

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

Том 21, № 2. С. 195-372

2019

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

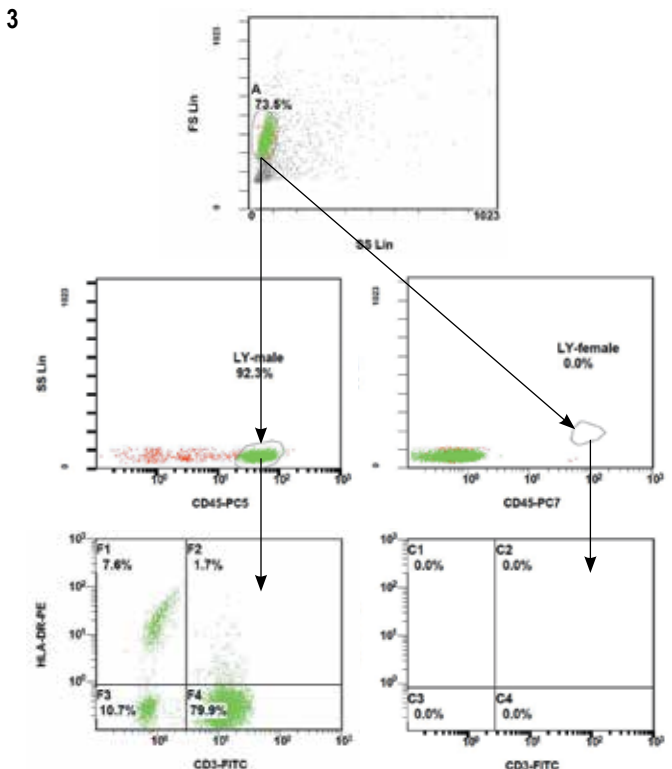
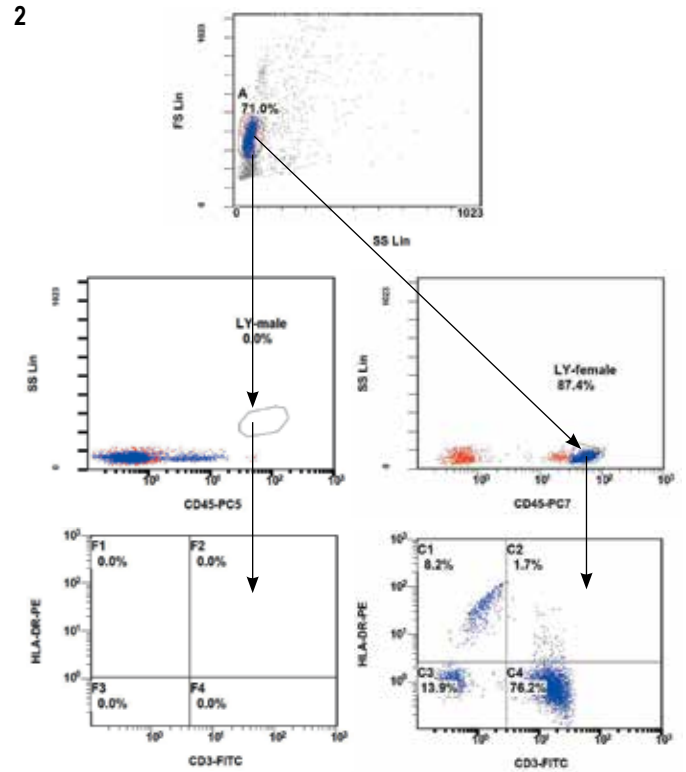
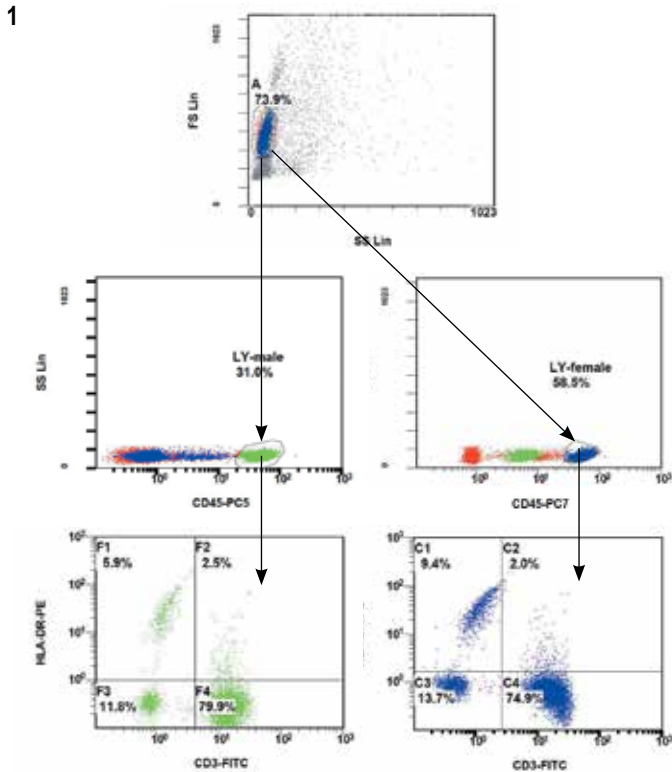


Рисунок 1. Смешанная культура лимфоцитов супругов, где первично по SSL/FSL гейтированы все лимфоциты, участвующие в СКЛ, далее они разделены на мужские (SSL/CD45-PC5) и женские (SSL/CD45-PC7), в которых проведена оценка субпопуляций CD3⁺/HLA-DR⁺ и CD3⁺/HLA-DR⁺

Figure 1. The mixed culture of the lymphocytes of the spouses, where all the lymphocytes participating in the SCL are firstly SSL/FSL gated, then they are divided into male (SSL/CD45-PC5) and female (SSL/CD45-PC7), in which CD3⁺/HLA-DR⁺ subpopulations and CD3⁺/HLA-DR⁺

Рисунок 2. Спонтанная культура лимфоцитов женщины, где первично по SSL/FSL гейтированы все лимфоциты, далее они разделены по тому же протоколу, что и СКЛ, на мужские (SSL/CD45-PC5) и женские (SSL/CD45-PC7)

Примечание. В спонтанной культуре нет мужских лимфоцитов и проведена оценка субпопуляций женских CD3⁺/HLA-DR⁺ и CD3⁺/HLA-DR⁺.

Figure 2. The spontaneous culture of the lymphocytes of the woman, where all the lymphocytes are primary on SSL/FSL, are further separated according to the same protocol as the SCL for male (SSL/CD45-PC5) and female (SSL/CD45-PC7)

Note. In spontaneous culture, there are no male lymphocytes and an estimate of the subpopulations of female CD3⁺/HLA-DR⁺ and CD3⁺/HLA-DR⁺.

Рисунок 3. Спонтанная культура лимфоцитов мужчины, где первично по SSL/FSL гейтированы все лимфоциты, далее они разделены по тому же протоколу, что и СКЛ, на мужские (SSL/CD45-PC5) и женские (SSL/CD45-PC7)

Примечание. В спонтанной культуре нет женских лимфоцитов и проведена оценка субпопуляций мужских CD3⁺/HLA-DR⁺ и CD3⁺/HLA-DR⁺.

Figure 3. The spontaneous culture of the lymphocytes of the male, where all the lymphocytes are primary on SSL/FSL, are further separated according to the same protocol as the MLC for males (SSL/CD45-PC5) and female (SSL/CD45-PC7)

Note. In a spontaneous culture, there are no female lymphocytes and the subpopulations of male CD3⁺/HLA-DR⁺ and CD3⁺/HLA-DR⁺ were assessed.

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

март-апрель

2019, том 21

№ 2

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 19.04.2019 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 22,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 951

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

March-April

2019, volume 21

No. 2

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, Malyyi ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 19.04.2019. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 22,25. 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

Обзоры

- Ганковская Л.В., Понасенко О.А., Свитиц О.А.
РОЛЬ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА 70 В ПАТОГЕНЕЗЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ 201
- Сенников С.В., Альшеевская А.А., Жукова Ю.В., Беломестнова И.А., Караулов А.В., Лопатникова Ю.А.
ПЛОТНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ К ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫМ МЕДИАТОРАМ КАК МОДУЛИРУЮЩИЙ КОМПОНЕНТ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МЕДИАТОРОВ НА КЛЕТКУ (ЧАСТЬ 1) 209
- Непомнящих Т.С., Гаврилова Е.В., Максютков Р.А.
НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛЛО- И КСЕНОГРАФТНЫХ МОДЕЛЕЙ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ПРОТИВОРАКОВЫХ
ВАКЦИН И ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ 221

Оригинальные статьи

- Шнайдер М.А., Ширинский В.С., Калиновская Н.Ю., Ширинский И.В.
ПРОДУКЦИЯ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ СИНОВИАЛЬНЫМИ ФИБРОБЛАСТАМИ БОЛЬНЫХ
РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ *IN VITRO* ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МОДУЛЯТОРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК: ПОИСКОВОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ 231
- Хворостухина Н.Ф., Новичков Д.А.
ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ЦИТОКИНОВ И ПЛАЦЕНТАРНАЯ ДИСФУНКЦИЯ У БЕРЕМЕННЫХ С ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ 239
- Овсепян Л.М., Казарян Г.С., Зангинян А.В., Захарян Г.В.
АНАЛИЗ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ Т-КЛЕТОК И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ИНСУЛЬТЕ 251
- Васильева Е.Ф., Секирина Т.П., Сарманова З.В., Зозуля С.А., Омельченко М.А., Ключник Т.П.
ОЦЕНКА УРОВНЯ СУБПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ CD14⁺CD16⁺ У БОЛЬНЫХ ЮНОШЕСКИМИ ДЕПРЕССИЯМИ 257
- Старшинова А.А., Истомина Е.В., Зинченко Ю.С., Филатов М.В., Ланда С.Б., Бурдаков В.С., Беляева Е.Н.,
Назаренко М.М., Сапожникова Н.В., Яблонский П.К.
ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ В ОПРЕДЕЛЕНИИ АКТИВНОСТИ
ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ 269
- Шабалдин А.В., Шмелевич С.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Лукьянычева Е.Б., Горшкова С.В., Шабалдина Е.В.
ОСОБЕННОСТИ АЛЛОГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В КРАТКОСРОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ СУПРУГОВ,
ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА ИЛИ РАННИЕ РЕПРОДУКТИВНЫЕ ПОТЕРИ 279
- Карзакова Л.М., Мучукова О.М., Борисова Л.В., Кудряшов С.И.
СВЯЗЬ HLA-ГАПЛОТИПОВ С РАЗВИТИЕМ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ В УСЛОВИЯХ
КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА 293
- Филиппова Ю.Ю., Нохрин Д.Ю., Бурмистрова А.Л.
МЕТОД ИММУНОСИГНАТУРЫ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА:
ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 303
- Аляхнович Н.С., Новиков Д.К.
КРАСИТЕЛИ В ЛЕКАРСТВАХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ 313
- Чурюкина Э.В., Сизякина Л.П.
СИСТЕМНАЯ ЭНЗИМОТЕРАПИЯ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ 323

Краткие сообщения

- Гусева В.И., Лапин С.В., Маслянский А.Л., Мячикова В.Ю., Чухловин А.Б., Иванова Н.Е., Ткаченко О.Ю.,
Блинова Т.В., Тотолян Арег А.
КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ ЛОКУСА HLA-DRB1 ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ 333
- Захарова Н.Б., Пастушкова Л.Х., Лях Р.В., Понукалин А.Н., Вараксин Н.А., Офицеров В.И., Кононихин А.С.,
Ларина И.М., Николаев Е.Н.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕЧНОЙ ПАРЕНХИМЫ В МОЧЕ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ
ПИЕЛОНЕФРИТОМ МЕТОДАМИ ИФА И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ 341

Иммунологические методы

- Емельянова О.И., Гонтарь И.П., Русанова О.А., Зборовская И.А.
ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ 351

Дневник иммунолога 359

Правила для авторов 369

Авторский указатель 372

Предметный указатель 372

CONTENTS

Reviews

<i>Gankovskaya L.V., Ponasenkov O.A., Svitich O.A.</i> ROLE OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 IN PATHOGENESIS OF CARDIOVASCULAR PATHOLOGY.....	201
<i>Sennikov S.V., Alshevskaya A.A., Zhukova Yu.V., Belomestnova I.A., Karaulov A.V., Lopatnikova Yu.A.</i> EXPRESSION DENSITY OF RECEPTORS FOR IMMUNOREGULATORY MEDIATORS AS A MODULATORY COMPONENT OF BIOLOGICAL EFFECTS OF MEDIATORS UPON CELLS (PART 1).....	209
<i>Nepomnyashchikh T.S., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A.</i> SOME APPLICATIONS OF ALLO- AND XENOGRFT MODELS FOR DEVELOPING NOVEL ANTI-CANCER VACCINES AND ONCOLYTIC VIRUSES.....	221

Original articles

<i>Shnayder M.A., Shirinsky V.S., Kalinovskaya N.Yu., Shirinsky I.V.</i> IN VITRO PRODUCTION OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES BY SYNOVIAL FIBROBLASTS OF THE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS WHEN USING DNA METHYLATION MODULATORS: A PILOT STUDY	231
<i>Khvorostukhina N.F., Novichkov D.A.</i> FEATURES OF THE CYTOKINE SYNTHESIS OF AND PLACENTAL DYSFUNCTION IN PREGNANT WOMEN WITH ACUTE PANCREATITIS	239
<i>Ossepyan L.M., Kazaryan G.S., Zanginyan A.V., Zakharyan G.V.</i> ANALYSIS OF THE EXPRESSION LEVEL OF T CELL GENES AND OXIDATIVE PROCESSES IN STROKE	251
<i>Vasilyeva E.F., Sekirina T.P., Sarmanova Z.V., Zozulya S.A., Omelchenko M.A., Klyushnik T.P.</i> ESTIMATION OF CD14 ⁺ CD16 ⁺ MONOCYTE SUBPOPULATION LEVELS IN PATIENTS WITH JUVENILE DEPRESSIONS	257
<i>Starshinova A.A., Istomina E.V., Zinchenko Yu.S., Filatov M.V., Landa S.B., Burdakov V.S., Belyaeva E.N., Nazarenko M.M., Sapozhnikova N.V., Yablonkiy P.K.</i> DIAGNOSTIC VALUE OF SPECIFIC IMMUNE COMPLEXES IN DETECTION OF ACTIVE TUBERCULOSIS INFECTION	269
<i>Shabaldin A.V., Shmulevich S.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Lukoyanycheva E.B., Gorshkova S.V., Shabaldina E.V.</i> CHARACTERISTICS OF ALLOGENEIC INTERACTIONS IN THE SHORT-TERM CULTURES OF LYMPHOCYTES FROM THE PARENTS OF CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DISEASE OR EARLY REPRODUCTIVE LOSS.....	279
<i>Karzakova L.M., Muchukova O.M., Borisova L.V., Kudryashov S.I.</i> ASSOCIATION BETWEEN HLA HAPLOTYPES AND RISK OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE UNDER THE CONDITIONS OF THE SILICON MANUFACTURING FACILITY	293
<i>Filippova Yu.Yu., Nokhrin D.Yu., Burmistrova A.L.</i> IMMUNOSIGNATURE APPROACH TO DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS: A PILOT STUDY	303
<i>Aliakhnovich N.S., Novikov D.K.</i> DYES IN FOOD AND DRUGS ARE POTENTIAL IMMUNOMODULATORS	313
<i>Churyukina E.V., Sizyakina L.P.</i> SYSTEMIC ENZYME THERAPY IN COMPLEX TREATMENT OF PATIENTS WITH SEVERE BRONCHIAL ASTHMA.....	323

Short communications

<i>Guseva V.I., Lapin S.V., Maslyansky A.L., Myachikova V.Yu., Chukhlov A.B., Ivanova N.E., Tkachenko O.Yu., Blinova T.V., Totolian Areg A.</i> CLINICAL IMPORTANCE OF HLA-DRB1 GENE LOCI DETECTION IN RHEUMATOID ARTHRITIS	333
<i>Zakharova N.B., Pastushkova L.Kh., Lyakh R.V., Ponukalin A.N., Varaksin N.A., Ofitserov V.I., Kononikhin A.S., Larina I.M., Nikolaev E.N.</i> RENAL PARENCHYMAL DAMAGE: IDENTIFICATION OF URINARY BIOMARKERS IN THE PATIENTS WITH CHRONIC PYELONEPHRITIS BY MEANS OF ELISA AND MASS SPECTROMETRY TECHNIQUES	341

Immunological methods

<i>Emelyanova O.I., Gontar I.P., Rusanova O.A., Zborovskaya I.A.</i> DIAGNOSTIC VALUE OF CERULOPLASMIN IN SYSTEMIC SCLERODERMA	351
---	-----

Chronicle	359
-----------------	-----

Instructions to Authors	369
-------------------------------	-----

Author index	372
--------------------	-----

Subject index.....	372
--------------------	-----

РОЛЬ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 В ПАТОГЕНЕЗЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ

Ганковская Л.В.¹, Понасенко О.А.¹, Свитич О.А.^{1, 2}

¹ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва,
Россия

Резюме. Проблема изучения сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) на протяжении долгого времени остается чрезвычайно важной, и поэтому существует множество работ, в которых предлагают новые способы диагностики и терапии данной группы заболеваний. Большие возможности дает изучение молекулярных взаимодействий для более точного понимания патогенеза сердечно-сосудистой патологии. Множество исследований в последнее время посвящено поиску маркеров риска развития ССЗ с целью более точной и ранней диагностики. В данной работе проведен анализ последних литературных данных, посвященных роли белка теплового шока 70 (HSP70) в сердечно-сосудистой патологии. Рассматривается его участие в таких процессах, как артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, атеросклероз. В атерогенезе большую роль играют сывороточные белки теплового шока 70. Доказано, что у пациентов с большой концентрацией циркулирующих в крови молекул белков теплового шока наблюдались увеличенные значения толщины комплекса интима-медиа сонных артерий. Отмечена важная роль антител к циркулирующим HSP70. Найдена ассоциация высоких уровней данных антител с атеросклерозом у пациентов с артериальной гипертензией в анамнезе, с инфарктом миокарда. Низкие уровни анти-HSP70-антител наблюдаются у пациентов с острым коронарным синдромом. Это доказывает сложность механизма и двоякую роль антител против сывороточных белков теплового шока 70. Таким образом, антитела против белков теплового шока 70 могут оцениваться как протективный маркер, так же как и предикторный, что требует дальнейшего изучения вопроса, а сами молекулы HSP70 могут каким-либо образом участвовать в развитии сердечно-сосудистых патологий. Большое внимание уделено роли воспалительного процесса и механизмам врожденного иммунитета при ССЗ. Так как в настоящее время считается, что эндогенные сигналы опасности (Danger-associated molecular patterns – DAMPs) вовлечены в патогенез этих патологий в контексте модели «опасности/повреждения». Согласно этой модели, пусковым фактором является стрессовое воздействие, ведущее к высвобождению DAMPs и их связыванию с рецепторами врожденного иммунитета – Toll-like receptors (TLRs). Активация TLRs запускает в клетке сигнальный каскад, ведущий к синтезу провоспалительных цитокинов. Это способствует развитию воспаления, которое может провоцировать появление новых патологических процессов в организме и ухудшать течение уже имеющихся заболеваний. Выявление новых потенциальных маркеров и знание молекулярных механизмов патогенеза ССЗ могут сыграть важную роль при разработке нового индивидуального подхода к профилактике сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов.

Ключевые слова: белок теплового шока, сердечно-сосудистые заболевания, артериальная гипертензия, воспаление, атеросклероз, иммунные механизмы

Адрес для переписки:

Понасенко Ольга Анатольевна
ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ
142115, Россия, г. Подольск, ул. Филиппова, 4а/46.
Тел.: 8 (925) 275-65-86
E-mail: ponasenko.oa@gmail.com

Address for correspondence:

Ponasenko Olga A.
N. Pirogov Russian National Research Medical University
142115, Russian Federation, Podolsk, Filippova str., 4a/46.
Phone: 7 (925) 275-65-86.
E-mail: ponasenko.oa@gmail.com

Образец цитирования:

Л.В. Ганковская, О.А. Понасенко, О.А. Свитич «Роль
белка теплового шока 70 в патогенезе сердечно-
сосудистой патологии» // Медицинская иммунология,
2019. Т. 21, № 2. С. 201–208.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-201-208
© Ганковская Л.В. и соавт., 2019

For citation:

L.V. Gankovskaya, O.A. Ponasenko, O.A. Svitich “Role
of heat shock protein 70 in pathogenesis of cardiovascular
pathology”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 201–208.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-201-208
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-201-208

ROLE OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 IN PATHOGENESIS OF CARDIOVASCULAR PATHOLOGY

Gankovskaya L.V.^a, Ponasenko O.A.^a, Svitich O.A.^{a, b}

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

^b I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. The problem of studying cardiovascular diseases (CVD) for a long time remains extremely important, and, therefore, there are many works that offer new ways to diagnose and treat this group of diseases. Great opportunities are provided by the study of molecular interactions for a more accurate understanding of the pathogenesis of cardiovascular pathology. Many studies have recently been devoted to finding potential markers of CVD risk with the aim of more accurate and early diagnosis. In this review we analyze the latest literature data dedicated to the role of heat shock protein 70 (HSP70) in cardiovascular pathology. HSP70 take part in such processes as arterial hypertension, coronary heart disease, and atherosclerosis. In atherogenesis, serum heat shock proteins 70 play a major role. It has been proven that in patients with a high concentration of heat shock protein molecules circulating in the blood, increased values of the carotid intima-media complex were observed. The important role of antibodies to circulating HSP70 is noted. Found an association of high levels of these antibodies with atherosclerosis in patients with arterial hypertension in history, with myocardial infarction. Low levels of anti-HSP70 antibodies are observed in patients with acute coronary syndrome. This proves the complexity of the mechanism and the dual role of antibodies against serum heat shock proteins 70. Thus, antibodies against heat shock proteins 70 can be assessed as a protective marker, and as a predictor, which requires further study, and the HSP70 molecules themselves can somehow to participate in the development of cardiovascular pathologies. Much attention is paid to the role of the inflammatory process and the mechanisms of innate immunity in CVD. As it is currently believed that Danger-associated molecular patterns (DAMPs) are involved in the pathogenesis of these pathologies in the context of a “hazard/damage” model. According to this model, the triggering factor is stress, leading to the release of DAMPs and their binding to innate immunity receptors - Toll-like receptors (TLRs). Activation of TLRs triggers the signaling cascade in the cell leading to the synthesis of pro-inflammatory cytokines. This contributes to the development of inflammation, which can provoke the emergence of new pathological processes in the body and worsen the course of existing diseases. The identification of new potential markers and knowledge of the molecular mechanisms of the pathogenesis of CVD can play an important role in the development of a new individual approach to the prevention of cardiovascular diseases.

