, no. 6230, pp. 62-68.
44. Rubtsov A.V., Rubtsova K., Kappler J.W., Marrack P. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2010, Vol. 9, pp. 494-498.
45. Schlesinger N. Crystal arthritis: New recommendations highlight the need for more research. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2016, Vol. 12, no. 11, pp. 628-630.
46. Sciascia S., Mompean E., Radin M., Roccatello D., Cuadrado M.J. Rate of adverse effects of medium- to high-dose glucocorticoid therapy in systemic lupus erythematosus: A systematic review of randomized control trials. *Clin. Drug Investig.*, 2017, Vol. 37, no. 6, pp. 519-524.
47. Selmi C., Tsuneyama K. Nutrition, geoepidemiology, and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2010, Vol. 9, pp. A267-270.
48. Shen L., Matsunami Y., Quan N., Kobayashi K., Matsuura E., Oguma K. *In vivo* oxidation, platelet activation and simultaneous occurrence of natural immunity in atherosclerosis-prone mice. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2011, Vol. 13, pp. 278-283.
49. Shoenfeld Y., Agmon-Levin N. «ASIA» – autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J. Autoimmun.*, 2011, Vol. 36, pp. 4-8.
50. Wu H.-J., Ivanov I.I., Darce J., Hattori K., Shima T., Umesaki Y., Littman D.R., Benoist C., Mathis D. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*, 2010, Vol. 32, no. 6, pp. 815-827.
51. Zaichik A.Sh., Churilov L.P., Utekhin V.J. Autoimmune regulation of genetically determined cell functions in health and disease. *Pathophysiology*, 2008, Vol. 15, no. 3, pp. 191-207.
52. 11th International Congress on Autoimmunity [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <https://autoimmunity.kenes.com/2018/Pages/Interactive-programm.aspx>. Дата обращения: 26.06.2018. [11th International Congress on Autoimmunity [Electronic resource]. Access mode: <https://autoimmunity.kenes.com/2018/Pages/Interactive-programm.aspx>. 26.06.2018].
53. 2nd Academy of Autoimmunity [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <https://events.spbu.ru/events/autoimmunity2018?lang=Ru>. Дата обращения: 04.07.2018. [2nd Academy of Autoimmunity [Electronic resource]. Access mode: <https://events.spbu.ru/events/autoimmunity2018?lang=Ru>. 04.07.2018].

Авторы:

Корнева Е.А. — д.м.н., академик РАН, профессор кафедры патологии медицинского факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; главный научный сотрудник — научный консультант отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Петяева А.В. — лаборант-исследователь лаборатории мозаики аутоиммунитета, студентка 5 курса ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Федоткина Т.В. — к.б.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории мозаики аутоиммунитета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; доцент кафедры гистологии и эмбриологии имени профессора А.Г. Кнорре ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Чурилов Л.П. — к.м.н., доцент, действительный член Международной академии наук (Здоровье и экология), член-корр. Международной академии наук высшей школы, заведующий кафедрой патологии медицинского факультета, заместитель руководителя лаборатории мозаики аутоиммунитета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; ведущий научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт физиопульмонологии», Санкт-Петербург, Россия

Шенфельд И. — доктор медицины, профессор, магистр клинических исследований, почетный член Лондонского королевского колледжа врачей, основатель и руководитель Центра аутоиммунных заболеваний имени П. Заблудовича в Медицинском центре имени Х. Шебы (Тель-Хашомер, Рамат-Ган), аффилированном с Саклеровским медицинским факультетом Университета Тель-Авива; исполняющий обязанности заведующего кафедрой изучения аутоиммунных болезней имени Лауры Шварц-Кипп на Саклеровском медицинском факультете Университета Тель-Авива, Тель-Авив, Израиль; главный научный сотрудник, руководитель лаборатории мозаики аутоиммунитета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Korneva E.A., M.D., D.Sci. (Medicine), Full Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Department of Pathology, Medical Faculty, St. Petersburg State University; Chief Research Associate — Scientific Advisor, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Petyaeva A.V., Laboratory Assistant-Researcher, Laboratory of Mosaic of Autoimmunity, 5th year Student, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Fedotkina T.V., PhD (Biology), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Mosaic of Autoimmunity, St. Petersburg State University; Associate Professor, Prof. A. Knorre Department of Histology and Embryology, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Churilov L.P., M.D., PhD (Medicine), Associate Professor, Full Member, International Academy of Sciences (Health and Ecology), Corresponding Member, International Higher School Academy of Sciences, Head, Pathology Department, Faculty of Medicine, Deputy-Chief, Laboratory of Mosaic of Autoimmunity, St. Petersburg State University; Leading Research Associate, St. Petersburg Research Institute of Phthysiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Shoenfeld Y., M.D., F.R.C.P. (Hon.), Ma. A. C. R., Professor, Founder and Head, Zabudowicz Center for Autoimmune Diseases at Chaim Sheba Medical Center, Tel HaShomer, Ramat Gan; Incumbent, Laura Schwarz-Kipp Chair for Research of Autoimmune Diseases, Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel; Chief Research Associate and Head, Laboratory of Mosaic of Autoimmunity, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 19.07.2018
Принята к печати 19.09.2018