Keywords: heat shock protein, cardiovascular diseases, arterial hypertension, inflammation, atherosclerosis, immune mechanisms

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире. Наблюдается высокая смертность от ССЗ как в развитых, так и развивающихся странах [1, 3]. Поэтому проблема высокой распространенности ССЗ среди взрослого населения является одной из важнейших на сегодняшний день и требует детального изучения и поиска новых способов ранней диагностики этих заболеваний.

В настоящее время активно изучается роль врожденного иммунитета в патогенезе сердечно-сосудистой патологии, ведь ССЗ — в основном мультифакториальные заболевания, влияние на которые оказывают многие факторы, в том числе и иммунная система [12, 26]. Большие возможности дает изучение молекулы БТШ70.

БТШ — это белки, вырабатываемые в клетке при воздействии на нее стрессовых условий (гипертермия, гипоксия, свободные радикалы, тяжелые металлы, этанол, аналоги аминокислот) [6, 25]. Они функционируют как молекулярные шапероны, то есть обеспечивают правильную сборку белка, формирование его третичной структуры. Также участвуют в процессах транспорта протеинов в клеточные компартменты, контроле клеточного цикла, сигналинге, апоптозе [16]. БТШ классифицируются в зависимости от своей молекулярной массы, что отражается в их названии. Так, БТШ70 — обширное семейство белков массой 70 000 дальтон, главным образом отвечающих за защиту клетки, а также участвующих в презентации антигенов [10].

БТШ кодируются генами МНС класса III, находящимися в коротком плече шестой хромосомы человека (6p21.3). Существует три гена, кодирующих молекулы БТШ70: *HSP70-1 (HSPA1A)*,

HSP70-2 (HSPA1B) и *HSP70-hom (HSPA1L)*. *HSP70-1* и *HSP70-2* кодируют белок, синтезирующийся при тепловом шоке, то есть аномально высокой температуре, а *HSP70-hom* кодирует нечувствительную к тепловому шоку форму [17].

БТШ70 и его участие в основных ССЗ

Известно, что высокие уровни циркулирующих БТШ70 в крови пациентов коррелируют с основными маркерами воспаления и могут спровоцировать развитие сердечно-сосудистых заболеваний, например атеросклероза [27]. В 2003 году исследователи Rockley A. и соавт. опубликовали работу, посвященную роли сывороточных БТШ в атерогенезе. Полученные в результате данные показали, что циркулирующие уровни БТШ70 ассоциированы с развитием атеросклероза у пациентов с уже диагностированной гипертензией. Впоследствии авторами проводились дальнейшие исследования по изучению конкретного влияния молекул БТШ70 на прогрессирование атеросклероза в этой выборке [22]. Была произведена оценка уровня сывороточных БТШ70 у пациентов с атеросклерозом крупных сосудов. В качестве критерия наличия атеросклеротических бляшек были взяты средние значения толщины комплекса интима-медиа сонных артерий пациентов. В результате увеличенные значения толщины комплекса интима-медиа наблюдались у пациентов с высокими уровнями циркулирующих БТШ70. Интересно, что при оценке уровня циркулирующих БТШ60 у этих пациентов никаких зависимостей выявлено не было. Подобные работы были и у других авторов, которые высказали предположение, что ответ, установленный против бактериальных БТШ, приводит к аутоиммунной реакции, которая может спровоцировать вызванное комплементом эндотелиальное повреждение и, следовательно, ускорить формирование атеросклеротических бляшек в толще сосудов [7]. Cai W. и соавт. обнаружили, что Т-лимфоциты, присутствующие в крови мышей при экспериментально индуцированной солевой гипертензии, представляют собой CD4⁺ клоны на антиген белка 70 теплового шока, который исследователи синтезировали, подобрав аминокислотную последовательность. Интересно, что у иммунорезистентных мышей развилось минимальное воспаление почек, и такие особи были защищены от развития гипертензии. В свою очередь, у мышей, сенсibilизированных к антигену БТШ70, развивалось увеличение артериального давления в ответ на диету с высоким содержанием соли [9]. Эти исследования позволяют назвать БТШ70 од-

ной из ключевых молекул, участвующих в развитии артериальной гипертензии.

Связь повышенного уровня экспрессии гена *HSP70* и высокого уровня артериального давления подтверждается и в исследованиях, посвященных изучению осложнений, возникающих в организме при беременности. Наиболее частым состоянием является преэклампсия беременных, характеризующаяся повышением уровня артериального давления, нарушением белкового обмена, неправильной работой многих систем организма. Получены данные, свидетельствующие о том, что повышенные уровни экспрессии гена *HSP70* наблюдались у пациенток с легкой и тяжелой степенью преэклампсии при беременности [15].

Наиболее опасным состоянием является обострение ИБС — период, называемый острым коронарным синдромом (ОКС) и включающий в себя следующие состояния: нестабильная стенокардия и инфаркт миокарда (ИМ) [17]. Исследователи Zhang X. и соавт. провели исследование ассоциации между уровнями циркулирующих БТШ70 и антител к БТШ70 с ОКС и стабильной стенокардией, а также проследили динамику изменения уровня антител к БТШ70 и внеклеточных БТШ70 у пациентов с ИМ. Выявлено увеличение уровня внеклеточных БТШ70 у пациентов с ОКС и стабильной стенокардией, в то время как антитела к БТШ70 у пациентов с ОКС были понижены. У пациентов с ИМ уровни БТШ70 быстро снижались по прошествии 1-7 дней после клинических проявлений ИМ, тогда как уровни антител против БТШ70 у этих пациентов, наоборот, увеличивались. Уровень БТШ70 был выше у пациентов с ОКС, чем со стабильной стенокардией. Авторы предполагают, что это различие можно объяснить тем, что при ОКС часто происходит разрыв атеросклеротических бляшек и, в связи с этим, высвобождение внутриклеточного БТШ70 в кровь. В то время как при стабильной стенокардии разрыв бляшек встречается гораздо реже [18]. Интересно, что при высвобождении БТШ70 в кровь наблюдается повышенная экспрессия маркеров активации иммунной системы, что позволяет предположить, что БТШ70 может запускать воспалительный процесс при развитии ССЗ [19].

Двоякая роль антител к БТШ70 в патогенезе ССЗ

В норме у каждого человека в крови присутствуют антитела к БТШ70, но их повышенный уровень также может быть маркером различных заболеваний, в том числе и ССЗ. Например, было выяснено, что высокие уровни антител против

циркулирующих БТШ70 были ассоциированы с атеросклерозом у пациентов с уже имеющейся артериальной гипертензией в анамнезе [21]. Но по данному вопросу имеются и противоречивые данные, что говорит о сложности вопроса и необходимости проведения дальнейших исследований. Известно, что риск возникновения ССЗ значительно повышен у пациентов с диабетом 1 типа в связи с высокой частотой развития микро- и макрососудистых осложнений. Поэтому Gruden G. и соавт. в исследовании “The EURODIAB Study” изучали, как антитела против БТШ60 и БТШ70 связаны с микро- и макрососудистыми осложнениями у пациентов с диабетом 1-го типа. Исследование проводилось на большой когорте пациентов (3250 случайно выбранных людей) с диабетом 1 типа. Авторы обнаружили обратную связь между уровнями антител против БТШ70 в сыворотке и диабетическими микро/макрососудистыми осложнениями — повышенный уровень данных антител наблюдался у пациентов контрольной группы. Это говорит о том, что антитела против БТШ70 могут быть протективным маркером при оценке риска возникновения микро- и макрососудистых осложнений, а сами молекулы БТШ70 могут каким-либо образом участвовать в развитии повреждения сосудов [13].

Сведения о протективных свойствах антител против БТШ70 подтверждаются во многих работах, посвященных изучению роли БТШ70 и антител к БТШ70 в таких сердечно-сосудистых заболеваниях, как ишемическая болезнь сердца (ИБС), стенокардия и инфаркт миокарда. Пациенты как со стабильной, так и с нестабильной стенокардией имели более низкие уровни IgG против БТШ70 по сравнению со здоровыми донорами [14]. Важно отметить, что при тяжелых проявлениях стенокардии пациенты именно с высоким содержанием антител к БТШ70 показывали лучшую выживаемость [29].

Воспалительный процесс и его роль в развитии ССЗ

Воспаление является критическим фактором при формировании атеросклероза и его прогрессирования, приводящего к серьезным последствиям для организма со стороны в основном сердечно-сосудистой системы. В настоящее время активно изучается роль иммунных клеток, участвующих в атерогенезе. Описываются модели хронических воспалительных заболеваний человека, которые могут помочь понять, что происходит в организме при ССЗ [28]. Известно, что повышенное АД может выступать в качестве фактора риска развития серьезных заболеваний, в особенности атеросклероза. Важную роль в отношении

связи гипертензии и атеросклероза играют клетки эндотелия сосудов. Эндотелий является активным внутренним слоем кровеносного сосуда. Он выполняет барьерную функцию, генерирует много факторов, которые регулируют тонус сосудистой стенки, пролиферацию гладкомышечных клеток, процессы трансэндотелиального диapedеза лейкоцитов, тромбоза и тромболизиса. Появляется все больше доказательств того, что функциональное нарушение эндотелия является одним из первых признаков развития атеросклероза и присутствует задолго до проявления клинических признаков данного заболевания. Поэтому понимание центральной роли эндотелия дает возможность раннего выявления атеросклероза, оценки сердечно-сосудистого риска и прогноза на выздоровление. Исходя из этого, многие авторы изучают клинические последствия дисфункции эндотелия, а также терапевтические проблемы эндотелиальной дисфункции при сердечно-сосудистых заболеваниях [20].

Было показано, что у пациентов с ССЗ в поврежденном эндотелии развивается комплекс событий, который и называется эндотелиальной дисфункцией. При этом запускаются механизмы, направленные на преобладание сосудосуживающих факторов и/или снижение продукции сосудорасширяющих факторов. Как только запускается процесс развития эндотелиальной дисфункции, стенка сосуда становится предрасположенной к сосудистым поражениям, воспалению, вазоконстрикции, тромбозу и, наконец, разрыву атеросклеротических бляшек. Важно отметить роль молекулы оксида азота NO в развитии каскада событий в поврежденном эндотелии. Известно, что при нормальной функции эндотелия NO, продуцируемый в ответ на стрессовое напряжение, вызывает расслабление гладких мышц сосудов, ингибирование апоптоза и ингибирование адгезии тромбоцитов или моноцитов. NO образует активные формы кислорода, усиливается продукция провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1), что запускает адгезию и миграцию лейкоцитов. Одновременно провоспалительные цитокины индуцируют экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках и лейкоцитах, таких как VCAM, ICAM, CCL2, E-селектин, P-селектин и IL-6, что способствует еще более активному развитию эндотелиальной дисфункции. Кроме того, эндотелиальная дисфункция — важный прогностический маркер сердечно-сосудистых заболеваний. Было обнаружено, что ингибирование воспалительных путей может препятствовать процессу развития гипертонии и эндотелиальной дисфункции прежде всего [5].

Взаимодействие БТШ70 с рецепторами врожденного иммунитета

Врожденный иммунитет может играть важную роль в развитии хронического воспаления при ССЗ, как одного из компонентов каскада, развивающегося при эндотелиальной дисфункции. Небольшое повышение артериального давления может приводить к появлению неоантигенов и ассоциированных с опасностью молекулярных структур (DAMPs) или патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMPs). Они могут активировать Toll-подобные рецепторы на клет-

ках, в том числе и на клетках сердечно-сосудистой системы [19].

Показано, что некоторые члены семейства БТШ, такие как БТШ60, БТШ70, БТШ90 и gp96, также могут напрямую стимулировать клетки врожденного иммунитета и, таким образом, действовать как «сигнальные молекулы». Это во многом напоминает эффект липополисахарида (ЛПС) — основного лиганда Toll-подобного рецептора 4 (Toll-like receptor 4 — TLR4). Еще намного ранее Wallin R. и соавт. изучали сходства и различия между ответами клеток при стимуля-

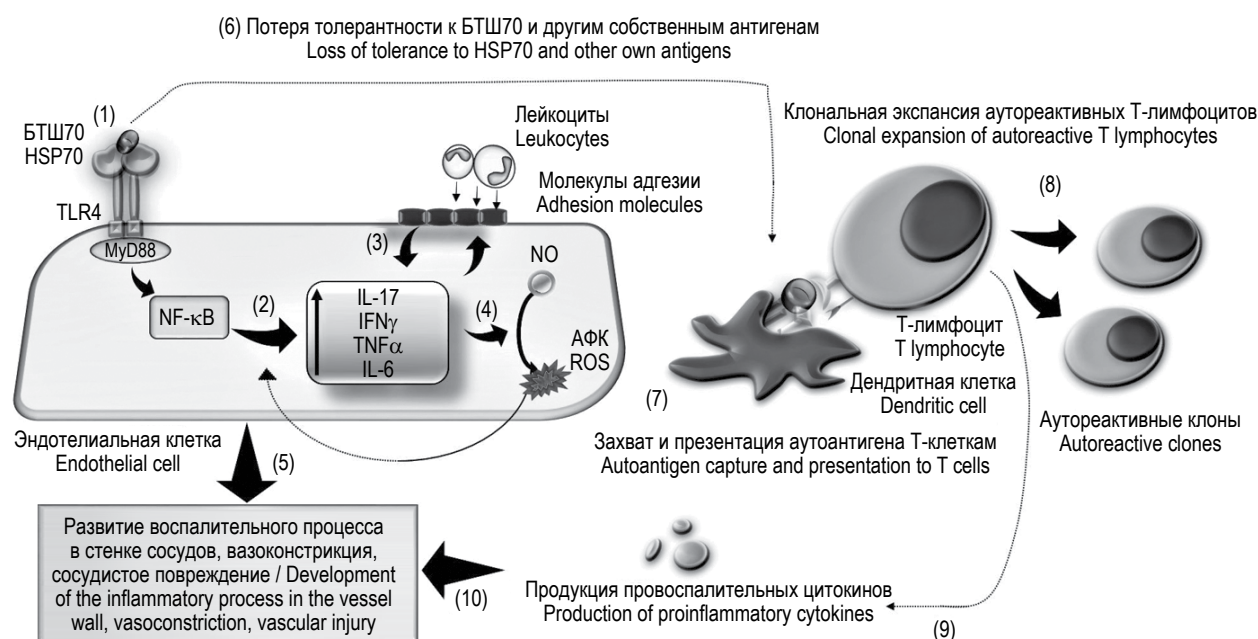


Рисунок 1. Участие БТШ70 в патогенезе ССЗ, адаптировано из [4, 32]

Примечание. БТШ70, являясь эндогенным лигандом TLR4, может запускать сигнальные каскады, которые способствуют вазоконстрикции, периферическому сопротивлению и повышению АД (1). При активации TLR4 запускается сигнальный каскад, ведущий к транскрипции генов, отвечающих за синтез провоспалительных цитокинов (2). Этот процесс может приводить к усилению экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках и лейкоцитах (3). Эти события в совокупности могут нарушать работу NO-синтазы, способствуя образованию из оксида азота (NO) активных форм кислорода (АФК), оказывающих повреждающее воздействие на клетку (4). Запускается процесс воспаления, который, совместно с действием АФК, способствует развитию дисфункции эндотелия и повреждениям стенки сосуда (5). С другой стороны, сосудистое повреждение могут вызывать и механизмы адаптивного иммунитета. Вышеперечисленные процессы в совокупности могут спровоцировать потерю толерантности организма к собственным антигенам (6), в том числе и БТШ70, что ведет к активации аутореактивных Т-клеток (7), пролиферации аутореактивных клонов (8) и продукции провоспалительных цитокинов Т-клеткой (9). В конечном итоге данные процессы приводят к повреждению сосудистой стенки и являются дополнительным фактором, ведущим к прогрессированию эндотелиальной дисфункции и развитию сердечно-сосудистых заболеваний (10).

Figure 1. HSP70 in the pathogenesis of CVD, adapted from [4, 32]

Note. HSP70, being an endogenous ligand of TLR4, can trigger signaling cascades that promote vasoconstriction, peripheral resistance, and increased blood pressure (1). When TLR4 is activated, the signaling cascade starts leading to the transcription of genes responsible for the synthesis of pro-inflammatory cytokines (2). This process can lead to an increase in the expression of adhesion molecules on endothelial cells and leukocytes (3). These events in aggregate can disrupt the operation of NO-synthase, promoting the formation of active oxygen species (ROS) from nitric oxide (NO), which have a damaging effect on the cell (4). The process of inflammation starts, which, together with the action of ROS, promotes the development of endothelial dysfunction and damage to the vessel wall (5). On the other hand, vascular damage can also be caused by mechanisms of adaptive immunity. The above listed processes together can provoke a loss of tolerance of the organism to its own antigens (6), including HSP70, leading to the activation of autoreactive T cells (7), the proliferation of autoreactive clones (8), and the production of pro-inflammatory cytokines by the T cell (9). Ultimately, these processes lead to damage to the vascular wall, and are an additional factor leading to the progression of endothelial dysfunction and the development of cardiovascular diseases (10).

ции их БТШ и ЛПС [30]. Таким образом, TLRs могут быть ключевым звеном между развитием сердечно-сосудистых заболеваний и иммунной системой. Многие работы посвящены изучению активации TLR и ее влиянию на развитие и прогрессирование атеросклероза, сердечной дисфункции при сепсисе, застойной сердечной недостаточности и других заболеваний сердечно-сосудистой системы. И уже многое известно об активации TLRs в клеточных компонентах сердечно-сосудистой системы, что помогает понимать, каким образом врожденный иммунитет участвует в развитии сердечно-сосудистых заболеваний [11].

В последнее время изучается роль TLRs в экспериментально смоделированном атеросклерозе. В целом TLR2 и TLR4 оказывают проатерогенное действие у мышей с повышенным уровнем ЛПНП. Этот факт может иметь важное значение и для человека, ведь гиперлипидемия – один из факторов риска многих ССЗ. Недавнее исследование также показало, что активация TLR4 способствовала росту АД, воспалению и увеличенной сосудистой сократимости у крыс с индуцированной артериальной гипертензией [8].

Новые данные свидетельствуют о том, что TLR4 и TLR2 широко экспрессируются в кровеносных сосудах человека, включая аорту и подключичную, каротидную, брыжеечную, подвздошную и височную артерии [24]. TLR4 может активироваться БТШ70, который является эндогенным лигандом для данного рецептора и в данном случае функционирует как эндогенная молекула опасности – DAMP [2]. Связывание БТШ70 с TLR4 ведет к запуску транскрипции генов, ответственных за синтез провоспалительных цитокинов [32]. Выделяющиеся провоспалительные цитокины, такие как IL-17, IFN γ , TNF α и IL-6, способствуют развитию дисфункции эндотелия и повреждениям, приводящим к усилению реабсорбции натрия, повышению системного сосудистого сопротивления и общему ухудшению течения сердечно-сосудистой патологии. При этом зачастую происходит подключение механизмов адаптивного иммунитета, что оказывает отрицательное влияние на общую картину течения заболевания. Повреждение сосудов является триггером для модификации собственных антигенов (аутоантигенов) человека и в конечном итоге может приводить к потере толерантности организма к собственным антигенам. В пределах вторичных лимфоидных органов с помощью дендритных клеток и В-лимфоцитов осуществляется презентация аутоантигенов Т-лимфоцитам. Интересно отметить, что молекула БТШ70 в настоящее время

рассматривается в качестве потенциального собственного тканевого антигена человека. Результатом презентации является активация аутореактивных лимфоцитов и их клональная экспансия, а также производство аутоантител в ответ на собственные антигены. Данные процессы в совокупности приводят к воспалению сосудистой стенки и ее ремоделированию, формируя порочный круг [4]. Терапевтические вмешательства, направленные на снижение воспаления при ССЗ, могут оказаться полезными и снизить риск повреждения конечных органов и предотвратить развитие серьезных патологий, включая инфаркт миокарда, сердечную недостаточность, почечную недостаточность и инсульт [31].

Ассоциация однонуклеотидных замен в генах HSP70 с некоторыми ССЗ

Немаловажным является изучение генов, кодирующих молекулу БТШ70, а именно однонуклеотидные замены, которые зачастую могут влиять на функционирование данного белка либо быть ассоциированы с некоторыми патологиями. Например, определенные однонуклеотидные замены способны влиять на уровень анти-HSP70-антител, которые обладают протективными свойствами в контексте развития сердечно-сосудистых осложнений. Так, Zhang X. и соавт. выяснили, что определенные аллельные варианты полиморфного маркера +190G/C в гене *HSPA1A* ассоциированы с повышенным риском развития острого коронарного синдрома у людей, имеющих отличающиеся от здоровых доноров уровни анти-HSP70-антител [33]. Также выяснена ассоциация конкретных аллельных вариантов полиморфного маркера +1267A/G гена *HSPA1B* с ожирением и выживаемостью пациентов при перитонеальном диализе. Определенные аллельные варианты чаще встречались у людей с высоким индексом массы тела, которые, несомненно, подвержены и сердечно-сосудистым заболеваниям [18]. В другой работе получены данные о том, что пятилетняя выживаемость без сердечно-сосудистых событий после перенесенной почечной патологии группы пациентов с генотипами GG и AG полиморфного маркера +1267A/G гена *HSPA1B* была значительно лучше, чем у группы с генотипами AA, что позволяет сделать вывод о возможной ассоциации аллельного варианта AA полиморфного маркера +1267A/G гена *HSPA1B* с наличием сердечно-сосудистых осложнений у пациентов [23].

Заключение

Таким образом, молекула БТШ70 обладает большим потенциалом для изучения и, несо-

менно, участвует в патогенезе сердечно-сосудистой патологии. Достаточно спорным остается вопрос о том, является ли повышение содержания внутриклеточного БТШ70 одним из причинных факторов или следствием некоторых ССЗ, а также существуют разные предположения авторов исследований о роли антител к БТШ70 и их свойствах. Несмотря на это, можно сказать, что БТШ70 участвует в воспалительных процессах при ССЗ, и предположить, что БТШ70 запускает провоспалительный каскад через активацию TLR4 и увеличение уровня его экспрессии, а так-

же определенные аллельные варианты при исследовании полиморфных маркеров гена HSP70 могут служить прогностическим признаком и быть ассоциированы с повышенным риском развития некоторых ССЗ. Поэтому необходимо продолжать исследования, посвященные взаимодействию белков теплового шока и рецепторов врожденного иммунитета и изучать их роль в патогенезе сердечно-сосудистой патологии, обращая внимание на экспрессионные и генетические маркеры многих молекул, участвующих в данном взаимодействии.

Список литературы / References

1. Искаков Е.Б. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний // Медицина и экология, 2017. № 2. С. 19-28. [Iskakov E.B. Epidemiology of cardiovascular diseases. *Meditina i ekologiya = Medicine and Ecology*, 2017, no. 2, pp. 19-28. (In Russ.)]
2. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 640 с. [Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R.Ya. Clinical immunology and allergology with the basics of general immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2011. 640 p.
3. Научно-организационный комитет проекта ЭССЕ-РФ. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России (ЭССЕ-РФ). Обоснование и дизайн исследования // Профилактическая медицина, 2013. Т. 16, № 6. С. 25-34. [Research organizing committee of the ESSE-RF project. Epidemiology of cardiovascular diseases in different regions of Russia (ESSE-RF). The rationale for and design of the study. *Profilakticheskaya meditsina = Preventive Medicine*, Vol. 16, no. 6, pp. 25-34. (In Russ.)]
4. Anders H.J., Baumann M., Tripepi G., Mallamaci F. Immunity in arterial hypertension: Associations or causalities? *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2015, Vol. 30, no. 12, pp. 1959-1964.
5. Barthelmes J., Nägele M.P., Ludovici V., Ruschitzka F., Sudano I., Flammer A.J. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease and Flammer syndrome-similarities and differences. *EPMA J.*, 2017, Vol. 8, no. 2, pp. 99-109.
6. Bernardo B.C., Weeks K.L., Patterson N.L., McMullen J.R. HSP70: therapeutic potential in acute and chronic cardiac disease settings. *Future Med. Chem.*, 2016, Vol. 8, no. 18, pp. 2177-2183.
7. Bielecka-Dabrowa A., Barylski M., Mikhailidis D.P., Rysz J., Banach M. HSP 70 and atherosclerosis – protector or activator? *Expert Opin. Ther. Targets*, 2009, Vol. 13, no. 3, pp. 307-317.
8. Bomfim G.F., dos Santos R.A., Oliveira M.A., Giachini F.R., Akamine E.H., Tostes R.C., Fortes Z.B., Webb R.C., Carvalho M.H.C. Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2012, Vol. 122, no. 11, pp. 535-543.
9. Cai W.-F., Zhang X.-W., Yan H.-M., Ma Y.-G., Wang X.-X., Yan J., Xin B.-M., Lv X.-X., Wang Q.-Q., Wang Z.-Y., Yang H.-Z., Hu Z.-W. Intracellular or extracellular heat shock protein 70 differentially regulates cardiac remodelling in pressure overload mice. *Cardiovasc. Res.*, 2010, Vol. 88, no. 1, pp. 140-149.
10. Chebotareva N., Bobkova I., Shilov E. Heat shock proteins and kidney disease: perspectives of HSP therapy. *Cell Stress and Chaperones*, 2017, Vol. 22, no. 3, pp. 319-343.
11. Frantz S., Ertl G., Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, 2007, Vol. 4, no. 8, pp. 444-454.
12. Gouloupoulou S., McCarthy C.G., Webb R.C. Toll-like receptors in the vascular system: Sensing the dangers within. *Pharmacol. Rev.*, 2015, Vol. 68, no. 1, pp. 142-167.
13. Gruden G., Bruno G., Chaturvedi N., Burt D., Pinach S., Schalkwijk C., Stehouwer C.D., Witte D.R., Fuller J.H., Cavallo-Perin P. ANTI-HSP60 and ANTI-HSP70 antibody levels and micro/ macrovascular complications in type 1 diabetes: The EURODIAB Study. *J. Intern. Med.*, 2009, Vol. 266, no. 6, pp. 527-536.
14. Herz I., Rosso R., Roth A., Keren G., George J. Serum levels of anti heat shock protein 70 antibodies in patients with stable and unstable angina pectoris. *Acute Card. Care*, 2006, Vol. 8, no. 1, pp. 46-50.
15. Hromadnikova I., Dvorakova L., Kotlabova K., Kestlerova A., Hympanova L., Novotna V., Doucha J., Krofta L. Circulating heat shock protein mRNA profile in gestational hypertension, pre-eclampsia & foetal growth restriction. *Indian J. Med. Res.*, 2016, Vol. 144, no. 2, p. 229.
16. Kim Y.E., Hipp M.S., Bracher A., Hayer-Hartl M., Ulrich Hartl F. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.*, 2013, Vol. 82, no. 1, pp. 323-355.

17. Li Y., Yu S., Gu G., Chen G., Zheng Y., Jiao J., Zhou W., Wu H., Zhang Z., Zhang H., He L., Yang Q., Xu X. Polymorphisms of heat shock protein 70 genes (HSPA1A, HSPA1B and HSPA1L) and susceptibility of noise-induced hearing loss in a Chinese population: A case-control study. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 2, pp. 1-12.
18. Mardan-Nik M., Pasdar A., Jamialahmadi K., Avan A., Mohebaty M., Esmaily H., Biabangard-Zak A., Afzal Javan F., Rivandi M., Ferns G.A., Ghayour-Mobarhan M. Association of heat shock protein70-2 (HSP70-2) gene polymorphism with obesity. *Ann. Hum. Biol.*, 2016, Vol. 43, no. 6, pp. 542-546.
19. Mian M.O.R., Paradis P., Schiffrin E.L. Innate immunity in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2014, Vol. 16, no. 2, p. 413.
20. Park K.-H., Park W.J. Endothelial dysfunction: Clinical implications in cardiovascular disease and therapeutic approaches. *J. Korean Med. Sci.*, 2015, Vol. 30, no. 9, p. 1213.
21. Pockley A.G., de Faire U., Kiessling R., Lemne C., Thulin T., Frostegård J. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension. *J. Hypertens.*, 2002, Vol. 20, no. 9, pp. 1815-1820.
22. Pockley A.G., Georgiades A., Thulin T., de Faire U., Frostegård J. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension*, 2003, Vol. 42, no. 3, pp. 235-238.
23. Poon P.Y.K., Szeto C.C., Kwan B.C.H., Chow K.M., Li P.K.T. Relationship between HSP70-2 A+1267G polymorphism and cardiovascular events of chinese peritoneal dialysis patients. *Nephron. Clin. Pract.*, 2014, Vol. 128, no. 1-2, pp. 153-158.
24. Pryshchep O., Ma-Krupa W., Younge B.R., Goronzy J.J., Weyand C.M. Vessel-specific toll-like receptor profiles in human medium and large arteries. *Circulation*, 2008, Vol. 118, no. 12, pp. 1276-1284.
25. Schlesinger M.J. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.*, 1990, Vol. 265, no. 21, pp. 12111-12114.
26. Sharma S., Garg I., Ashraf M.Z. TLR signalling and association of TLR polymorphism with cardiovascular diseases. *Vascul. Pharmacol.*, 2016, Vol. 87, pp. 30-37.
27. Srivastava K., Narang R., Bhatia J., Saluja D. Expression of heat shock protein 70 gene and its correlation with inflammatory markers in essential hypertension. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 3, pp. 1-15.
28. Teague H.L., Ahlman M.A., Alavi A., Wagner D.D., Lichtman A.H., Nahrendorf M., Swirski F.K., Nestle F., Gelfand J.M., Kaplan M.J., Grinspoon S., Ridker P.M., Newby D.E., Tawakol A., Fayad Z.A., Mehta N.N. Unraveling vascular inflammation: from immunology to imaging. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2017, Vol. 70, no. 11, pp. 1403-1412.
29. Vogt S., Portig I., Kusch B., Pankuweit S., Sirat A.S., Troitzsch D., Maisch B., Moosdorf R. Detection of anti-hsp70 immunoglobulin G antibodies indicates better outcome in coronary artery bypass grafting patients suffering from severe preoperative angina. *Ann. Thorac. Surg.*, 2004, Vol. 78, no. 3, pp. 883-889.
30. Wallin R.P.A., Lundqvist A., Moré S.H., von Bonin A., Kiessling R., Ljunggren H.G. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.*, 2002, Vol. 23, no. 3, pp. 130-135.
31. Wenzel U., Turner J.E., Krebs C., Kurts C., Harrison D.G., Ehmke H. Immune mechanisms in arterial hypertension. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2016, Vol. 27, no. 3, pp. 677-686.
32. Xiao L., Liu Y., Wang N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. *AJP Hear. Circ. Physiol.*, 2014, Vol. 306, no. 3, pp. H317-H325.
33. Zhang X., Tanguay R.M., He M., Deng Q., Miao X., Zhou L., Wu T. Variants of HSPA1A in combination with plasma Hsp70 and anti-Hsp70 antibody levels associated with higher risk of acute coronary syndrome. *Cardiology*, 2011, Vol. 119, no. 1, pp. 57-64.

Авторы:

Ганковская Л.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Понасенко О.А. — студент-дипломник кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, 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

Ponassenko O.A., Graduate Student, 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, Head, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 05.05.2018
Принята к печати 21.05.2018

Received 05.05.2018
Accepted 21.05.2018

ПЛОТНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ К ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫМ МЕДИАТОРАМ КАК МОДУЛИРУЮЩИЙ КОМПОНЕНТ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МЕДИАТОРОВ НА КЛЕТКУ (ЧАСТЬ 1)

Сенников С.В.^{1,2}, Альшевская А.А.¹, Жукова Ю.В.¹,
Беломестнова И.А.¹, Караулов А.В.³, Лопатникова Ю.А.¹

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

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский
национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

³ ФGAOU BO «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. В обзоре обобщены последние мировые научные данные о роли рецепторов к иммуно-медиаторам в регуляции биологических эффектов, оказываемых на клетки. Для основных классов регуляторов иммунной системы (интерлейкинов, интерферонов, факторов роста и факторов некроза опухоли) представлены варианты участия рецепторов как компонентов взаимодействия цитокин/клетка на примере *in vitro* и *in vivo* исследований. Показана способность показателей экспрессии рецепторов менять характер и тип данного взаимодействия. Проанализированы данные об участии рецепторов к регуляторным молекулам в развитии иммуноопосредованных заболеваний различного генеза. Продемонстрировано, что изменение уровня экспрессии рецепторов имеет большое значение в оценке функционального ответа клетки на медиатор и в развитии патологических состояний. В исследованиях подтверждены данные о влиянии плотности рецепторов на процессы пролиферации и апоптоза, а также обменные процессы, что является триггером в развитии аутоиммунных, онкологических и дистрофических заболеваний. Для всех рассмотренных классов регуляторных молекул характерным является изменение плотности экспрессии рецепторов как одного из ключевых моментов регулирования функциональной активности клеток. Таким образом, изучение уровня экспрессии рецепторов на мембране клеток является важным в понимании патогенеза, а изменение уровня экспрессии может рассматриваться как терапевтическая мишень в лечении различных заболеваний.

Ключевые слова: цитокины, рецепторы, иммунорегуляция, иммунопатология, иммунотерапия, факторы роста, интерлейкины, интерфероны, фактор некроза опухоли

Адрес для переписки:

Сенников Сергей Витальевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-19-10.
E-mail: sennikovsv@gmail.com

Address for correspondence:

Sennikov Sergey V.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-19-10.
E-mail: sennikovsv@gmail.com

Образец цитирования:

С.В. Сенников, А.А. Альшевская,
Ю.В. Жукова, И.А. Беломестнова, А.В. Караулов,
Ю.А. Лопатникова «Плотность экспрессии рецепторов
к иммунорегуляторным медиаторам как модулирующий
компонент биологических эффектов медиаторов
на клетку» (часть 1) // Медицинская иммунология,
2019. Т. 21, № 2. С. 209–220.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-209-220

© Сенников С.В. и соавт., 2019

For citation:

S.V. Sennikov, A.A. Alshevskaya, Yu.V. Zhukova,
I.A. Belomestnova, A.V. Karaulov, Yu.A. Lopatnikova
“Expression density of receptors for immunoregulatory
mediators as a modulatory component of biological effects of
mediators upon cells” (part 1), *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 2,
pp. 209–220. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-209-220

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-209-220

EXPRESSION DENSITY OF RECEPTORS FOR IMMUNOREGULATORY MEDIATORS AS A MODULATORY COMPONENT OF BIOLOGICAL EFFECTS OF MEDIATORS UPON CELLS (PART 1)

Sennikov S.V.^{a, b}, Alshevskaya A.A.^a, Zhukova Yu.V.^a,
Belomestnova I.A.^a, Karaulov A.V.^c, Lopatnikova Yu.A.^a

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

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

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

Abstract. The present review article summarizes the latest world scientific data on the role of receptors for immune mediators in regulating biological effects on the cells. For the main classes of immune regulators (interleukins, interferons, growth factors and tumor necrosis factors), the variants are presented for participation of receptors as components of cytokine/cell interaction, as proven by *in vitro* and *in vivo* studies. Ability of the receptors expression to modify characteristics and type of these interactions is shown. The data on participation of receptors for regulatory molecules in development of immune-mediated diseases of various genesis have been analyzed. It was demonstrated that the changes in the receptor expression are of great importance when evaluating functional response of the cells to the mediators and in development of pathological conditions. Current studies confirmed the data suggesting effects of receptor density upon the processes of proliferation and apoptosis, as well as metabolic processes that trigger development of autoimmune, oncological and dystrophic diseases. For all the considered classes of regulatory molecules, the change in the density of receptor expression is one of the key aspects in regulating functional activity of the cells. Thus, studying expression levels of receptors on the cell membrane is important in understanding pathogenesis, whereas changing expression level may be considered as a therapeutic target in the treatment of various diseases.

Keywords: cytokines, receptors, immunoregulation, immunopathology, immunotherapy, growth factors, interleukins, interferons, tumor necrosis factor

Работа поддержана грантом Сеченовского университета 2018.

Введение

Система регуляторов представляет собой универсальную полиморфную сеть, предназначенную для контроля процессов пролиферации, дифференцировки, апоптоза и функциональной активности клеточных элементов в кроветворной, иммунной и в других гомеостатических системах организма. Основным классом данных медиаторов являются цитокины, для которых характерны такие общие свойства, как плейотропность, синергизм и антагонизм в действии, каскадность и избыточность эффектов.

Действие цитокинов на клетки-мишени осуществляется путем связывания с рецепторами. Экспрессия цитокиновых рецепторов играет решающую роль во многих клеточных процессах. Именно через их активацию происходит инициирование сигнальных каскадов, которые регулируют широкий спектр жизненно важных физиологических функций, включая контроль обмена веществ, воспалительные реакции, остеогенез,

а также развитие и рост клеток крови и иммунных клеток.

Рецепторы играют важную роль в обеспечении функций цитокинов, поэтому в настоящее время исследователями ведется активная работа по изучению их роли в норме и при различных патологиях [5, 10, 26]. Рецепторы и медиаторы являются равноправными участниками обеспечения биологических эффектов на таргетные клетки, и регуляция этих эффектов может модулироваться различными механизмами. Одним из таких механизмов является плотность экспрессии рецепторов на поверхности клеток [5, 26], а в частности — пороговый уровень экспрессии рецепторов, при достижении которого может изменяться тип и интенсивность реагирования. В исследованиях последних лет показано, что от изменения количества экспрессируемых рецепторов может изменяться функциональный ответ клеток на медиатор или даже принципиально отличаться при достижении определенного количества рецепторов [10]. Кроме того, при различных соотношениях количества экспрессируемых рецепторов разных типов возможна перекрестная активация

их сигнальных путей с модуляцией действия цитокина [12].

В настоящий момент имеется множество разрозненных данных о том, что количество рецепторов на клетках может быть ассоциировано с изменениями в процессах пролиферации и дифференцировки, формирования противоопухолевого иммунитета, реакциями отторжения трансплантата, выраженности воспалительного процесса и многих других. Поскольку данные изменения обладают значимым терапевтическим потенциалом, представляется весьма актуальным и важным обобщение данных по влиянию плотности экспрессии рецепторов к различным классам иммунорегуляторных медиаторов на функциональные особенности и свойства клеток в норме и при различной патологии. Мы собрали данные о влиянии параметров экспрессии рецепторов к основным классам регуляторных молекул на регуляцию функционирования клеток.

Плотность экспрессии рецепторов как регулятор функций и свойств клетки

Интерлейкины

Интерлейкины являются одними из основных регуляторов и медиаторов иммунной системы. Рецепторы к интерлейкинам экспрессируются на многих типах клеток, благодаря чему они обеспечивают связь иммунной системы с другими системами организма. Действие интерлейкинов на клетки зависит не только от количества медиатора, типа клеток, аффинности субъединиц рецептора, но и от изменения уровня экспрессии самого мембраносвязанного рецептора на поверхности клетки.

Было показано, что Th17 экспрессировали более высокие уровни IL-12R β 1 и IL-23r по сравнению с $\gamma\delta$ Т-клетками. Также оценивался уровень фосфорилирования STAT3 в ответ на введение IL-23. Наличие высокой плотности экспрессии IL-12R β 1 способствовало более высокому уровню фосфорилирования STAT3. Таким образом, данное исследование показало различия в функциональной способности клетки в зависимости от плотности рецептора на субпопуляциях иммунных клеток [54].

Говоря об интерлейкинах, нельзя не упомянуть их роль в развитии воспаления. Однако иногда эта роль принадлежит не столько самим цитокинам, сколько их рецепторам, а точнее — количественному изменению их на поверхности клеток. Chang S.Y. и соавт. трансфецировали линию клеток HUC-1 вектором, кодирующим рецептор второго типа к IL-1, и показали роль его эктопической экспрессии: произошло изменение морфологических характеристик этих клеток, повышение их миграционной способности и увели-

чение секреции ими IL-6, IL-8 и коллагена. Однако чрезмерная экспрессия IL-1R2 приводила к снижению экспрессии корцептора IL-1RAcP и в результате к подавлению ответа клетки при действии IL-1 через IL-1R1 [8]. Последний эффект был описан в более ранних работах с использованием мышинных кератиноцитов с высокой и низкой плотностью экспрессии IL-1R2 [38].

Цитокины и их рецепторы принимают участие в обменных процессах, при этом данная регуляция также связана с уровнем плотности экспрессии рецепторов. От плотности экспрессии рецепторов зависит действие IL-18, участвующего в регуляции метаболизма липидов и глюкозы. У пациентов с ВИЧ-ассоциированной липодистрофией было выявлено, что экспрессия рецепторов IL-18 в скелетных мышцах снижается по сравнению со здоровыми донорами. Кроме того, низкая плотность экспрессии рецептора коррелирует с высокими уровнями керамидов в скелетных мышцах и повышенным уровнем циркулирующих триглицеридов и липопротеидов высокой плотности, что приводит к развитию липодистрофии [22].