Received 19.07.2018
Accepted 19.09.2018

К 85-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ КИРИЛЛА ПАВЛОВИЧА КАШКИНА



10 января 2019 года исполнилось 85 лет видному советскому и российскому иммунологу, академику РАН, профессору, доктору медицинских наук Кашкину Кириллу Павловичу.

Кашкин К.П. родился в г. Ленинграде. В 1957 году с отличием окончил 1-й Ленинградский медицинский институт им. акад. И.П. Павлова. После чего проходил аспирантуру при отделе микробиологии и иммунологии в Центральном НИИ медицинской радиологии Минздрава СССР в период с 1957 по 1960 год, а после ее окончания в 1961 году защитил кандидатскую диссертацию. По окончании аспирантуры был направлен в научную командировку, где стажировался в г. Париже (Франция) по иммунохимии, биохимии и молекулярной биологии в Институте Пастера под руководством профессора Грабаря П., в Институте биологической физики и химии под руководством профессора Грюнберг-Монаго М. (в последующем — президент французской Академии наук), а также в Институте радиологии, основанном Кюри.

В 1963-1970 гг. руководил организованной им лабораторией радиационной иммунологии в Институте медицинской радиологии АМН СССР (г. Обнинск).

Доктор медицинских наук (1969). Профессор (1972).

В 1970-1979 гг. — заведующий кафедрой микробиологии и микологии в Ленинградском институте усовершенствования врачей им. С.М. Кирова МЗ СССР, в 1975-1979 гг. являлся ректором этого института и одновременно (1977-1979) — руководителем отдела общей и прикладной иммунологии.

В 1979-1983 гг. организовал и возглавил первый в нашей стране Институт иммунологии АМН СССР и одновременно заведовал лабораторией биохимии и биофизики антигенов.

Член-корреспондент АМН СССР (1982).

В связи с передачей Института иммунологии из подчинения АМН СССР в 3-й главк МЗ СССР Кашкин К.П. был переведен на работу заместителем директора по науке Института эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи АМН СССР, где работал в 1983-1986 гг.

Академик АМН СССР (1986).

Академик РАН (2013) (в рамках присоединения РАМН и РАСХН к РАН).

В 1986-1988 гг. — ректор Московского Центрального института усовершенствования врачей МЗ СССР, ныне РМАНПО МЗ РФ.

С 1986 года по 2016 год — заведующий организованной им кафедрой иммунологии в РМАНПО МЗ РФ.

С 2016 года по настоящее время почетный заведующий кафедрой РМАНПО МЗ РФ, профессор кафедры иммунологии РМАНПО МЗ РФ.

Кандидатская диссертация Кашкина К.П. была посвящена изучению возможности повышения радиорезистентности микробных клеток при искусственном и естественном их культивировании в условиях повышенного уровня ионизирующей радиации. Впервые в нашей стране ему удалось экспериментально доказать возможность искусственного повышения радиорезистентности клеток и охарактеризовать некоторые молекулярно-биохимические механизмы ее обеспечивающие.

Дальнейшие научные разработки Кашкина К.П. посвящены вопросам общей, инфекционной иммунологии и иммунохимии. Основные достижения связаны с проведением сравнительного иммунохимического изучения антигенного спектра клеток различных органов и тканей организма в норме и при лучевом повреждении, и на этой основе им разработана иммунохимическая классификация тканевых антигенов, построена карта их распределения в клетках разных органов, имеющая важное значение для изучения биохимических процессов клеточной дифференцировки и иммунохимических механизмов развития разнообразных патологических процессов. Проанализировано происхождение некоторых сывороточных белков и участие клеток разных органов в их биосинтезе и катаболизме.