Изменение уровня экспрессии рецептора к IL-10 также имеет значение в развитии и прогрессировании аутоиммунных патологий. Имеются данные о более благоприятном течении СКВ у пациентов, мононуклеарные клетки которых имели более высокие показатели экспрессии IL-10R на мембране (а именно CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки). Проведение сигнала IL-10/IL-10R в данном случае тормозило развитие волчаночного нефрита [11]. При изучении роли IL-26 у больных воспалительными заболеваниями кишечника исследовали экспрессию рецепторов IL-20R1 и IL-10R2 на клетках нормальной слизистой оболочки и у больных с активным и неактивным воспалением, а также на культуре клеток субэпителиальных миофибробластов толстого кишечника. В результате было выявлено, что IL-20R1 экспрессировался на эпителиальных клетках и в некоторых других клетках подслизистой оболочки, а экспрессия IL-10R2 была обнаружена в различных клетках, включая эпителиальные клетки и лейкоциты. Уровни экспрессии IL-20R1 и IL-10R2 не различались в нормальной и воспаленной слизистой оболочке. Экспрессия рецепторов IL-20R1 и IL-10R2 на культуре клеток субэпителиальных миофибробластов толстого кишечника была выше. Имеются данные о роли изменения экспрессии рецептора к IL-4 в развитии атопического дерматита на ранних этапах постнатального онтогенеза. На момент рождения ребенка моноциты и Т-хелперы, полученные из пуповинной кро-

ви новорожденного, имеют высокий уровень экспрессии IL-4R на своей мембране. Через год количество IL-4R на моноцитах снижается. Однако в случае, когда плотность рецепторов на моноцитах не снижалась или происходило незначительное ее уменьшение, развивалось IL-4/IL-4R-опосредованное подавление секреции IL-12 моноцитами, который, воздействуя на Т-хелперы 1 типа, стимулировал секрецию ими IFN γ . Угнетение секреции IL-12 изменяет Th1/Th2-баланс в сторону Th2-ответа. Поэтому у детей с такой картиной экспрессии IL-4R на моноцитах в течение первого года жизни развивался тяжелый атопический дерматит [14]. При этом *in vivo* было обнаружено, что IL-4 играет различную регуляторную роль в экспрессии IL-7 α в зависимости от типа клетки; IL-4 уменьшает экспрессию IL-7 α на CD4 Т-клетках и, напротив, активирует экспрессию на DC [21].

Weu С.С. и соавт. в своей работе установили, что повышение плотности рецепторов к IL-20 на кератиноцитах кожи приводит к нарушению взаимодействия между эндотелиальными клетками, клетками иммунной системы и самими кератиноцитами, в результате чего происходит нарушение пролиферации и дифференцировки последних. Данные события являются причиной уязвимости кожи и развития хронических воспалительных процессов, в том числе псориаза и спонгиоза дерматита [51]. Это объясняется тем, что происходит связывание большого количества рецепторов IL-20 в местах поражения, при этом концентрация медиатора в крови у больных псориазом снижается относительно нормальных количеств, что способствует развитию воспаления.

Участие в патогенезе атопического дерматита было также показано для рецепторного антагониста IL-31 и рецепторов к IL-1. Плотность экспрессии IL-31 α в кератиноцитах пораженной кожи у пациентов с атопическим дерматитом значительно выше, чем у здоровых доноров. Уровень экспрессии IL-31 α значительно возрастает при псориазе, но в меньшей степени по сравнению с атопическим дерматитом [13]. Исследование клеток периферической крови больных атопическим дерматитом [1] продемонстрировало, что Т-клетки и В-клетки характеризуются снижением плотности экспрессии рецепторов первого типа к IL-1 при более высоком по сравнению со здоровыми донорами проценте позитивных клеток с рецепторами 2 типа. Кроме того, на примере моноцитов и В-клеток показано, что изменение плотности экспрессии и процента клеток, экспрессирующих данный рецептор в субпопуляции, может быть разнонаправленным. Так-

же было продемонстрировано, что наибольшей предсказательной силой для индекса тяжести заболевания SCORAD обладают модели множественной линейной регрессии, учитывающие все три пула компонентов системы рецептор–цитокин: содержание растворимых рецепторов и цитокина, процент позитивных клеток и количество рецепторов. Схожие тенденции были продемонстрированы и для экспрессии рецепторов к IL-1 при ревматоидном артрите на основных иммунокомпетентных клетках периферической крови (Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и моноцитах) [2].

Злокачественная трансформация клеток сопровождается изменением паттерна экспрессируемых рецепторов, в том числе и рецепторов к интерлейкинам. Показано, что чрезмерная экспрессия рецепторов IL-1R2 на эпителиальных клетках толстой кишки может приводить к развитию онкологических процессов. При этом если высокая экспрессия рецептора сохраняется на клетках колоректального рака и дальше, происходит увеличение синтеза ими IL-6 и VEGF и, как следствие, пролиферация опухолевых клеток, рост сосудов и метастазирование рака [27]. Клетки рака поджелудочной железы способны экспрессировать на своей мембране рецепторы к IL-6. При добавлении IL-6 в среду к опухолевым клеткам рака поджелудочной железы с высоким уровнем экспрессии рецептора к цитокину наблюдалось повышение инвазивной способности клеток, причем степень инвазивности коррелировала с концентрацией добавляемого IL-6 [6].

Таким образом, изменение уровня экспрессии рецепторов к интерлейкинам имеет большое значение в оценке функционального ответа клетки на цитокин и в развитии патологических состояний. В исследованиях подтверждены данные о влиянии плотности рецепторов на процессы пролиферации и апоптоза, что является триггером в развитии аутоиммунных, онкологических и дистрофических заболеваний. Изучение уровня экспрессии рецепторов на мембране клеток является важным в понимании патогенеза, а изменение уровня экспрессии может рассматриваться как терапевтическая мишень в лечении различных заболеваний.

Интерфероны

В настоящее время выделяют 12 (у человека – 9) видов интерферонов, которые по способности взаимодействовать с тремя типами рецепторов объединяют в 3 семейства: интерфероны I типа – IFN α , IFN β , IFN δ , IFN ϵ , IFN κ , IFN τ , IFN ω , а также лимитин (у человека IFN δ , IFN τ и лимитин не обнаружены), интерфероны II типа – IFN γ и описанные недавно интерфероны III типа – λ 1,

$\lambda 2$ и $\lambda 3$, называемые также IL-29, IL-28A и IL-28B соответственно.

Каждый тип интерферонов связывается с определенным типом рецепторов: для интерферонов I типа — это IFNAR, состоящий из двух субъединиц (IFNAR-1 и IFNAR-2); интерфероны II типа связываются с IFNGR, который также имеет две субъединицы (IFNGR-1 и IFNGR-2); интерфероны III типа передают сигнал через рецепторный комплекс, состоящий из IL-10R2 и IFNLR-1. Изменения в плотности экспрессии рецепторов к интерферонам преимущественно продемонстрированы для интерферонов I типа.

Одной из функций интерферонов I типа является подавление пролиферации опухолевых клеток. Интерфероны I типа, связываясь со своим рецептором, запускают каскад внутриклеточных реакций, приводящий к активации апоптоза. Однако, поскольку каждый член семейства I интерферонов обладает различной аффинностью к субъединицам рецептора, изменение уровня экспрессии компонентов рецептора будет обуславливать ответ на тот или иной член семейства I интерферонов.

Было показано, что клетки фибросаркомы [32] и клетки линий рака поджелудочной железы [5], экспрессирующие малые количества IFNAR-2, более чувствительны к действию IFN β , а клетки с высокой экспрессией этого рецептора лучше отвечают на действие IFN α . При этом снижение уровня экспрессии рецепторов приводило к снижению антипролиферативного эффекта, но антивирусный эффект сохранялся на высоком уровне до снижения уровня экспрессии рецепторов на 50% от исходного [42]. Объясняется это тем, что IFN β , действуя на клетки с низкой экспрессией IFNAR-2, оказывает свои сигналы только через IFNAR-1, тогда как максимальный эффект IFN α зависит не только от экспрессии первого типа рецептора, но и от второго, в особенности его с-субъединицы — IFNAR-2с [5]. Это может иметь значение и при применении препаратов интерферона в терапии: препараты IFN β можно применять в более низких дозах, в отличие от препаратов IFN α , при желании воздействовать на рецепторы первого типа для получения желаемого эффекта. В более ранних работах также говорилось, что высокая экспрессия IFNAR-1 на опухолевых клетках линии K-562 способствует угнетению пролиферации опухолевых клеток и уменьшает их плотность до величин, при которых рост опухоли прекращается [9].

Роль экспрессии IFNAR1 показана при колоректальном раке у человека и на мышинных моделях. Было обнаружено, что низкий уровень плотности экспрессии IFNAR1 наблюдался при

колоректальном раке у человека и мышинных моделях, по сравнению с нормальными клетками эпителия слизистой [20].

Имеются также данные, которые свидетельствуют о гендерных различиях в экспрессии рецепторов к интерферонам. В частности [18], одной из причин того, что аллерген-специфическая бронхиальная астма у мужчин протекает легче, чем у женщин, является различие в уровне экспрессии рецепторов к IFN γ на CD4-позитивных Т-лимфоцитах. «Мужские» CD4⁺Т-лимфоциты экспрессируют более высокие уровни IFNGR, поэтому лучше отвечают на действие IFN γ , в результате чего происходит подавление Th2-ответа и продукции цитокинов Т-хелперами 2 типа. «Женские» CD4⁺Т-лимфоциты за счет пониженной экспрессии IFNGR хуже отвечают на цитокин, подавления воспалительной реакции не происходит, и астма протекает тяжелее.

Таким образом, изученные литературные данные свидетельствуют, что изменение уровня экспрессии рецепторов к интерферонам является одним из ключевых моментов регулирования функциональной активности клеток. Эта способность может быть использована для использования рецепторов интерферонов в качестве терапевтических мишеней при разработке новых классов препаратов.

Факторы роста

Факторы роста входят в систему цитокинов и, подобно гормонам, обладают широким спектром биологического действия на многие клетки — стимулируют или ингибируют митогенез, хемотаксис, дифференцировку клеток. Связывание факторов роста с их рецепторами на поверхности клетки приводит к активации рецептора, что инициирует и модифицирует пути передачи сигнала и индуцирует развитие названных выше процессов. Однако факторы роста, их рецепторы, участники передачи сигнала внутри клетки и транскрипционные факторы нередко являются продуктами экспрессии протоонкогенов, что приводит к неконтролируемой пролиферации клеток и образованию опухоли.

Одним из наиболее мощных индукторов опухолевого роста является эпидермальный фактор роста (EGF). Тем не менее ответ клетки на действие EGF не всегда зависит только от самого цитокина: важным является и уровень экспрессии рецептора EGFR на мембране клетки. EGFR экспрессируется при раке желудка, молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, колоректальном раке и многих других эпителиальных опухолях. Определенное значение имеет различная экспрессия EGFR на клетках перикоронарных фолликулов, оставшихся после

удаления зубов, поскольку фолликул и его одонтогенные остатки могут играть важную роль в гистогенезе различных одонтогенных кист, гематом и опухолей [31].

Наиболее ранние исследования экспрессии рецептора эпидермального фактора роста при онкологических заболеваниях показывают, что у пациентов, имевших высокую плотность экспрессии рецептора на эпителиальных клетках, снижалась безрецидивная выживаемость и повышался риск смерти при раке мочевого пузыря [33], молочной железы [40], при плоскоклеточном раке пищевода [35], плоскоклеточном раке головы и шеи [39], глиоме [25], при раке желудка [56], оральном плоскоклеточном раке [30] в отличие от пациентов с низким уровнем экспрессии рецептора на клетках. При этом отмечалось также, что инвазивная способность клеток была прямо пропорциональна уровню экспрессии EGFR. Аналогичные результаты были получены для пациентов с плоскоклеточным раком гортани [29], первичным раком эндометрия [41], раком гортани [28]. В случае первичного рака эндометрия авторами было установлено, что более дифференцированные опухоли экспрессируют меньшее количество рецепторов, чем умеренно или слабо дифференцированные [41].

В недавних исследованиях было установлено, что высокая плотность экспрессии рецепторов фактора роста фибробластов у мышей и доноров, страдающих ожирением, была связана с ростом в агаре неопухолевых эпителиальных клеток. При этом наблюдалась корреляция с уровнем EGFR-1, а клетки дефицитные по FGFR-1 не давали усиленного роста в агаре. По мнению авторов, это может являться провоцирующим фактором развития раковых процессов [7].

При изучении плотности экспрессии EGFR при колоректальной аденоме и раке было показано, что плотность экспрессии рецепторов была значительно выше у пациентов с аденомой и колоректальным раком по сравнению с клетками нормальной слизистой толстой кишки. При этом уровень плотности EGFR коррелировал с размером аденомы и достигал максимальных значений на раковых клетках [52].

Для развития направления терапевтического использования экспрессии рецепторов на клетках необходимо глубже понимать процессы, запускаемые внутри клеток после изменения экспрессии. В настоящее время в ряде исследований представлены данные о том, что происходит внутри клетки при действии цитокина в условиях измененной экспрессии его рецептора. Tini P. и соавт. в своих исследованиях показали, что у клеток, экспрессирующих высокий уровень EGFR, экс-

прессия белка Beclin-1, участвующего в аутофагии клеток, снижается. В свою очередь, это способствует ингибированию апоптоза опухолевых клеток и повышению их пролиферативной активности. Пациенты с глиобластомой и высокой экспрессией EGFR на опухолевых клетках в этом случае имели наихудший клинический прогноз. У пациентов, чьи опухолевые клетки имели низкую плотность рецептора на мембране, прогноз выживаемости был более благоприятен [46].

По причине своего участия в онкогенезе EGFR является особым объектом противораковой терапии. В литературе имеются данные, показывающие, как эффект различных видов проводимой терапии зависит от плотности экспрессии рецептора EGF. Так, высокая экспрессия EGFR увеличивает резистентность опухоли к лучевой терапии. Это было показано на примере рака шейки матки: пациенты с высокой плотностью рецепторов на клетках после проведения лучевой терапии имели либо остаточное заболевание, либо развитие рецидива заболевания. Пациенты с низкой экспрессией рецептора имели более длительную выживаемость без признаков прогрессирования болезни [36]. Подобные результаты были получены позже и для пациентов с глиобластомой [3].

Однако изменение экспрессии рецептора эпидермального фактора роста не всегда является значимым маркером, что и было показано для веретенноклеточного рака головы и шеи, являющегося одним из разновидностей плоскоклеточного рака головы и шеи [50]. В своей работе авторы не отмечают каких-либо явных различий между пациентами с высокой и низкой плотностью экспрессии рецептора на раковых клетках по показателям локализации и стадии опухоли, по выживаемости, метастазированию клеток и развитию рецидивов. Таким образом, уровни EGFR не всегда могут являться прогностическими.

ARCON-терапия — модификация лучевой терапии, которая заключается в ингаляционном введении пациентам карбогена и приеме ими растворимого витамина PP (никотинамида) во время проведения лучевой терапии. Nijkamp и соавт. показали, что пациенты с низким уровнем экспрессии EGFR лучше отвечали на ARCON-терапию и имели более длительную выживаемость [34]. Считается, что гипоксия опухолевых клеток обеспечивает их устойчивость к лучевой терапии, в то время как максимальное повреждение ДНК клеток наблюдается в присутствии кислорода. Связывание EGF со своим рецептором индуцирует активацию и стабилизирует один из ключевых белков гипоксической реакции —

фактор, индуцированный гипоксией 1a (HIF-1a). Поэтому авторы полагают, что хороший эффект ARCON-терапии на низкоэкспрессирующие опухоли связан с отсутствием такого потенциала из-за низкого количества EGFR.

Другим видом терапии рака является применение моноклональных антител к EGFR — цетуксимаба и панитумумаба, блокирующих данный рецептор. В литературе имеются противоречивые данные о влиянии уровня экспрессии рецептора к EGF на терапию названными выше препаратами. Shigeta и соавт., исследуя влияние цетуксимаба на клетки колоректального рака нескольких клеточных линий, показали, что цетуксимаб оказывает наиболее выраженное ингибирование роста клеток с высокой экспрессией EGFR. Клетки с низкой плотностью рецептора не отвечали на терапию цетуксимабом [43]. Противоположный эффект был обнаружен при действии цетуксимаба и панитумумаба на плоскоклеточный рак головы и шеи. Наибольшее подавление роста опухолевых клеток наблюдалось в том случае, если эти клетки имели более низкий уровень экспрессии рецептора на мембране [15]. По мнению авторов, полученные результаты могут быть связаны с большим размером молекул моноклональных антител: плотная оккупация рецептора на поверхности клетки может препятствовать связыванию антител из-за пространственных ограничений.

Поскольку опухолевая трансформация клетки связана с изменениями ее генома, многие исследования направлены на изучение механизмов, с помощью которых изменяется уровень экспрессии рецептора EGF. В литературе приводятся такие механизмы, как амплификация гена рецептора в опухолевой клетке [35, 44], наличие специфических мутаций [43] и др.

Рецептор эпидермального фактора роста относится к семейству «человеческих» эпидермальных рецепторов, которое, кроме EGFR (или HER-1), включает рецепторы HER-2, HER-3 и HER-4. Эти рецепторы, по литературным данным, также могут экспрессироваться некоторыми опухолями, однако не всегда изменение уровня их экспрессии влияет на жизнедеятельность самой клетки и на прогноз заболевания в целом [19, 47]. Но есть также данные, показывающие, что высокая экспрессия определенного рецептора из семейства HER определяет гистологический тип опухоли, например при раке желудка [4], а также влияет на выживаемость пациентов, в особенности отмечается, что гиперэкспрессия HER-3 при раке желудка приводит к ухудшению состояния больных и снижает их выживаемость [4, 16]. Высокая экспрессия HER-2 при аденокарциноме

простаты коррелирует с уровнем сывороточного простатического специфического антигена и может играть важную роль в прогрессировании заболевания [55]. Долгое время считалось, что HER3 не обладает киназной активностью, однако недавно обнаружили, что эти рецепторы проявляют активность тирозинкиназы и образуют гомодимеры и гетеродимеры с другими HER рецепторами. Такое гетеродимерное образование между молекулами HER может быть важной особенностью некоторых раковых клеток. В частности, гетеродимер HER2 / HER3, по-видимому, имеет большое значение для пролиферации опухолевых клеток при определенных раках молочной железы. Высокие уровни HER3 связаны с развитием резистентности при лечении рака, которые нацелены на блокаду HER1 или HER2 [24].

Сосудистый эндотелиальный фактор роста — другой, не менее важный цитокин, необходимый для ангиогенеза. Экспрессия рецептора VEGF (VEGFR) в основном наблюдается на эндотелиальных клетках сосудов. При определенных условиях рецептор начинает экспрессироваться и на других клетках, приводя к развитию определенных эффектов. Так, повышение экспрессии VEGFR-2 и VEGFR-3 на клетках нормально эндометрия способствует опухолевой трансформации клеток, повышению ангиогенеза и, как следствие, опухолевой прогрессии, а высокая экспрессия третьего типа рецептора повышает также миграционную активность клеток и инвазию их в миометрий [49]. В других проведенных исследованиях указывается также, что повышение экспрессии первого типа рецептора VEGF на клетках первичного рака яичников повышает риск рецидива заболевания после удаления опухоли [53].

VEGFR может играть роль в прогрессировании атеросклероза. Было показано на диабетических мышцах, что у животных, чьи эндотелиальные клетки атеросклеротических бляшек экспрессируют большое количество рецептора второго типа к VEGF, стимулировался ангиогенез в бляшке, а новые сосуды имели повышенную проницаемость, что способствовало появлению кровоизлияний и экстравазации воспалительных клеток [45]. Авторы отмечают также, что в мышечной модели атеросклероза наблюдалось изменение экспрессии VEGFR-1 на внутрибляшковых макрофагах: высокая плотность рецепторов на макрофагах способствовала их рекрутированию в атеросклеротические бляшки.

Изменение экспрессии рецептора к VEGF может влиять и на диагностику патологических процессов, например опухолей. Hervey-Jumper и соавт. показали, что высокая экспрессия VEGFR-1/2

на клетках медуллобластомы усиливает контраст гадолиния при проведении МРТ-исследования. Такие опухоли имели на снимках более яркое цветение. У пациентов с низкоэкспрессирующими раковыми клетками опухоль была менее яркой [17]. Данный факт следует учитывать при диагностике онкологических заболеваний.

Роль измененной экспрессии рецепторов других факторов роста также описывается в литературе. Повышение уровня экспрессии с-Met (рецептор фактора роста гепатоцитов) на эпителиальных клетках при карциноме носоглотки повышает двигательную активность раковых клеток, способствуя их метастазированию в шейные лимфатические узлы [23]. Van Caam A. и соавт. рассматривают изменение плотности первого типа рецептора к TGF- β на клетках хряща как фактор риска развития остеоартрита: с возрастом экспрессия TGF- β -R1 может снижаться, в результате уменьшается активирующее влияние цитокина на клетки хряща [48]. Также было показано, что у младенцев с низкой плотностью экспрессии рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) снижается миграционная способность мезенхимальных стволовых кле-

ток в нужном направлении и дифференцировка их в эластин- и актин-продуцирующие фибробласты, а также ангиогенез. Перечисленные процессы важны для развития зрелых альвеол, и поэтому, по словам авторов, у детей с низкоэкспрессирующими клетками развивалась бронхо-легочная дисплазия [37].

Изменение экспрессии рецепторов факторов роста может влиять на течение не только патологических процессов, но и физиологических. Так, было показано, что моноциты крови различаются по уровню экспрессии α -субъединицы рецептора GM-CSF. Моноциты с высоким уровнем экспрессии при действии цитокина дифференцируются в CD14⁺CD1a⁺ клетки (дендритные клетки), а моноциты с низкой экспрессией рецептора – в CD14⁺CD71⁺ клетки (макрофаги) [10].

Данные исследования свидетельствуют, что плотность экспрессии рецепторов к факторам роста важно учитывать, так как ее изменение влияет на трансформацию клеток, а также на течение, исход заболеваний, диагностику и их лечение.

Список литературы / References

1. Alshevskaya A.A., Lopatnikova J.A., Krugleeva O.L., Nepomnyschih V.M., Lukinov V.L., Karaulov A.V., Sennikov S.V. Expression density of receptors to IL-1 β in atopic dermatitis. *Mol. Immunol.*, 2016, Vol. 75, pp. 92-100.
2. Alshevskaya A.A., Lopatnikova J.A., Shkaruba N.S., Chumasova O.A., Sizikov A.E., Karaulov A.V., Kozlov V.A., Sennikov S.V. Differences of IL-1 β receptors expression by immunocompetent cells subsets in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 948393. doi: 10.1155/2015/948393.
3. Barker F.G. 2nd, Simmons M.L., Chang S.M., Prados M.D., Larson D.A., Sneed P.K., Wara W.M., Berger M.S., Chen P., Israel M.A., Aldape K.D. EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2001, Vol. 51, no. 2, pp. 410-418.
4. Begnami M.D., Fukuda E., Fregnani J.H., Nonogaki S., Montagnini A.L., da Costa W.L. Jr. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. *J. Clin. Oncol.*, 2011, Vol. 29, no. 22, pp. 3030-3036.
5. Booy S., van Eijck C.H., Dogan F., van Koetsveld P.M., Hofland L.J. Influence of type-I Interferon receptor expression level on the response to type-I Interferons in human pancreatic cancer cells. *J. Cell Mol. Med.*, 2014, Vol. 18, no. 3, pp. 492-502.
6. Catanzaro R., Celep G., Zerbinati N., Papacharalambous M., Nagpal R., Marotta F., Rastmanesh R., Milazzo M., Lorenzetti A., Bertuccelli G., Sollano J. *In vitro* protective effect of Celergen, a bioactive marine compound, on interleukin-6-related invasiveness of pancreatic cancer. *Acta Biomed.*, 2014, Vol. 85, no. 1, pp. 44-51.
7. Chakraborty D., Benham V., Bullard B., Kearney T., Hsia H.C., Gibbon D., Demireva E.Y., Lunt S.Y., Bernard J.J. Fibroblast growth factor receptor is a mechanistic link between visceral adiposity and cancer. *Oncogene*, 2017, Vol. 36, no. 48, pp. 6668-6679.
8. Chang S.Y., Su P.F., Lee T.C. Ectopic expression of interleukin-1 receptor type II enhances cell migration through activation of the pre-interleukin 1 α pathway. *Cytokine*, 2009, Vol. 45, no. 1, pp. 32-38.
9. Colamonici O.R., Porterfield B., Domanski P., Handa R.K., Flex S., Samuel C.E., Pine R., Diaz M.O. Ligand-independent anti-oncogenic activity of the α subunit of the type I interferon receptor. *J. Biol. Chem.*, 1994, Vol. 269, no. 44, pp. 27275-27933.
10. Conti L., Cardone M., Varano B., Puddu P., Belardelli F., Gessani S. Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, no. 3, pp. 750-762.

11. Cui H.D., Qi Z.M., Yang L.L., Qi L., Zhang N., Zhang X.L., Du S.Y., Jiang Y. Interleukin-10 receptor expression and signalling were down-regulated in CD4⁺ T cells of lupus nephritis patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 2011, Vol. 165, no. 2, pp. 163-171.
12. Fotin-Mleczek M., Henkler F., Samel D., Reichwein M., Hausser A., Parmryd I., Scheurich P., Schmid J.A., Wajant H. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J. Cell Sci.*, 2002, Vol. 115, Pt 13, pp. 2757-2770.
13. Furue M., Yamamura K., Kido-Nakahara M., Nakahara T., Fukui Y. Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy*, 2018, Vol. 73, no. 1, pp. 29-36.
14. Grzela K., Grzela T., Korczak-Kowalska G., Bocian K., Sonczyk W., Jedrasiak U., NiderlaBielińska J., Lazarczyk M., Zagórska W., Zawadzka-Krajewska A., Feleszko W., Kulus M. Risk of allergy development correlates with IL-4 receptor expression on newborns' monocytes and Th lymphocytes. *Med. Sci. Monit.*, 2007, Vol. 13, no. 10, CR445-8.
15. Hartmann S., Seher A., Brands R.C., Linz C., Lessner G., Böhm H., Kübler A.C., Müller-Richter U.D. Influence of epidermal growth factor receptor expression on the cetuximab and panitumumab response rates of head and neck carcinoma cells. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, 2014, Vol. 42, no. 7, pp. 1322-1328.
16. He X.X., Ding L., Lin Y., Shu M., Wen J.M., Xue L. Protein expression of HER2, 3, 4 in gastric cancer: correlation with clinical features and survival. *J. Clin. Pathol.*, 2015, Vol. 68, no. 5, pp. 374-380.
17. Hervey-Jumper S.L., Garton H.J., Lau D., Altshuler D., Quint D.J., Robertson P.L., Muraszko K.M., Maher C.O. Differences in vascular endothelial growth factor receptor expression and correlation with the degree of enhancement in medulloblastoma. *J. Neurosurg. Pediatr.*, 2014, Vol. 14, no. 2, pp. 121-128.
18. Ito C., Okuyama-Dobashi K., Miyasaka T., Masuda C., Sato M., Kawano T., Ohkawara Y., Kikuchi T., Takayanagi M., Ohno I. CD8⁺ T cells mediate female-dominant IL-4 production and airway inflammation in allergic asthma. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 10, e0140808. doi: 10.1371/journal.pone.0140808.
19. Jácome A.A., Wohnrath D.R., Scapulatempo Neto C., Carneseca E.C., Serrano S.V., Viana L.S., Nunes J.S., Martinez E.Z., Santos J.S. Prognostic value of epidermal growth factor receptors in gastric cancer: a survival analysis by Weibull model incorporating long-term survivors. *Gastric Cancer*, 2014, Vol. 17, no. 1, pp. 76-86.
20. Katlinski K.V., Gui J., Katlinskaya Y.V., Ortiz A., Chakraborty R., Bhattacharya S., Carbone C.J., Beiting D.P., Gironde M.A., Peck A.R., Puré E., Chatterji P., Rustgi A.K., Diehl J.A., Koumenis C., Rui H., Fuchs S.Y. Inactivation of interferon receptor promotes the establishment of immune privileged tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2017, Vol. 31, no. 2, pp. 194-207.
21. Kummola L., Ortutay Z., Chen X., Caucheteux S., Hämäläinen S., Aittomäki S., Yagi R., Zhu J., Pesu M., Paul W.E., Junttila I.S. IL-7R α expression regulates murine dendritic cell sensitivity to thymic stromal lymphopoietin. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 10, pp. 3909-3918.
22. Lindegaard B., Hvid T., Wolsk Mygind H., Hartvig-Mortensen O., Grøndal T., Abildgaard J., Gerstoft J., Pedersen B.K., Baranowski M. Low expression of IL-18 and IL-18 receptor in human skeletal muscle is associated with systemic and intramuscular lipid metabolism-Role of HIV lipodystrophy. *PLoS ONE*, 2018, Vol. 13, no. 1, e0186755. doi: 10.1371/journal.pone.0186755.
23. Luan T., Yu Y. Increased hepatocyte growth factor and c-Met receptor expression in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2014, Vol. 7, no. 12, pp. 5583-5587.
24. Lukeš T., Pospíšil J., Fliegel K., Lasser T., Hagen G.M. Quantitative super-resolution single molecule microscopy dataset of YFP-tagged growth factor receptors. *Gigascience*, 2018, Vol. 7, no. 3, pp. 1-10.
25. Lund-Johansen M., Bjerkvig R., Humphrey P.A., Bigner S.H., Bigner D.D., Laerum O.D. Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion *in vitro*. *Cancer Res.*, 1990, Vol. 50, no. 18, pp. 6039-6044.
26. Lutz M.B., Schnare M., Menges M., Rössner S., Röllinghoff M., Schuler G., Gessner A. Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL12 production and their dependency on GM-CSF. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 7, pp. 3574-3580.
27. Mar A.C., Chu C.H., Lee H.J., Chien C.W., Cheng J.J., Yang S.H., Jiang J.K., Lee T.C. Interleukin-1 receptor type 2 acts with c-Fos to enhance the expression of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor A in Colon cancer cells and induce angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2015, Vol. 290, no. 36, pp. 22212-22224.
28. Maurizi M., Almadori G., Ferrandina G., Distefano M., Romanini M.E., Cadoni G., Benedetti-Panici P., Paludetti G., Scambia G., Mancuso S. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 1996, Vol. 74, no. 8, pp. 1253-1257.
29. Maurizi M., Scambia G., Benedetti Panici P., Ferrandina G., Almadori G., Paludetti G., de Vincenzo R., Distefano M., Brinchi D., Cadoni G., Mancuso S. EGF receptor expression in primary laryngeal cancer: correlation with clinicopathological features and prognostic significance. *Int. J. Cancer*, 1992, Vol. 52, no. 6, pp. 862-866.
30. Mehta A., Chowdhary M., Sinha R. Immunoscoring of epidermal growth factor receptor expression in recurrent cases of oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, 2015, Vol. 44, no. 10, pp. 818-822.
31. Mohan B.C., Angadi P.V. Quantitative and qualitative analysis of epidermal growth factor receptor expression in pericoronal follicles in predicting proliferative potential. *Acta Odontol. Scand.*, 2014, Vol. 72, no. 8, pp. 770-775.

32. Moraga I., Harari D., Schreiber G., Uzé G., Pellegrini S. Receptor density is key to the alpha2/beta interferon differential activities. *Mol. Cell. Biol.*, 2009, Vol. 29, no. 17, pp. 4778-4787.
33. Neal D.E., Marsh C., Bennett M.K., Abel P.D., Hall R.R., Sainsbury J.R., Harris A.L. Epidermal growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet*, 1985, Vol. 1, no. 8425, pp. 366-368.
34. Nijkamp M.M., Span P.N., Terhaard C.H., Doornaert P.A., Langendijk J.A., van den Ende P.L., de Jong M., van der Kogel A.J., Bussink J., Kaanders J.H. Epidermal growth factor receptor expression in laryngeal cancer predicts the effect of hypoxia modification as an additive to accelerated radiotherapy in a randomized controlled trial. *Eur. J. Cancer*, 2013, Vol. 49, no. 15, pp. 3202-3209.
35. Ozawa S., Ueda M., Ando N., Shimizu N., Abe O. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer*, 1989, Vol. 63, no. 11, pp. 2169-2173.
36. Pillai M.R., Jayaprakash P.G., Nair M.K. Tumour-proliferative fraction and growth factor expression as markers of tumour response to radiotherapy in cancer of the uterine cervix. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1998, Vol. 124, no. 8, pp. 456-461.
37. Popova A.P., Bentley J.K., Cui T.X., Richardson M.N., Linn M.J., Lei J., Chen Q., Goldsmith A.M., Pryhuber G.S., Hershenov M.B. Reduced platelet-derived growth factor receptor expression is a primary feature of human bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2014, Vol. 307, no. 3, L231-239.
38. Rauschmayr T., Groves R.W., Kupper T.S. Keratinocyte expression of the type 2 interleukin 1 receptor mediates local and specific inhibition of interleukin 1-mediated inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, Vol. 94, no. 11, pp. 5814-5819.
39. Rubin Grandis J., Melhem M.F., Gooding W.E., Day R., Holst V.A., Wagener M.M., Drenning S.D., Twardy D.J. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, Vol. 90, no. 11, pp. 824-832.
40. Sainsbury J.R., Farndon J.R., Needham G.K., Malcolm A.J., Harris A.L. Epidermal-growthfactor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet*, 1987, Vol. 1, no. 8547, pp. 1398-1402.
41. Scambia G., Benedetti Panici P., Ferrandina G., Battaglia F., Distefano M., d'Andrea G., de Vincenzo R., Maneschi F., Ranelletti F.O., Mancuso S. Significance of epidermal growth factor receptor expression in primary human endometrial cancer. *Int. J. Cancer*, 1994, Vol. 56, no. 1, pp. 26-30.
42. Schreiber G. The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J. Biol. Chem.*, 2017, Vol. 292, no. 18, pp. 7285-7294.
43. Shigeta K., Hayashida T., Hoshino Y., Okabayashi K., Endo T., Ishii Y., Hasegawa H., Kitagawa Y. Expression of Epidermal growth factor receptor detected by cetuximab indicates its efficacy to inhibit *in vitro* and *in vivo* proliferation of colorectal cancer cells. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 6, e66302. doi: 10.1371/journal.pone.0066302.
44. Shinojima N., Tada K., Shiraishi S., Kamiryo T., Kochi M., Nakamura H., Makino K., Saya H., Hirano H., Kuratsu J., Oka K., Ishimaru Y., Ushio Y. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.*, 2003, Vol. 63, no. 20, pp. 6962-6970.
45. Tekabe Y., Kollaros M., Zerihoun A., Zhang G., Backer M.V., Backer J.M., Johnson L.L. Imaging VEGF receptor expression to identify accelerated atherosclerosis. *EJNMMI Res.*, 2014, Vol. 4, no. 1, p. 41.
46. Tini P., Belmonte G., Toscano M., Miracco C., Palumbo S., Pastina P., Battaglia G., Nardone V., Butorano M.A., Masucci A., Cerase A., Pirtoli L. Combined epidermal growth factor receptor and Beclin1 autophagic protein expression analysis identifies different clinical presentations, responses to chemo- and radiotherapy, and prognosis in glioblastoma. *Biomed. Res. Int.*, 2015, Vol. 2015, 208076. doi: 10.1155/2015/208076.
47. Torabizadeh Z., Nosrati A., Tahvildari S. Human epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer and its relationship with clinicopathological characteristics. *Middle East J. Dig. Dis.*, 2016, Vol. 8, no. 1, pp. 24-30.
48. van Caam A., Madej W., Thijssen E., Garcia de Vinuesa A., van den Berg W., Goumans M.J., Ten Dijke P., Blaney Davidson E., van der Kraan P.M. Expression of TGF β -family signalling components in ageing cartilage: age-related loss of TGF β and BMP receptors. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, Vol. 24, no. 7, pp. 1235-1245.
49. Wang J., Taylor A., Showeil R., Trivedi P., Horimoto Y., Bagwan I., Ewington L., Lam E.W., El-Bahrawy M.A. Expression profiling and significance of VEGF-A, VEGFR2, VEGFR3 and related proteins in endometrial carcinoma. *Cytokine*, 2014, Vol. 68, no. 2, pp. 94-100.
50. Watson R.F., Chernock R.D., Zhang K.H., Michel L.S., Adkins D.R., El-Mofty S.K., Lewis J.S. Jr. Epidermal growth factor receptor expression in spindle cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck Pathol.*, 2015, Vol. 9, no. 3, pp. 360-368.
51. Wei C.C., Chen W.Y., Wang Y.C., Chen P.J., Lee J.Y., Wong T.W., Chen W.C., Wu J.C., Chen G.Y., Chang M.S., Lin Y.C. Detection of IL-20 and its receptors on psoriatic skin. *Clin. Immunol.*, 2005, Vol. 117, no. 1, pp. 65-72.
52. Williet N., Petcu C.A., Rinaldi L., Cottier M., del Tedesco E., Clavel L., Dumas O., Jarlot C., Bouarioua N., Roblin X., Peoc'h M., Phelip J.M. The level of epidermal growth factor receptors expression is correlated with the advancement of colorectal adenoma: validation of a surface biomarker. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 10, pp. 16507-16517.

53. Wimberger P., Chebouti I., Kasimir-Bauer S., Lachmann R., Kuhlish E., Kimmig R., Süleyman E., Kuhlmann J.D. Explorative investigation of vascular endothelial growth factor receptor expression in primary ovarian cancer and its clinical relevance. *Gynecol. Oncol.*, 2014, Vol. 133, no. 3, pp. 467-472.
54. Wines B.D., Yap M.L., Powell M.S., Tan P.S., Ko K.K., Orlowski E., Hogarth P.M. Distinctive expression of interleukin-23 receptor subunits on human Th17 and $\gamma\delta$ T cells. *Immunol. Cell Biol.*, 2017, Vol. 95, no. 3, pp. 272-279.
55. Zahir S.T., Tafti H.F., Rahmani K. Overexpression of HER-2/neu in patients with prostatic adenocarcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014, Vol. 15, no. 15, pp. 6425-6428.
56. Zhang F., Yang X., Li L., Sun L., Wang B.O., Yu X. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number analysis in gastric carcinoma samples from Chinese patients. *Oncol. Lett.*, 2016, Vol. 11, no. 1, pp. 173-181.

Авторы:

Сенников С.В. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

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

Authors:

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

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

Жукова Ю.В. — аспирант лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Беломестнова И.А. — студентка лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

Zhukova Yu.V., Postgraduate Student, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Belomestnova I.A., Student, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Поступила 28.06.2018

Отправлена на доработку 02.07.2018

Принята к печати 19.09.2018

Received 28.06.2018

Revision received 02.07.2018

Accepted 19.09.2018

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛЛО- И КСЕНОГРАФТНЫХ МОДЕЛЕЙ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ПРОТИВОРАКОВЫХ ВАКЦИН И ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ

Непомнящих Т.С., Гаврилова Е.В., Максютлов Р.А.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. На настоящий момент онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности и заболеваемости у населения. Последние достижения в области изучения молекулярно-генетических механизмов онкогенеза и иммунного ответа организма открывают широкие возможности для создания новых эффективных средств борьбы с неопластическими заболеваниями, более специфичных к опухолевым клеткам и менее токсичных для организма. Одними из наиболее многообещающих подходов являются иммунотерапевтические противораковые вакцины и онколитические вирусы. Для проведения быстрого и надежного скрининга и доклинического тестирования необходимо использование релевантных животных моделей. Такие модели обеспечивают возможность воспроизвести микроокружение и васкуляризацию опухоли, а также в некоторой мере воздействие иммунной системы. Наиболее активно в исследованиях раковых заболеваний используются аллогraftные и ксенографтные опухолевые модели. Аллогraftная трансплантация предполагает перенос раковых клеток или фрагментов опухоли от одного организма к другому организму того же вида. Ксенопластическая трансплантация предполагает перенос опухолевых клеток или тканей между организмами, относящимися к разным биологическим видам. Для ксенотрансплантации могут быть использованы как клеточные линии, так и клетки опухоли, полученные от пациентов в результате биопсии. За последние несколько десятилетий исследователям удалось разработать целый ряд линий иммунодефицитных мышей и крыс, пригодных для использования в качестве моделей человеческих опухолей. Однако несмотря на достигнутые успехи такие модели имеют существенные ограничения, связанные с невозможностью полностью воспроизвести микроокружение опухоли, реконструировать функциональную иммунную систему человека у мышей, а также с развитием реакции отторжения трансплантата. Таким образом, при планировании экспериментов необходим тщательный анализ и критическое рассмотрение достоинств и недостатков различных линий животных, используемых в экспериментальной онкологии.

Ключевые слова: рак, иммунный ответ, иммунотерапия, онколитические вирусы, противораковые вакцины, аллогraftные модели, ксенографтные модели, лабораторные животные

Адрес для переписки:

Непомнящих Татьяна Сергеевна
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“ Роспотребнадзора
630559, Россия, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, 28/97.
Тел.: 8 (383) 363-47-00 (доб. 13-69).
E-mail: antonec@ngs.ru, nepomnyashchik_ts@vector.nsc.ru

Address for correspondence:

Nepomnyashchikh Tatyana S.
State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector"
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo, bldg 28, apt 97.
Phone: 7 (383) 363-47-00 (add. 13-69).
E-mail: antonec@ngs.ru, nepomnyashchik_ts@vector.nsc.ru

Образец цитирования:

Т.С. Непомнящих, Е.В. Гаврилова, Р.А. Максютлов
«Некоторые аспекты использования алло- и ксенографтных моделей при разработке противораковых вакцин и онколитических вирусов»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2.
С. 221-230. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-221-230
© Непомнящих Т.С. и соавт., 2019

For citation:

T.S. Nepomnyashchikh, E.V. Gavrilova, R.A. Maksyutov
"Some applications of allo- and xenograft models for developing novel anti-cancer vaccines and oncolytic viruses",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 2, pp. 221-230.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-221-230
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-221-230

SOME APPLICATIONS OF ALLO- AND XENOGRAFT MODELS FOR DEVELOPING NOVEL ANTI-CANCER VACCINES AND ONCOLYTIC VIRUSES

Nepomnyashchikh T.S., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. To date, cancer diseases are one of the leading causes of mortality and morbidity in the world. Recent advances in understanding the molecular genetic mechanisms of oncogenesis and anti-cancer immune responses open new opportunities for the development of novel effective therapeutic strategies against cancer diseases; the therapies that would be more specific to tumor cells and less toxic to the host. Immunotherapeutic anti-cancer vaccines and oncolytic viruses are among the most promising approaches of this kind. For rapid and reliable screening and preclinical testing of new therapeutic approaches, the relevant animal models are of critical importance. Such models provide the ability to partially reproduce tumor microenvironment and vascularization, as well as to model the immune system reactions to some extent. Allograft and xenograft tumor models are the most common in cancer research. Allogeneic transplantation involves the cancer cells or tumor fragments transfer between the same-species organisms. Xenoplastic transplantation involves the transfer of tumor cells, or tissues between the organisms of distinct species. Both tumor cell lines and patient-derived tumor cells and fragments obtained with biopsy can be used for xenotransplantation. Over the past decades, the researchers developed numerous strains of immunodeficient mice and rats, suitable for xenografting human tumors. However, despite wide spread of immunodeficient laboratory animals as *in vivo* models in experimental oncology, these models do also have significant limitations because of associated inability to fairly reproduce the tumor microenvironment and human immune system functions in mice, as well as due to development of graft-versus-host reactions. Thus, when planning the experiments, it is necessary to carefully analyze all the benefits and disadvantages of animal strains, supposed to be used in experimental oncology studies.

Keywords: cancer, immune response, immunotherapy, oncolytic viruses, cancer vaccines, allograft models, xenograft models, laboratory animals

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-10101).