Важным вкладом в учение о противои инфекционном иммунитете являются результаты его работ с соавторами по исследованию разнообразных факторов патогенности возбудителей ряда микотических и бактериальных инфекций, анализу природы нарушений иммунитета на разных этапах инфекционного процесса, а также выяснению участия клеточных и гуморальных специфических и неспецифических механизмов иммунитета в обеспечении резистентности к заражению и выздоровления при этих заболеваниях. Приоритетными являются работы лаборатории Кашкина К.П. по конструированию высокоиммуногенных препаратов на основе липосом, несущих наряду с антигенами различные природные и специфические иммуномодуляторы.

Профессор Кашкин К.П. внес значительный вклад в организацию подготовки в нашей стране квалифицированных врачей-иммунологов. Под его руководством еще в период работы на кафедре Ленинградского ГИДУВа была впервые в стране разработана программа усовершенствования врачей-иммунологов и начали проводиться курсы повышения квалификации врачей по иммунологии.

В настоящее время в своей научной деятельности Кашкин К.П. сосредоточен на стремительно развивающихся направлениях иммунологии — молекулярных основах передачи сигналов в иммунной системе посредством многообразных поверхностных и внутриклеточных рецепторов, в системе врожденного и приобретенного иммунитета.

Кашкин К.П. является автором более 200 печатных работ, в том числе учебников и монографий, включая типовой вузовский учебник, два руководства для практических врачей и несколько учебных пособий по различным вопросам общей и прикладной иммунологии и иммунохимии. Имеет 4 авторских свидетельства на изобретение.

Под руководством Кашкина К.П. подготовлены 4 докторские и 16 кандидатских диссертаций.

Кашкин К.П. был членом редакционной коллегии журнала «Иммунология», «Аллергология», редактором редакционного отдела «Иммунология» издания Большой медицинской энциклопедии. По настоящее время является членом редколлегии журнала «Медицинская иммунология».

Профессор Кашкин К.П. в течение многих лет был членом Научного совета по иммунологии АМН СССР, Экспертного совета по теоретической и прикладной иммунологии АМН СССР, Экспертного совета по теоретической и прикладной иммунологии, членом бюро Президиума и заместителем председателя Ученого медицинского совета МЗ СССР, главным аллергологом-иммунологом МЗ СССР, членом Научного совета по социально-экономическому развитию СССР при АН СССР и Государственного комитета СССР по науке и технике.

Длительное время был председателем диссертационного совета по специальности «клиническая иммунология и аллергология», «клиническая лабораторная диагностика» в РМАНПО МЗ РФ.

В последующем он являлся членом Правления Всероссийского общества иммунологов, членом Правления Российского общества лабораторных работников, почетным членом Международного общества микологов.

За выдающиеся заслуги в развитии отечественной науки Кашкин К.П. был неоднократно отмечен различными государственными и ведомственными наградами.

Редакционная коллегия журнала «Медицинская иммунология», коллеги, ученики поздравляют Кирилла Павловича Кашкина с юбилеем, желают ему здоровья, счастья и новых творческих успехов.

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

Алексеева А.А.	99	Здзитовецкий Д.Э.	77	Перепечай Я.И.	157	Тотолян Арег А.	107
Арсентьева Н.А.	107	Казимирский А.Н.	99	Петренко Т.И.	129	Труфакин В.А.	129
Баженов Д.О.	21	Казыгашева Е.В.	39	Петрова М.М.	141	Трушина Е.Ю.	89
Баранова Н.И.	89	Калиновская Н.Ю.	121	Петяева А.В.	171	Уразова О.И.	149
Барило А.А.	69	Караулов А.В.	59	Попова Т.Е.	141	Федоткина Т.В.	171
Бармина С.Э.	149	Каспаров Э.В.	157	Порядин Г.В.	99	Фомичева Е.Е.	9
Басина В.В.	107	Киселевский М.В.	59	Раев М.Б.	49	Хазиахматова О.Г.	49
Бацунов О.К.	107	Колесникова О.В.	129	Савченко А.А.	77	Храмцов П.В.	49
Безрученко Н.В.	165	Колпакова Т.А.	129	Салмаси Ж.М.	99	Чикилева И.О.	59
Беляев В.С.	157	Корнева Е.А.	171	Самойленко И.В.	59	Чурилов Л.П.	171
Белякова К.Л.	21	Костина Е.М.	89	Свитич О.А.	99	Чурина Е.Г.	149
Борисов А.Г.	77	Кривцов А.В.	137	Сельков С.А.	21	Шанин С.Н.	9
Бочкова М.С.	49	Литвинова Л.С.	49	Семенов А.В.	107	Шенфельд И.	171
Брагвадзе Б.Г.	99	Любимова Н.Е.	107	Серебряная Н.Б.	9	Ширинский В.С.	39, 121
Ганковская Л.В.	99	Мазунина А.А.	165	Ситникова А.В.	149	Ширинский И.В.	39, 121
Ганковский В.А.	99	Медведев А.Ю.	77	Смирнова О.В.	157	Шнайдер Н.А.	141
Гвоздев И.И.	77	Михайлова В.А.	21	Смирнова С.В.	69	Шубина И.Ж.	59
Греченко В.В.	99	Молотилова Б.А.	89	Смоляникова М.В.	69	Эсауленко Е.В.	107
Гусельников М.А.	165	Намазова-Баранова Л.С.	99	Соколов Д.И.	21	Юрова К.А.	49
Дианова Д.Г.	137	Недоспасов С.А.	7	Старкова К.Г.	137, 165	Якуцени П.П.	9
Долгих О.В.	137, 165	Несытых А.А.	157	Таппахов А.А.	141		
Зайцева Н.В.	137	Новицкий В.В.	149	Тимганова В.П.	49		
Заморина С.А.	49	Отавина Е.А.	137, 165	Типикин В.А.	89		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