Введение

За последние несколько десятилетий исследователям удалось значительно продвинуться в понимании молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе многих биологических процессов, включая онкогенез и особенности противоопухолевого иммунного ответа. Благодаря этим знаниям открываются широкие возможности для создания новых противораковых лекарств, более специфичных к опухолям и менее токсичных для организма в целом [2]. В числе наиболее многообещающих подходов можно упомянуть иммунотерапию, в том числе иммунотерапевтические противораковые вакцины и терапию, основанную на использовании онколитических вирусов. Критическое значение для разработки и доклинических исследований новых противораковых средств и терапевтических стратегий имеет использование релевантных животных моделей [2]. Такие модели обеспечивают возможность воспроизвести микроокружение

и васкуляризацию опухоли, а также в некоторой мере воздействие иммунной системы. Наиболее активно в исследованиях раковых заболеваний используются аллогraftные и ксенографтные опухолевые модели. Аллогенная трансплантация предполагает перенос раковых клеток или фрагментов опухоли от одного организма к другому организму того же вида. Ксенопластическая (ксеногенная) трансплантация предполагает перенос опухолевых клеток или тканей от одного организма (человека) к другому (например, мышь или крыса). Для ксенотрансплантации могут быть использованы как клеточные линии (Cell-line-derived xenografts), так и клетки и фрагменты опухоли, полученные от пациентов в результате биопсии (Patient-derived xenografts). На данный момент создано большое количество различных линий иммунодефицитных мышей и крыс, которые могут быть использованы для ксенотрансплантации человеческих опухолей [33, 73]. Такие модели могут быть успешно использованы для трансплантации как различных опухолевых клеточных линий, так и материала, полученного от пациентов, страдающих от онкологических заболеваний. Несмотря на успехи, достигнутые

с использованием иммунодефицитных мышей в экспериментальной онкологии, у таких моделей есть и множество ограничений и недостатков, связанных с невозможностью полностью воспроизвести микроокружение опухоли или функции иммунной системы человека у организма-реципиента, а также с развитием реакции отторжения трансплантата и др., которые требуют дальнейших исследований в этой области. Тщательный анализ и критическое рассмотрение достоинств и недостатков выбранных животных моделей являются необходимыми при проведении исследований в области экспериментальной онкологии и в особенности при разработке новых средств терапии раковых заболеваний.

В наши дни раковые заболевания остаются одной из основных причин смертности и заболеваемости у населения. На данный момент описано более 200 различных раковых заболеваний. Разработка средств иммунотерапии, противораковых вакцин и онколитических вирусов является перспективным способом борьбы с раковыми заболеваниями [73].

Существует два основных типа иммунотерапии рака: 1) пассивная терапия с использованием моноклональных антител против поверхностных антигенов раковых клеток (например, трастузумаб, направленный против рецептора HER2 клеток карциномы молочной железы и желудка, или цетуксимаб, направленный против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) при колоректальном раке); 2) активная иммунотерапия, основанная на стимуляции иммунного ответа против специфичных раковых антигенов (например, сипулейцел-Т, используемый для лечения некоторых видов рака предстательной железы) [37]. Иммунотерапия позволяет оказывать таргетированное действие на опухолевые клетки и, как правило, обладает относительно низкой токсичностью [6]. Преимущество противораковых вакцин по сравнению с пассивной иммунотерапией заключается в том, что благодаря индукции Т-клеток памяти снижается вероятность рецидива заболевания [37]. Успешным примером профилактических вакцин против инфекционных агентов, которые могут вызывать рак, являются вакцины против ряда вирусов папилломы человека, приводящих к развитию рака, и против вируса гепатита В [36].

Онколитические вирусы способны селективно заражать раковые клетки и реплицироваться в них, вызывая их лизис. Клинические исследования показали, что терапия онколитическими вирусами является безопасной и высокоэффективной [40]. Например, в Китае аденовирус H101 одобрен для лечения рака головы/шеи [20].

Для разработки новых подходов к противораковой терапии используется широкий спектр вирусов, обладающих онколитическим потенциалом, в том числе вирус осповакцины, вирус везикулярного стоматита, вирус Синдбис, вирус леса Семлики, вирус болезни Ньюкасла, вирус простого герпеса и другие [29]. Оказалось, что онколитические вирусы имеют двойной механизм действия против опухолей [29]. Во-первых, онколитические вирусы непосредственно вызывают лизис зараженных клеток опухоли (онколиз). Во-вторых, введение онколитических вирусов способствует активации иммунной системы (в первую очередь Т-лимфоцитов), что приводит к более эффективной элиминации опухолевых клеток [32, 51], а также способствует развитию долгосрочного противоопухолевого иммунитета [43]. Для активации противоопухолевых Т-клеток основным условием является представление фрагментов опухолевых антигенов молекулами главного комплекса гистосовместимости на поверхности антигенпредставляющих клеток [23]. Имуногенные пептидные фрагменты — Т-клеточные эпитопы — обычно имеют длину около 8-18 аминокислот и представляются молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) I или II класса, что приводит к активации антигенспецифических CD8⁺ и CD4⁺Т-лимфоцитов соответственно [47]. Опухолевые антигены могут быть получены из пептидных фрагментов мутированных онкобелков и опухолевых супрессоров, сверхэкспрессированных клеточных белков, модифицированных гликопротеинов, онкофетальных белков, тканеспецифичных белков дифференцировки и белков, полученных из онкогенных вирусов [12, 70]. Идентификация таких опухолевых антигенов и перспективных Т-клеточных эпитопов для активации антигенспецифического противоракового иммунного ответа представляет собой очень перспективную область для развития средств иммунотерапии рака [5].

Модели экспериментальной онкологии, основанные на перевиваемых опухолях

Проведение исследований рака на культурах клеток *in vitro* не обеспечивает полноценной картины, так как отсутствует микроокружение опухоли, васкуляризация, воздействие иммунной системы и т.д. Использование лабораторных животных (особенно мышей и крыс) в качестве *in vivo* моделей позволяет преодолеть часть этих ограничений. В настоящее время в исследованиях раковых заболеваний активно используются аллографтные и ксенографтные опухолевые модели. Аллогенная трансплантация представляет собой перенос клеток, органов или тканей от одного организма к другому организму того же вида [45].

В ксенографтных моделях опухолевые клетки человека переносят в иммунодефицитных мышей, у которых не происходит отторжения клеток другого организма [55]. Для ксенотрансплантации используются как клеточные линии, так и клетки опухоли, полученные от пациентов. Ксенотрансплантация линий клеток человека мышам является одной из наиболее простых и часто используемых модельных систем. Такие модели могут быть успешно использованы для исследований генетики рака, однако они имеют такие ограничения, как сниженная внутриопухолевая гетерогенность, а также слабая способность предсказывать клинически эффективные методы лечения. Кроме того, зачастую используемые линии клеток относятся к высокоагрессивным злокачественным опухолям, что не позволяет изучать ранние события, происходящие при развитии первичной опухоли [30]. Ксенотрансплантация клеток, полученных от пациента, позволяет преодолеть часть ограничений моделей, использующих клеточные линии. При таком подходе сохраняются многие важные особенности первичной опухоли человека, в том числе кинетика роста опухоли, гистологические особенности, инвазивность, метастатическая способность и соответствующий ответ на терапию [15, 27, 41, 74]. Однако остаются ограничения, связанные с межвидовыми различиями микроокружения опухоли и отсутствием полноценного иммунного ответа у иммунодефицитных животных. Следует также отметить, что создание ксенографтных моделей с использованием клеток пациентов требует значительного времени (от нескольких месяцев до лет), что сильно ограничивает их применение в клинике. Тем не менее такие модели имеют большой потенциал для доклинических исследований [30].

В настоящее время рассматриваются три основные модели индукции опухоли: ортотопическая, гетеротопическая и метастатическая [61, 73]. В ортотопической модели опухолевые клетки вводятся в место происхождения опухоли. В гетеротопической модели клетки вводят в подкожное пространство. В метастатической модели опухолевые клетки чаще всего вводят либо в латеральную хвостовую вену мыши, либо внутрикардиально (в левый желудочек сердца) [33, 73]. Также используются внутрибрюшинные, внутрикостные (в голень или бедренную кость), внутриселезеночные или внутривенные инъекции [4, 60, 67]. Далее опухолевые клетки метастазируют, поражая различные органы.

Наиболее распространенной является подкожная гетеротопическая модель из-за ее относительной простоты, в связи с чем данная модель часто используется для быстрого скрининга по-

тенциальных терапевтических соединений, в том числе для поиска новых противораковых препаратов [34]. Суспензия опухолевых клеток обычно вводится в правый и/или левый бок мыши [61]. Суспензия должна содержать порядка 10^6 клеток на 0,1 мл для образования твердой опухоли, так как использование малого числа клеток может привести к отсутствию роста ксенотрансплантата [18]. Обычно опухоль становится видимой примерно через две-шесть недель в зависимости от типа клеток, места введения, восприимчивости хозяина и т.д. [16, 61]. Необходимо постоянно оценивать рост опухоли (порядка двух-трех раз в неделю), так как некоторые клеточные линии могут не образовывать твердых опухолей у мышей или их образование может быть затруднено, как, например, в случае с клетками карциномы САК11 [77]. Измеряются длина l — наибольший продольный диаметр и ширина w — наибольший поперечный диаметр опухоли [48, 49]; эти параметры используются для определения площади, которая рассчитывается как $l \cdot w$, или объема — $1/2(l \cdot w^2)$ опухоли [54, 76].

Для метастатической модели следует отметить такие преимущества, как быстрое развитие опухоли и хорошая воспроизводимость [33]. Однако метастатическая и гетеротопическая модели имеют свои недостатки, поскольку они неточно отражают клинический сценарий развития первичной опухоли в связи с отсутствием соответствующего микроокружения [33]. Кроме того, в метастатических моделях отсутствуют ранние стадии канцерогенеза, и структура метастатических эмболов, образовавшихся в кровотоке, отличается от структуры таковых, наблюдаемой в опухолях, метастазирующих спонтанно [33, 34, 71].

В ортотопической модели опухолевые клетки вводятся либо путем прямой инъекции, либо путем микрохирургической имплантации в орган происхождения опухоли. Было показано, что опухоли, введенные прямой инъекцией, имеют более низкие показатели метастазирования и сильнее отличаются по структуре от первичной опухоли по сравнению с микрохирургической имплантацией [73]. Для микрохирургической имплантации обычно используют 1 мм^3 опухолевой ткани [26, 28, 62]. При введении опухоли путем прямой инъекции используется такое же количество клеток, как и в подкожной модели [24, 26, 78]. Считается, что в ортотопических моделях микроокружение органа животного способствует развитию опухоли, более приближенному к аналогичному у человека [73]. Показано также, что в ортотопических моделях более часто, чем в подкожных, наблюдается спонтанное метастазирование [33]. Ответ на применение противоо-

пухоловых препаратов в ортотопической модели лучше коррелирует с активностью лекарств, наблюдаемой в клинической практике [28]. В связи с этим во многих случаях использование ортотопических моделей является наилучшим выбором при изучении роста опухоли, проведении фармакологических исследований и разработке методов диагностики [28, 73].

Линии мышей, используемые как модели экспериментальной онкологии, основанные на перевиваемых опухолях

Одной из первых описанных линий мышей [17], используемых как экспериментальные модели для изучения рака, являются атимические голые мыши Nude (Nu). Генетическая особенность этих мышей связана с наличием мутации с потерей функции двух копий гена FoxN1 [42]. Важнейшей особенностью голых Nude мышей является отсутствие тимуса [50]. В норме специфический Т-клеточный иммунный ответ вовлечен в уничтожение инфицированных и злокачественных клеток, а также участвует в реакции отторжения трансплантата хозяином [7, 58]. У голых Nude мышей в связи с отсутствием тимуса наблюдается значительный дефицит Т-лимфоцитов, что дает возможность для приживления, роста и метастазирования опухолевых клеток ксенотрансплантата [71, 72]. У бестимусных голых Nude мышей обычно развивается зачаток тимуса, который образован эпителиальными клетками-предшественниками, однако, его созревания не происходит [53]. При отсутствии белка FoxN1 из-за рецессивной мутации *nu/nu* нарушается дифференцировка и пролиферация эпителиальных клеток тимуса, васкуляризация тимуса, а также созревание предшественников Т-лимфоцитов [73]. Наиболее ярким внешним фенотипическим признаком голых мышей Nude является отсутствие шерстного покрова. При рождении волосные фолликулы имеют нормальную структуру, однако по мере роста волосы начинают скручиваться в области волосной воронки (*infundibulum*), в результате чего они не проникают в эпидермис [17, 42]. У атимических голых мышей наблюдается также замедленный рост, снижение фертильности, недоразвитие молочных желез, отсутствие вибриссов при рождении и сниженная продолжительность жизни (от 6 месяцев до одного года) [17]. Поскольку у бестимусных голых мышей недостаточно развиты молочные железы, самки не способны к полноценному выкармливанию потомства. В связи с этим при разведении самцов голых мышей Nude скрещивают с гетерозиготными самками [31]. Интересно отметить, что гетерозиготы не имеют заметных фенотипических изме-

нений, за исключением небольших отклонений размера тимуса и изменений иммунного ответа по сравнению со здоровыми мышами [31].

Следует отметить, что использование атимических голых мышей имеет определенные ограничения, поскольку иммунодефицит, наблюдаемый у данных мышей, является тяжелым, но не абсолютным [73]. Несмотря на то, что уровень Т-клеток ничтожно мал, врожденный иммунитет остается активным, что может отрицательно влиять на скорость приживления и рост большинства первичных твердых опухолей и на их способность образовывать метастазы, а также делает невозможным приживление злокачественных гемопоэтических клеток [63, 64]. Поскольку активность Т-клеток возрастает с возрастом, для повышения скорости приживления и воспроизводимости результатов целесообразно использовать молодых животных в возрасте 5-10 недель [21, 39, 49]. Несмотря на эти ограничения, атимические голые мыши успешно используются в качестве *in vivo* модели для изучения приживления, роста, инвазии и метастазирования раковых клеток [73]. Кроме того, у бестимусных голых мышей относительно легко отслеживать рост опухолей из-за естественного отсутствия шерстного покрова.

В настоящее время выведено несколько линий мышей, которые несут мутацию *nude* гена FoxN1, полученных путем скрещивания атимических голых мышей с другими линиями мышей, такими как Balb/c, CD-1 или NMRI [73]. Другая линия иммунодефицитных мышей CB17, называемых также SCID (тяжелого комбинированного иммунодефицита — *severe combined immunodeficiency*), несет спонтанную мутацию в гене *Prkdc*, которая приводит к нарушению развития зрелых Т- и В-лимфоцитов. Мыши линии *hairless* SCID гомозиготны как по мутации *Hr^{hr}*, так и по *Prkdc^{scid}*, поэтому демонстрируют иммунодефицитный фенотип, характерный для SCID-мышей, и при этом лишены шерсти [22]. Примером тяжелого комбинированного иммунодефицита является линия Nude/SCID [56]. Линия мышей *Rag1^{null}* характеризуется полным отсутствием зрелых Т- и В-клеток, в отличие от гомозигот *Prkdc^{scid}*, которые продуцируют некоторые количества В-клеток и IgM [44, 66]. Мыши линии *Rag2^{null}* имеют дефекты гемопоэтической и иммунной систем, включая нарушения развития В- и Т-клеток на этапе про-В и про-Т-клеток соответственно [25, 38]. Другой важной моделью является линия иммунодефицитных мышей, несущих мутацию в гене гамма-цепи рецептора интерлейкина-2 (*IL2rg^{null}*). Эта мутация в сочетании с мутациями *scid*, *Rag1^{null}* или *Rag2^{null}* приводит к тому, что у мышей полностью отсут-

ствуется адаптивный иммунитет и сильно снижен врожденный иммунитет. Другим примером сочетанного нарушения иммунитета может служить линия мышей SCID Beige, в которой представлены мутации в генах *Prkdc* и *Lyst*. Ген *Lyst* кодирует регулятор лизосомного транспорта и его мутации приводят к тяжелым нарушениям функций натуральных киллеров [19]. Мыши линии NIH-III несут мутации в трех генах: *nude* (ген *FoxN1*), приводящую к отсутствию тимуса и Т-клеточного иммунного ответа; *beige* (ген *Lyst*), связанную с нарушениями натуральных киллеров; и в гене *xid*, связанном с X-хромосомой, определяющим недостаточность гуморального иммунитета и созревания В-лимфоцитов [14]. Линия NOD SCID была получена при переносе мутации *scid* в гене *Prkdc* в линию диабетических мышей, не страдающих ожирением (NOD), несущих мутацию в гене *SIRP1α*. Такие мыши имеют нарушения Т- и В-лимфоцитов, а также натуральных киллеров [52]. Другой интересной моделью являются мыши линии NSG (NOD/scid/IL-2γ-receptor null), которые имеют фенотип *scid*, NOD, связанный с полиморфизмом *SIRP1α*, а также мутации в гене гамма цепи рецептора интерлейкина-2 (IL-2Rγс). Мутация *SIRP1α* обеспечивает взаимодействие *SIRP1α* и *CD47*, вследствие чего не происходит фагоцитоза клеток человека моноцитами мыши, а мутация гамма-цепи рецептора интерлейкина-2 приводит к дефициту натуральных киллеров и нарушению путей передачи сигнала от IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21 [35]. Примером иммунодефицитных крыс, используемых для исследований рака, являются крысы линии NIH nude, которые были выведены в 1979-1980 гг. У таких крыс наблюдается дефицит Т-клеток и нарушения в тимусзависимых зонах периферических лимфоидных органов [75]. Описанные выше животные очень восприимчивы к трансплантации человеческих клеток, тканей и первичных опухолей [63, 65, 73]. На основании этих линий выведено большое число новых моделей для проведения исследований раковых заболеваний. Так, например, в электронном каталоге Лаборатории Джексона (Jackson Laboratory, <https://www.jax.org/mouse-search>) по запросу "xenograft" представлено 196 результатов, которые соответствуют линиям мышей, подходящим для проведения ксенотрансплантации.

Воссоздание иммунной системы человека у мышей, используемых как модели экспериментальной онкологии

Для разработки и оценки эффективности новых способов иммунотерапии рака крайне желательно наличие полного набора функциональных иммунных клеток человека в модели [11].

В настоящее время разработаны методы воздействия как на иммунную систему мышей, так и на перевиваемые опухоли для создания гуманизированных мышей, путем совместной трансплантации фрагмента опухоли с человеческими CD34⁺ гемопоэтическими стволовыми клетками, изолированными из пуповинной крови, костного мозга или периферической крови одного донора или независимых доноров [46, 69]. Например, для клеточной линии рака молочной железы человека, перенесенной в печень мышей линии NSG совместно с CD34⁺ гемопоэтическими стволовыми клетками человека, выделенными из пуповинной крови, через пять недель иммунные клетки человека определялись во всех тканях мыши-реципиента, а опухолевые клетки были обнаружены в легких и костном мозге [13]. Через три месяца после трансплантации опухолевые клетки и макроскопические опухоли идентифицировались в печени и селезенке и рост опухоли сопровождался экспрессией маркеров созревания и активации Т-клеток [13]. Использование CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток человека позволяет восстанавливать человеческие лимфоциты и клетки врожденного иммунитета без реакции отторжения трансплантата, однако существует ограничение, связанное с тем, что для человеческих Т-клеток в этой модели отсутствует иммунологическое «обучение» в тимусе из-за отсутствия человеческого тимуса у мышей-реципиентов [13]. Кроме того, трансплантация CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток независимого донора приводит к развитию натуральных киллеров, экспрессирующих KIR рецепторы человека, которые могут не соответствовать HLA донора опухоли, что может влиять на активность натуральных киллеров по отношению к трансплантированной опухоли [1].

Другой подход к частичному воссозданию иммунной системы человека у модельных мышей заключается во введении мононуклеарных клеток периферической крови человека мыши-реципиенту [13], причем мононуклеарные и опухолевые клетки также могут быть получены как от одного донора [10, 59], так и от разных [9, 57]. Несмотря на то, что и в первом, и во втором случаях совместное введение мононуклеарных клеток периферической крови человека и опухолевых клеток позволяет моделировать функции человеческой иммунной системы у мышей-реципиентов, в случае разных человеческих доноров этот подход подходит в основном для краткосрочных экспериментов, поскольку он ограничен быстрым развитием реакции отторжения трансплантата, которая может приводить к завышению оценки успеха тестируемого лечения [8]. Использование

опухолевой ткани, а также стволовых клеток, полученных из костного мозга, и тканей тимуса одного донора значительно бы улучшило качество моделей [65], однако такой подход является весьма инвазивным и поэтому в настоящее время не может быть широко применим [8].

При трансплантации опухоли человека была показана возможность переноса мышам-реципиентам также и клеток иммунной системы человека, инфильтрирующих ткани опухоли [68]. В этой модели была проведена подкожная трансплантация ненарушенной первичной опухоли легкого человека, которая привела к успешному приживлению опухоли, а также развитию человеческих Т-клеток у мышей. Через несколько месяцев иммунные клетки человека были обнаружены в селезенке, легких, печени, почках и кишечнике мыши и имели фенотип эффекторных Т-клеток памяти [68]. Аналогичный подход был применен и в другой работе, где опухолевые клетки яичников, строма, лимфоциты и фибробласты опухоли, полученные из биопсий пациентов, были успешно перенесены мышам линии NSG [2]. Было показано, что перенесенные иммунные клетки человека оставались функциональными, что подтверждалось их способностью реагировать на стимуляцию цитокинами [2].

Заключение

Таким образом, за последние несколько десятилетий был разработан целый ряд животных моделей для скрининга и доклинического тестирования противораковых препаратов [3]. В настоящее время активно используются линии иммунодефицитных мышей, например SCID или атимические голые мыши Nude, которые могут быть использованы как модели человеческих опухолей [73]. Возможна трансплантация как различных опухолевых клеточных линий, так и материала биопсий пациентов.

Описанные выше модели могут быть использованы для исследований новых способов иммунотерапии рака *in vivo*, однако вопросы о механизмах взаимодействия иммунной системы и перевиваемой опухоли, а также соответствия реакций иммунной системы даже в гуманизированных моделях и естественных реакций иммунной системы человека являются крайне сложными и требуют дальнейшего изучения. Результаты, полученные в таких моделях, несмотря на их огромное практическое и теоретическое значение, следует транслировать на человеческий организм с большой осторожностью. При планировании экспериментов необходим тщательный анализ ограничений каждой из моделей.

Список литературы / References

1. Augusto D.G. The impact of KIR polymorphism on the risk of developing cancer: not as strong as imagined? *Front. Genet.*, 2016, Vol. 7, p. 121.
2. Bankert R.B., Balu-Iyer S.V., Odunsi K., Shultz L.D., Kelleher R.J.Jr, Barnas J.L., Simpson-Abelson M., Parsons R., Yokota S.J. Humanized mouse model of ovarian cancer recapitulates patient solid tumor progression, ascites formation, and metastasis. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 9, e24420. doi:10.1371/journal.pone.0024420.
3. Bankert R.B., Hess S.D., Egilmez N.K. SCID mouse models to study human cancer pathogenesis and approaches to therapy: potential, limitations, and future directions. *Front. Biosci.*, 2002, Vol. 7, pp. 44-62.
4. Bollard J., Couderc C., Blanc M., Poncet G., Lepinasse F., Hervieu V., Gouysse G., Ferraro Peyret C., Benslama N., Walter T., Scoazec J.Y., Roche C. Antitumor effect of everolimus in preclinical models of high-grade gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas. *Neuroendocrinology*, 2013, Vol. 97, pp. 331-340.
5. Buonaguro L., Petrizzo A., Tornesello M.L., Buonaguro F.M. Translating tumor antigens into cancer vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011, Vol. 18, no. 1, pp. 23-34.
6. Butterfield L.H. Lessons learned from cancer vaccine trials and target antigen choice. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016, Vol. 65, no. 7, pp. 805-812.
7. Cadili A., Kneteman N. The role of macrophages in xenograft rejection. *Transplant. Proc.*, 2008, Vol. 40, pp. 3289-3293.
8. Cassidy J.W., Caldas C., Bruna A. Maintaining tumor heterogeneity in patient-derived tumor xenografts. *Cancer Res.*, 2015, Vol. 75, no. 15, pp. 2963-2968.
9. Chang D.K., Moniz R.J., Xu Z., Sun J., Signoretti S., Zhu Q., Marasco W.A. Human anti-CAIX antibodies mediate immune cell inhibition of renal cell carcinoma *in vitro* and in a humanized mouse model *in vivo*. *Mol. Cancer*, 2015, Vol. 14, p. 119.
10. Chester C., Ambulkar S., Kohrt H.E. 4-1BB agonism: adding the accelerator to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016, Vol. 65, no. 10, pp. 1243-1248.
11. Cho S.Y., Kang W., Han J.Y., Min S., Kang J., Lee A., Kwon J.Y., Lee C., Park H. An integrative approach to precision cancer medicine using patient-derived xenografts. *Mol. Cells*, 2016, Vol. 39, no. 2, pp. 77-86.
12. Coulie P.G., van den Eynde B.J., van der Bruggen P., Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2014, Vol. 14, no. 2, pp. 135-146.

13. Decker W.K., da Silva R.F., Sanabria M.H., Angelo L.S., Guimarães F., Burt B.M., Kheradmand F., Paust S. Cancer immunotherapy: historical perspective of a clinical revolution and emerging preclinical animal models. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, p. 829.
14. Defosse D.L., Duray P.H., Johnson R.C. The NIH-3 immunodeficient mouse is a model for Lyme borreliosis myositis and carditis. *Am. J. Pathol.*, 1992, Vol. 141, no. 1, p. 3.
15. DeRose Y.S., Wang G., Lin Y.-C., Bernard P.S., Buys S.S., Ebbert M.T.W., Factor R., Matsen C., Milash B.A., Nelson E., Neumayer L., Randall R.L., Stijleman I.J., Welm B.E., Welm A.L. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, pp. 1514-1520.
16. Dipersio L.P. Regional growth differences of human tumour xenografts in nude mice. *Lab. Anim.*, 1981, Vol. 15, pp. 179-180.
17. Flanagan S.P. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.*, 1966, Vol. 8, pp. 295-309.
18. Fogh J., Fogh J.M., Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1977, Vol. 59, pp. 221-226.
19. Froidevaux S., Looor F. A quick procedure for identifying doubly homozygous immunodeficient scid beige mice. *J. Immunol. Methods*, 1991, Vol. 137, no. 2, pp. 275-279.
20. Garber K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2006, Vol. 98, pp. 298-300.
21. Giovanella B.C., Fogh J. The nude mouse in cancer research. *Adv. Cancer Res.*, 1985, Vol. 44, pp. 69-120.
22. Gotoh K., Kariya R., Matsuda K., Hattori S., Vaeteewoottacharn K., Okada S. A novel EGFP-expressing nude mice with complete loss of lymphocytes and NK cells to study tumor-host interactions. *Biosci. Trends*, 2014, Vol. 8, no. 4, pp. 202-205.
23. Grakoui A., Bromley S.K., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M., Dustin M.L. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 1999, Vol. 285, no. 5425, pp. 221-227.
24. Greco A., Albanese S., Auletta L., Mirabelli P., Zannetti A., d'Alterio C., di Maro G., Orlandella F.M., Salvatore G., Soricelli A., Salvatore M. High-frequency ultrasound-guided injection for the generation of a novel orthotopic mouse model of human thyroid carcinoma. *Thyroid*, 2016, Vol. 26, pp. 552-558.
25. Hao Z., Rajewsky K. Homeostasis of peripheral B cells in the absence of B cell influx from the bone marrow. *J. Exp. Med.*, 2001, Vol. 194, no. 8, pp. 1151-1164.
26. He L., Tian D.-A., Li P.-Y., He X.-X. Mouse models of liver cancer: progress and recommendations. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, pp. 23306-23322.
27. Hidalgo M., Amant F., Biankin A.V., Budinska E., Byrne A.T., Caldas C., Clarke R.B., de Jong S., Jonkers J., Maelandsmo G.M., Roman-Roman S., Seoane J., Trusolino L., Villanueva A. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.*, 2014, Vol. 4, pp. 998-1013.
28. Hoffman R.M. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest. New Drugs*, 1999, Vol. 17, pp. 343-359.
29. Holay N., Kim Y., Lee P., Gujar S. Sharpening the edge for precision cancer immunotherapy: targeting tumor antigens through oncolytic vaccines. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, p. 800.
30. Holen I., Speirs V., Morrissey B., Blyth K. *In vivo* models in breast cancer research: progress, challenges and future directions. *Dis. Model. Mech.*, 2017, Vol. 10, no. 4, pp. 359-371.
31. Holub M. The nude mouse. *ILAR J.*, 1992, Vol. 34, pp. 1-3.
32. Kaufman H.L., Kohlhaas F.J., Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2015, Vol. 14, no. 9, pp. 642-662.
33. Khanna C., Hunter K. Modeling metastasis *in vivo*. *Carcinogenesis*, 2005, Vol. 26, pp. 513-523.
34. Killion J.J., Radinsky R., Fidler I.J. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev.*, 1998, Vol. 17, pp. 279-284.
35. Kinter A.L., Godbout E.J., McNally J.P., Sereti I., Roby G.A., O'Shea M.A., Fauci A.S. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 10, pp. 6738-6746.
36. Klebanoff C.A., Acquavella N., Yu Z., Restifo N.P. Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? *Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 239, no. 1, pp. 27-44.
37. Kudrin A., Hanna Jr M.G. Overview of the cancer vaccine field: are we moving forward? *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2012, Vol. 8, no. 8, pp. 1135-1140.
38. Lang J., Weiss N., Freed B.M., Torres R.M., Pelanda R. Generation of hematopoietic humanized mice in the newborn BALB/c-Rag2 null Il2r γ null mouse model: a multivariable optimization approach. *Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 140, no. 1, pp. 102-116.
39. Liu Z., Sun Y., Hong H., Zhao S., Zou X., Ma R., Jiang C., Wang Z., Li H., Liu H. 3-bromopyruvate enhanced daunorubicin-induced cytotoxicity involved in monocarboxylate transporter 1 in breast cancer cells. *Am. J. Cancer Res.*, 2015, Vol. 5, pp. 2673-2685.
40. Mansfield D.C., Kyula J.N., Rosenfelder N., Chao-Chu J., Kramer-Marek G., Khan A.A., Roulstone V., McLaughlin M., Melcher A.A., Vile R.G., Pandha H.S., Khoo V., Harrington K.J. Oncolytic vaccinia virus as a

vector for therapeutic sodium iodide symporter gene therapy in prostate cancer. *Gene Ther.*, 2016, Vol. 23, no. 4, pp. 357-368.

41. Marangoni E., Vincent-Salomon A., Auger N., Degeorges A., Assayag F., de Cremoux P., de Plater L., Guyader C., de Pinieux G., Judde J.-G., Rebucci M., Tran-Perennou C., Sastre-Garau X., Sigal-Zafrani B., Delattre O., Diéras V., Poupon M.F. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin. Cancer Res.*, 2007, Vol. 13, pp. 3989-3998.

42. Mecklenburg L., Tychsen B., Paus R. Learning from nudity: lessons from the nude phenotype. *Exp. Dermatol.*, 2005, Vol. 14, pp. 797-810.

43. Melcher A., Parato K., Rooney C.M., Bell J.C. Thunder and lightning: immunotherapy and oncolytic viruses collide. *Mol. Ther.*, 2011, Vol. 19, no. 6, pp. 1008-1016.

44. Mombaerts P., Iacomini J., Johnson R.S., Herrup K., Tonegawa S., Papaioannou V.E. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 1992, Vol. 68, no. 5, pp. 869-877.

45. Moore J.C., Langenau D.M. Allograft cancer cell transplantation in zebrafish. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2016, Vol. 916, pp. 265-287.

46. Morton J.J., Bird G., Refaeli Y., Jimeno A. Humanized mouse xenograft models: narrowing the tumor-microenvironment gap. *Cancer Res.*, 2016, Vol. 76, no. 21, pp. 6153-6158.

47. Neefjes J., Ovaa H. A peptide's perspective on antigen presentation to the immune system. *Nat. Chem. Biol.*, 2013, Vol. 9, no. 12, pp. 769-775.

48. Nölting S., Giubellino A., Tayem Y., Young K., Lauseker M., Bullova P., Schovanek J., Anver M., Fliedner S., Korbonits M., Göke B., Vlotides G., Grossman A., Pacak K. Combination of 13-Cis retinoic acid and lovastatin: marked antitumor potential *in vivo* in a pheochromocytoma allograft model in female athymic nude mice. *Endocrinology*, 2014, Vol. 155, pp. 2377-2390.

49. Pacak K., Sirova M., Giubellino A., Lencesova L., Csaderova L., Hudecova S., Krizanov O. NF- κ B inhibition significantly upregulates the norepinephrine transporter system, causes apoptosis in pheochromocytoma cell lines and prevents metastasis in an animal model. *Int. J. Cancer*, 2012, Vol. 131, pp. 2445-2455.

50. Pantelouris E.M. Athymic development in the mouse. *Differentiation*, 1973, Vol. 1, pp. 437-450.

51. Parato K.A., Senger D., Forsyth P.A.J., Bell J.C. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat. Rev. Cancer*, 2005, Vol. 5, no. 12, pp. 965-976.

52. Prochazka M.I.C.H.A.L., Gaskins H.R., Shultz L.D., Leiter E.H. The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, Vol. 89, no. 8, pp. 3290-3294.

53. Prowse D.M., Lee D., Weiner L., Jiang N., Magro C.M., Baden H.P., Brissette J.L. Ectopic expression of the nude gene induces hyperproliferation and defects in differentiation: implications for the self-renewal of cutaneous epithelia. *Dev. Biol.*, 1999, Vol. 212, pp. 54-67.

54. Rahal O.M., Nie L., Chan L.-C., Li C.-W., Hsu Y.-H., Hsu J., Yu D., Hung M.-C. Selective expression of constitutively active pro-apoptotic protein BikDD gene in primary mammary tumors inhibits tumor growth and reduces tumor initiating cells. *Am. J. Cancer Res.*, 2015, Vol. 5, pp. 3624-3634.

55. Richmond A., Su Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis. Model. Mech.*, 2008, Vol. 1, no. 2-3, pp. 78-82.

56. Romano R., Palamaro L., Fusco A., Iannace L., Maio S., Vigliano I., Giardino G., Pignata C. From murine to human nude/SCID: the thymus, T-cell development and the missing link. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, Vol. 2012, 467101. doi: 10.1155/2012/467101.

57. Roth M.D., Harui A. Human tumor infiltrating lymphocytes cooperatively regulate prostate tumor growth in a humanized mouse model. *J. Immunother. Cancer*, 2015, Vol. 3, p. 12.

58. Ruiz P., Maldonado P., Hidalgo Y., Gleisner A., Sauma D., Silva C., Saez J.J., Nuñez S., Roseblatt M., Bono M.R. Transplant tolerance: new insights and strategies for long-term allograft acceptance. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, 210506. doi: 10.1155/2013/210506.

59. Sanmamed M.F., Pastor F., Rodriguez A., Perez-Gracia J.L., Rodriguez-Ruiz M.E., Jure-Kunkel M., Melero I. Agonists of co-stimulation in cancer immunotherapy directed against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS. *Semin. Oncol.*, 2015, Vol. 42, no. 4, pp. 640-655.

60. Saxena M., Christofori G. Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Mol. Oncol.*, 2013, Vol. 7, pp. 283-296.

61. Schuh J.C.L. Trials, tribulations, and trends in tumor modeling in mice. *Toxicol. Pathol.*, 2004, Vol. 32, pp. 53-66.

62. Scott C.L., Mackay H.J., Haluska P. Patient-derived xenograft models in gynecological malignancies. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book*, 2014, Vol. 3, pp. e258-e266.

63. Shultz L.D., Brehm M.A., Garcia-Martinez J.V., Greiner D.L. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 786-798.

64. Shultz L.D., Goodwin N., Ishikawa F., Hosur V., Lyons B.L., Greiner D.L. Human cancer growth and therapy in NOD/SCID/IL2R γ null (NSG) mice. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2014, Vol. 2014, pp. 694-708.

65. Shultz L.D., Ishikawa F., Greiner D.L. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 2, pp. 118-130.

66. Shultz L.D., Lang P.A., Christianson S.W., Gott B., Lyons B., Umeda S., Leiter E., Hesselton R., Wagar E.J., Leif J.H., Kollet O., Lapidot T., Greiner D.L. NOD/LtSz-Rag1null mice: an immunodeficient and human

hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, pp. 2496-2507.

67. Simmons J.K., Hildreth B.E., Supsavhad W., Elshafae S.M., Hassan B.B., Dirksen W.P., Toribio R.E., Rosol T.J. Animal models of bone metastasis. *Vet. Pathol.*, 2015, Vol. 52, pp. 827-841.

68. Simpson-Abelson M.R., Sonnenberg G.F., Takita H., Yokota S.J., Conway T.F. Jr., Kelleher R.J. Jr., Shultz L.D., Barcos M., Bankert R.B. Long-term engraftment and expansion of tumor-derived memory T cells following the implantation of non-disrupted pieces of human lung tumor into NOD-scid IL2Rgamma(null) mice. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 10, pp. 7009-7018.

69. Siolas D., Hannon G.J. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res.*, 2013, Vol. 73, no. 17, pp. 5315-5319.

70. Srinivasan R., Wolchok J.D. Tumor antigens for cancer immunotherapy: therapeutic potential of xenogeneic DNA vaccines. *J. Transl. Med.*, 2004, Vol. 2, no. 1, p. 12.

71. Stakleff K.D.S., von Gruenigen V.E. Rodent models for ovarian cancer research. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2003, Vol. 13, pp. 405-412.

72. Sun L., Li H., Luo H., Zhao Y. Thymic epithelial cell development and its dysfunction in human diseases. *Biomed Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 206929. doi:10.1155/2014/206929.

73. Szadvari I., Krizanov O., Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol. Res.*, 2016, Vol. 65 (S. 4), pp. S441-S453.

74. Tentler J.J., Tan A.C., Weekes C.D., Jimeno A., Leong S., Pitts T.M., Arcaroli J.J., Messersmith W.A., Eckhardt S.G. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2012, Vol. 9, pp. 338-350.

75. Thomas F.T., Marchman W., Carobbi A., DeMasi R., Araneda D., Patselas T., Larkin E., Pittman K., Alqaisi M., Haisch C., Thomas J.M. Immunobiology of xenografting in rodents. In Cooper D.K.C., Kemp E., Reemtsma K., White D.J.G. (eds) *Xenotransplantation*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1991, pp. 139-160.

76. Tomayko M.M., Reynolds C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1989, Vol. 24, pp. 148-154.

77. Workman P., Aboagye E.O., Balkwill F., Balmain A., Bruder G., Chaplin D.J., Double J.A., Everitt J., Farningham D.A., Glennie M.J., Kelland L.R., Robinson V., Stratford I.J., Tozer G.M., Watson S., Wedge S.R., Eccles S.A. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br. J. Cancer*, 2010, Vol. 102, pp. 1555-1577.

78. Xiong Y., Kotian S., Zeiger M.A., Zhang L., Kebebew E. miR-126-3p inhibits thyroid cancer cell growth and metastasis, and is associated with aggressive thyroid cancer. *PloS ONE*, 2015, Vol. 10, e0130496. doi: 10.1371/journal.pone.0130496.

Авторы:

Непомнящих Т.С. — к.б.н., старший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Гаврилова Е.В. — к.б.н., заместитель генерального директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Максютов Р.А. — д.б.н., генеральный директор ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Authors:

Nepomnyashchikh T.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Gavrilova E.V., PhD (Biology), Deputy Director General for Research, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Maksyutov R.A., PhD, MD (Biology), General Director, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Поступила 07.09.2018
Принята к печати 19.09.2018

Received 07.09.2018
Accepted 19.09.2018

ПРОДУКЦИЯ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ СИНОВИАЛЬНЫМИ ФИБРОБЛАСТАМИ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ *IN VITRO* ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МОДУЛЯТОРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК: ПОИСКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Шнайдер М.А., Ширинский В.С., Калиновская Н.Ю.,
Ширинский И.В.

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

Резюме. С целью изучения влияния модуляторов метилирования ДНК на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов фибробластоподобными синовиальными клетками (ФСК) использовали клетки, полученные из синовиальной ткани 8 больных активным РА после 3-7 пассажей культивирования *in vitro*. Показано, что фенофибрат не изменял показатели 5-метилцитозина в ФСК, генистеин и адеметионин их увеличивали на 35%, а гидралазин в два раза уменьшал. Выявлена спонтанная продукция IL-6, IL-17, IL-18 и IL-10 в культурах ФСК, добавление IL-1β значительно усиливало синтез цитокинов. Донаторы метилирования ДНК снижали содержание IL-6 в культурах ФСК. Адеметионин в максимальной концентрации, в отличие от гидралазина и генистеина, снижал продукцию IL-18. Уровень IL-17 уменьшался при действии модуляторов в малых дозах, а продукция IL-10 практически не менялась. Заключается, что действие модуляторов метилирования на синтез провоспалительных и противовоспалительных цитокинов ФСК связано не только с их влиянием на метилирование ДНК, но и опосредовано другими эпигенетическими механизмами. Культуры ФСК могут быть использованы как инструмент для доклинической оценки новых модуляторов метилирования ДНК.

Ключевые слова: фибробластоподобные синовиальные клетки, ревматоидный артрит, метилирование ДНК, цитокины, генистеин, гидралазин, адеметионин

Адрес для переписки:

Шнайдер Мария Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии» СО РАН
630047, Россия, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6.
Тел.: 8 (923) 107-51-00.
Факс: 8 (383) 228-25-47.
E-mail: minerva1986@mail.ru

Address for correspondence:

Shnayder Maria A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
Siberian Branch, Russian Academy of Sciences
630047, Russian Federation, Novosibirsk, Zalesky str., 6.
Phone: 7 (923) 107-51-00.
Fax: 7 (383) 228-25-47.
E-mail: minerva1986@mail.ru

Образец цитирования:

М.А. Шнайдер, В.С. Ширинский, Н.Ю. Калиновская,
И.В. Ширинский «Продукция про-
и противовоспалительных цитокинов синовиальными
фибробластами больных ревматоидным артритом
in vitro при использовании модуляторов метилирования
ДНК: поисковое исследование» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 231-238.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-231-238
© Шнайдер М.А. и соавт., 2019

For citation:

M.A. Shnayder, V.S. Shirinsky, N.Yu. Kalinovskaya,
I.V. Shirinsky "In vitro production of pro- and anti-
inflammatory cytokines by synovial fibroblasts of the patients
with rheumatoid arthritis when using DNA methylation
modulators: a pilot study", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2,
pp. 231-238.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-231-238
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-231-238

IN VITRO PRODUCTION OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES BY SYNOVIAL FIBROBLASTS OF THE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS WHEN USING DNA METHYLATION MODULATORS: A PILOT STUDY

Shnayder M.A., Shirinsky V.S., Kalinovskaya N.Yu., Shirinsky I.V.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The effects of DNA methylation modulators upon pro- and anti-inflammatory cytokine production by fibroblast-like synoviocytes (FLS) were evaluated using FLS obtained from synovial tissues of eight patients suffering with active RA and cultivated for 3–7 passages *in vitro*. It was shown that fenofibrate did not change levels of 5-methylcytosine (5-MeC) in FLS, whereas genistein and ademetionine increased 5-MeC concentrations by 35%, and hydralazine resulted in two-fold decrease of 5-MeC levels.