активация макрофагов	172	лимфоциты	10	Т-регуляторы	172
активность ферментов	78	маркеры гиперчувствительности	166	ТБГ	50
активные формы кислорода	78	метаболизм	78	тормозные рецепторы лимфоцитов	172
аллельный полиморфизм генов	150	микробиота	172	транскрипционные факторы	22
альтернативный сплайсинг	50	моноциты	10	тромбоциты	10
алюминий	166	наивные Т-клетки	50	трофобласт	22
анализ ассоциаций	141	натуральные киллеры CD16 ⁺	129	туберкулез легких	129, 150
антимикробные белки	10	нейтрофилы	10, 78	фагоцитоз	129
антистрессовая терапия	129	нейтрофильный тип воспаления	90	фенофибрат	121
апоптоз	137	ниволумаб	60	фиброз	108
аутоиммунитет	172	однонуклеотидные полиморфизмы	141	функция	78
аутоотолерантность	172	остеоартрит	39	хемилюминесценция	78
бронхиальная астма	99	ОФВ ₁	90	хемокины	10, 108
внутриклеточные мессенджеры	22	панкреатит	78	ХОБЛ	90
воспаление	39	плейотропный эффект	121	хроническая обструктивная болезнь	
врожденный иммунитет	172	полости распада в легких	129	легких	90
ген <i>IL1B</i>	141	предиктор исхода терапии	108	цитокины	70, 90, 166
ген <i>Rtrgc</i>	50	презентация антигенов	172	экспериментальное моделирование	137
генетика	141	провоспалительные цитокины	99, 150	экспрессия гена	99
гепатит С	108	простагландины	166	эозинофильный тип воспаления	90
дендритные клетки	10	противовирусная терапия	108	CD25	50
децидуальные НК-клетки	22	противовоспалительные средства	39	CD28	50
лифференцировка	22	противоопухолевый иммунитет	172	CD45R0	50
иммунная память	50	проточная цитометрия	137	CD45RA	50
иммунная система	39, 129	ПС-ХВДП	141	CTLA-4	60
иммунные чек-пойнты	60	псориаз	70	CTL CXCR3 ⁺	108
иммунный ответ	150	псориатическая болезнь	70	DAS28	121
иммунный статус	137	псориатический артрит	70	IFN γ	150
иммунопатогенез	70	рак прямой кишки	158	IL-1 β	141
иммунотерапия опухолей	60	ревматоидный артрит	121	IL-2	50, 150
ингибиторные иммунные рецепторы	60	респираторный взрыв	78	MIP-3 α	108
индуцированная хемилюминесцентная		симвастатин	121	NK-клетки	22
активность нейтрофильные		синовальная оболочка	39	NK CXCR3 ⁺	108
гранулоциты	158	специфические антитела	166	PD-1	60
интерлейкины	172	спонтанная хемилюминесцентная		TLR2	99
ипилиумаб	60	активность	158	TLR4	99
клеточный маркер	137	стабильный стронций	137	TLR9	99
лейкотриены	166	степень тяжести	78	TNF α	108, 150
лимфоидные клетки врожденного		субпопуляции лимфоцитов	172		
иммунитета	22	Т-клетки памяти	50		