There was a spontaneous production of IL-6, IL-17, IL-18, and IL-10 by FLS cultures. Addition of IL-1 β to the cell cultures resulted into significantly up-regulated synthesis of these cytokines. Donators DNA methylation caused a decrease of IL-6 production in FLS. In contrast to hydralazine and genistein, ademetionine decreased IL-6 production by FLS. Synthesis of IL-17 was down-regulated with addition of DNA-methylation modulators at low doses, whereas no effect upon IL-10 production was revealed. In conclusion, the effects of DNA-methylation modulators upon production of pro- and anti-inflammatory cytokines by FLS are caused not only by their impact upon DNA methylation, but may be linked to other epigenetic mechanisms. FSC cultures may be used as a model for preclinical assessment of new DNA methylation modulators.

Keywords: fibroblast-like synovial cells, rheumatoid arthritis, DNA methylation, cytokines, genistein, hydralazine, ademetionine

Введение

Хроническое воспаление при ревматоидном артрите (РА) в первую очередь затрагивает синовиальную оболочку сустава, претерпевающую в процессе развития болезни смену клеточного ансамбля и внеклеточных элементов. Сложная патоморфологическая структура синовиальной оболочки (СО) — результат динамического изменения содержания и функции существующих в норме клеток (синовиоциты типа А и В) и клеток, мигрирующих в подпокровный слой СО (субпопуляции Т- и В-лимфоцитов, дендритные клетки, НК-клетки) [1]. Их появление и изменение активности скоординировано влиянием хемокинов, факторов роста, молекул адгезии, цитокинов. В содружестве с синовиоцитами клетки-мигранты реализуют воспаление в синовиальной, хрящевой и костной ткани самостоятельно на стадии «раннего РА», а также с помощью особой пролиферирующей ткани паннуса, который они формируют в стадии «позднего

РА». Поэтому изучение морфологии клеток СО, их функциональных свойств, морфофункциональных характеристик внеклеточных элементов, помогает расшифровать ключевые звенья патогенеза РА, выявить потенциальные терапевтические мишени для новых методов лечения. С этой целью уже достаточно давно используют несколько основных подходов, в том числе изучение функциональных свойств фибробластоподобных синовиальных клеток (ФСК) от больных РА в долгосрочных монослойных культурах *in vitro* [13, 18].

Показано, что ФСК больных РА характеризуются стабильным, возникающим *in vivo* и сохраняющимся после неоднократных пассажей *in vitro* фенотипом, обусловленным тотальным гипометилированием ДНК, сопоставимым по выраженности с гипометилированием ДНК в опухолевых клетках [6]. Показано, что ряд промоторов специфических генов, играющих существенную роль в патогенезе РА, находится в состоянии

гипометилирования [11]. Продемонстрирована конститутивно повышенная экспрессия такого хемокина, как CXCL12, в ФСК за счет гипометилирования его промоторной области [7], высокие уровни CXCL12, в свою очередь, стимулируют выработку матриксных металлопротеиназ (ММП), которые отвечают за деструктивное действие ФСК [5, 15]. Показано, что деметилирование даже одного CpG-мотива в промоторах генов IL-6 [4, 10] и IL-10 [3] положительно коррелирует с их уровнем экспрессии и способствует увеличению уровня цитокинов во время болезни.

В то же время в ФСК выявляются и гиперметилированные промоторы некоторых генов. Специфические CpG островки в промоторе гена рецептора смерти 3 (DR3) находились в состоянии гиперметилирования, обеспечивая устойчивость синовиальных клеток больных РА к апоптозу [14].

Описан ряд веществ, изменяющих метилирование ДНК, — индукторы метилирования, ингибиторы и соединения со смешанным действием. К числу веществ, усиливающих метилирование ДНК, относится донатор метиловой группы адемeтионин-S-аденозил-L-метионин (SAMe) [12]. Одним из деметилирующих ДНК препаратов, воздействующих на ДНК-метилтрансферазы, является антигипертензивный препарат гидралазин, оказывающий противоопухолевое действие в некоторых экспериментальных моделях [2]. К модуляторам метилирования ДНК растительного происхождения относится изофлавоноид сои генистеин, в зависимости от экспериментальной модели повышающий или понижающий метилирование ДНК [9]. Есть основания предполагать, что процессы метилирования ДНК тесно связаны с активностью некоторых гормональных ядерных рецепторов, в частности рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором (PPAR). Это послужило основанием для изучения показателей метилирования ДНК и продукции про- и противовоспалительных медиаторов ФСК больных РА *in vitro* при использовании агониста PPAR α фенофибрат и модуляторов метилирования ДНК.

Материалы и методы

Для получения культур ФСК использовали синовиальную оболочку, полученную в ходе операций эндопротезирования коленного, тазо-

бедренного суставов от 8 больных активным РА. Метод культивирования ФСК отработан достаточно давно, со временем претерпел ряд модификаций и на сегодняшний день является стандартным [13, 18].

Последовательные этапы культивирования описаны нами ранее [1], здесь мы ограничимся лишь основными сведениями:

- ткань, полученную из синовиальной оболочки коленного или тазобедренного сустава больных РА во время операции, помещали в контейнер при $t + 4^{\circ}\text{C}$;

- ткань промывали холодным PBS и помещали в 150-мм чашку Петри для удаления нежелательных тканей — жир и т.д.;

- перемещали ткань в чистую 150-мм чашку Петри и нарезали кусочками, образцы ткани переносили в колбу, содержащую раствор трипсина и PBS; инкубировали при 37°C в течение 30 мин, после инкубации удаляли супернатант;

- к оставшейся в колбе ткани добавляли раствор коллагеназы Р со средой DMEM, содержащей FBS, и продолжали инкубацию в течение двух часов при 37°C и 5% CO_2 ;

- пипетировали смесь через клеточный фильтр в пробирку объемом 50 мл, клеточную взвесь центрифугировали при 250 g 10 мин; затем удаляли супернатант, взвесь клеток размешивали, промывали добавлением 15 мл DMEM и вновь центрифугировали; количество жизнеспособных клеток подсчитывали с помощью трипанового синего.

- взвесь ресуспендировали в среднем 1×10^6 клеток в 15 мл DMEM, добавляли взвесь в T-75 флакон, содержащий 5 мл DMEM, инкубировали при 37°C и 5% CO_2 , 90% конфлюэнтность появлялась через 10-14 дней.

Для исследования применялись ФСК, культивированные между 3-7 пассажами. Уровень метилирования ДНК в синовиоцитах оценивали при помощи мышиных моноклональных антител к 5-метилцитозину и вторичных козых антител к тяжелым цепям IgG1, конъюгированных с FITC (Abcam). Содержание 5-метилцитозина оценивалось с помощью проточного цитометра и представлено как медиана интенсивности флуоресценции в окрашенных ФСК минус контроль. Для стимуляции синтеза цитокинов ФСК использовали IL-1 β (R&D Systems), который вносили в лунки в дозе 10 нг/мл на 48 часов. В опытные лунки добавляли генистеин (LC Laboratories) в дозах 5, 10, 20 мкг/мл, гидралазин (Sigma-

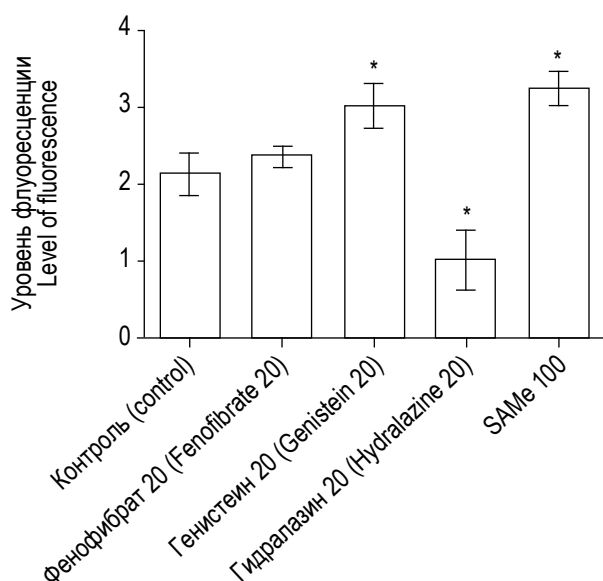


Рисунок 1. Действие фенофибрата и модуляторов метилирования ДНК на содержание 5-метилцитозина в культурах ФСК

Примечание. На оси ординат – интенсивность флуоресценции.

Figure 1. Effect of fenofibrate and modulators of DNA methylation on the content of 5-methylcytosine in cultures of FLC

Note. The fluorescence intensity is shown on the coordinate axis.

Aldrich) 5, 10, 20 мкмоль/мл и SAMe (Abbot) 25, 50, 100 мкг/мл.

Уровень IL-6, IL-18, IL-17, IL-10 в супернатантах IL-1 β стимулированных культур ФСК, помещенных в 96-луночные планшеты, оценивали с помощью стандартных наборов «Вектор-Бест» (Россия), согласно инструкции фирмы-производителя.

Описательная статистика представлена средней и стандартной ошибкой средней. Для выявления различий между сравниваемыми подгруппами использовали критерий Стьюдента.

Результаты

На рисунке 1 представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК и фенофибрата на уровень метилирования ДНК в культурах ФСК (рис. 1).

Установлено, что агонист PPAR α фенофибрат не изменял уровень иммунофлуоресценции ФСК при окрашивании на 5-метилцитозин. Внесение в культуры ФСК деметилирующего соединения гидралазина статистически значимо уменьшало

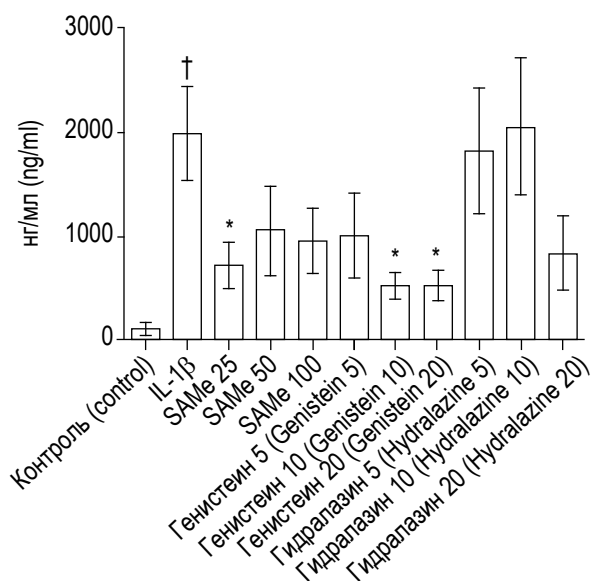


Рисунок 2. Влияние генистеина, гидралазина и SAMe в разных концентрациях на IL-1 β -стимулированную продукцию ФСК IL-6

Примечание. На этом и последующих аналогичных рисунках † – $p < 0,05$ между спонтанной и IL-1 β -стимулированной продукцией IL-6; * – $p < 0,05$ между стимулированной продукцией и добавлением модуляторов.

Figure 2. Effect of genistein, hydralazine and SAMe in different concentrations on IL-1 β induced production of FLC IL-6

Note. In this and subsequent similar Figures †, $p < 0,05$ between spontaneous and IL-1 β stimulated production of IL-6; *, $p < 0,05$ between stimulated products and the addition of modulators.

показатели флуоресценции в среднем в 2 раза, тогда как добавление донаторов метильной группы SAMe и генистеина, напротив, статистически значимо увеличивало флуоресценцию на 35%. Эти данные свидетельствуют о том, что используемые модель ФСК и модуляторы метилирования ДНК адекватны решению поставленных задач, поскольку применение известных модуляторов метилирования ДНК разнонаправленного действия (SAMe, гидралазин, генистеин, но не фенофибрат) прогнозируемо изменяют уровень метилирования. После этого этапа исследований в последующих экспериментах фенофибрат не использовался.

На рисунке 2 представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК на IL-1 β стимулированную продукцию ФСК IL-6 (рис. 2).

Следует обратить внимание на то, что добавление в культуры ФСК IL-1 β приводило к зна-

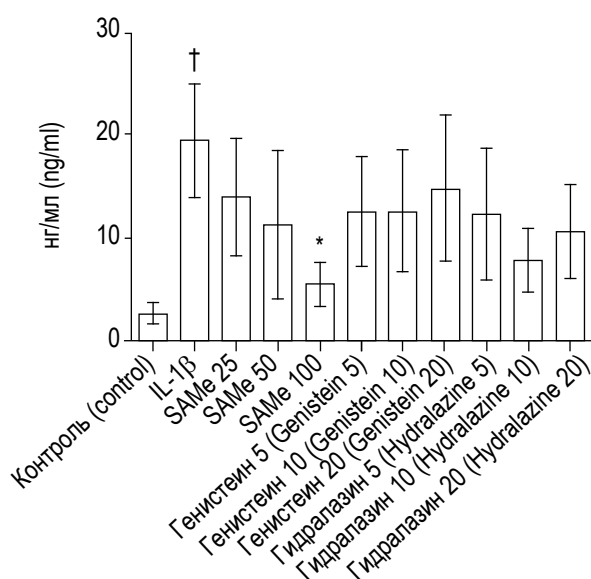


Рисунок 3. Влияние генистеина, гидралазина и SAME в разных концентрациях на IL-1 β -стимулированную продукцию ФСК IL-18

Figure 3. Effect of genistein, hyalalazine and SAME in different concentrations on IL-1 β induced production of FLC IL-18

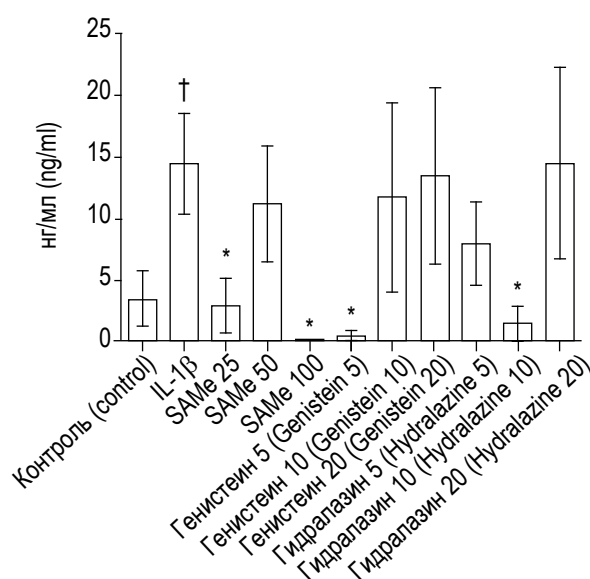


Рисунок 4. Влияние генистеина, гидралазина и SAME в разных концентрациях на IL-1 β -стимулированную продукцию ФСК IL-17

Figure 4. Effect of genistein, hyalalazine and SAME in different concentrations on IL-1 β induced production of FLC IL-17

чительному (в 3,5 раза) увеличению продукции клетками IL-6. Установлено, что внесение в культуры ФСК демитилирующего ДНК соединения гидралазина в разных концентрациях не изменяло уровень продукции IL-6. Добавление SAME и генистеина в определенных концентрация существенно и статистически значимо снижало синтез цитокина.

Генистеин и гидралазин не изменял уровень другого провоспалительного цитокина IL-18 в супернатантах культур ФСК. Отмечена тенденция снижения продукции цитокина при добавлении в культуры донатора метильных групп SAME, достигающая статистически значимых значений при использовании SAME в максимальной концентрации (рис. 3).

Продукция IL-17 снижалась при внесении в культуры ФСК используемых модуляторов преимущественно в малых дозах (рис. 4).

На рисунке 5 представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК на продукцию клетками культур ФСК противовоспалительного цитокина IL-10 (рис. 5).

Видно, что стимуляция клеток IL-1 β приводила к двукратному увеличению синтеза IL-10, внесение в культуры модуляторов метилирова-

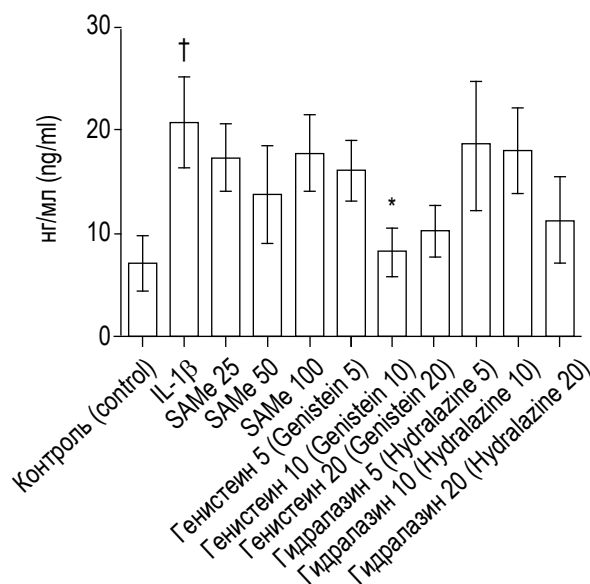


Рисунок 5. Влияние генистеина, гидралазина и SAME в разных концентрациях на IL-1 β -стимулированную продукцию ФСК IL-10

Figure 5. Effect of genistein, hyalalazine and SAME in different concentrations on IL-1 β induced production of FLC IL-10

ния ДНК в разных концентрациях практически не меняло уровень продукции, за исключением статистически значимого снижения синтеза цитокина в ответ на средние дозы генистеина.

Следует подчеркнуть, что спонтанная продукция IL-6 культур ФСК больных РА в тысячу раз превышала продукцию IL-18 и IL-17, ее концентрация исчислялась в нанogramмах.

Обсуждение

Использование ФСК от больных активным РА вне организма является логическим продолжением метода биопсии, при котором изъятый фрагмент ткани подвергается исследованию для изучения патогенеза болезни и поиска новых терапевтических мишеней. Благодаря длительному культивированию возможности изучения расширяются практически беспредельно, так как становится реальной оценка не только морфологических и биохимических изменений, но и изменений в поведении клеток, их реакций на различные агенты, в том числе на воздействия лекарств. ФСК сохраняют важнейшие черты, свойственные этим клеткам в организме; более того, они сохраняют онтогенетические индивидуально-генотипические свойства организма-донора. Изменения, которые претерпевают ФСК культуре *ex vivo*, легко контролируются путем создания соответствующих условий. Результаты исследований подтверждают сказанное и свидетельствуют о том, что ФСК больных РА обладают тремя важными особенностями:

- они, вероятно, тотально гипометилированы, поскольку контрольные образцы клеток слабо окрашены на 5-метилцитозин, а известный донатор метильных групп SAmе, а также генистеин значительно увеличивают содержание 5-метилцитозина, в противоположность деметилирующему агенту гидралазину, который двукратно уменьшает содержание 5-метилцитозина в ФСК;

- во-вторых, ФСК способны спонтанно продуцировать провоспалительные цитокины, преимущественно IL-6, содержание которого в супернатантах клеток оценивается в нанogramмах, а также IL-18, IL-17 и противовоспалительный цитокин IL-10;

- продукция этих цитокинов существенно увеличивается при стимуляции культур IL-1 β — одним из активаторов фибробластов синовиальной ткани *in vivo*.

В использованной модели уровень всех изученных провоспалительных цитокинов снижался только при добавлении в культуры классического донатора метильных групп SAmе в определенных дозах. Демитилятор гидралазин практически не менял синтез цитокинов, а генистеин в некоторых дозах снижал продукцию IL-6 и IL-17. Наши данные согласуются с результатами зарубежных исследований, свидетельствующими о противовоспалительных, антиангиогенных, антипролиферативных, антиоксидантных, иммуномодулирующих, обезболивающих свойствах генистеина в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, обусловленных его влиянием на процесс метилирования ДНК и позволяющими отнести препарат к числу перспективных агентов в лечении РА [8, 16]. Что касается действия модуляторов метилирования ДНК на продукцию клетками ФСК противовоспалительного цитокина IL-10, то оно не корректируется модуляторами, за исключением генистеина, внесение которого в средней дозировке снижало продукцию цитокина. Возможно, этим можно объяснить неудавшиеся попытки достичь клинического эффекта у больных РА путем изменения баланса активности провоспалительных и противовоспалительных цитокинов?

Следует подчеркнуть, что уровень синтеза провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в культурах ФСК от больных РА определяется не только влиянием различных агентов на метилирование ДНК, но и другими механизмами. К их числу следует отнести процессы ацетилирования гистонов, активность малых РНК, которые, действуя совместно с механизмами метилирования, также контролируют включение и выключение генов цитокинов и других белков [1].

Пока не ясно, как координируются процессы метилирования ДНК, ацетилирования гистонов, активности малых РНК, обеспечивая стабильность фенотипа ФСК, их провоспалительный потенциал, противовоспалительную активность. В то же время консерватизм только метилирования ДНК ФСК в промоторных участках генов провоспалительных медиаторов, проапоптотических факторов, факторов роста и пр. обеспечивает как фенотипическую, так и функциональную стабильность клеток при 3-7 пассажах [17]. Надо помнить, что большинство приобретенных эпигенетических нарушений — обратимые процессы, регулируемые специфическими ферментами и кофакторами, которые позволяют клеткам из-

менять экспрессию генов в ответ на различные раздражители, в том числе фармакологические агенты, о чем свидетельствуют результаты наших исследований.

В заключение следует еще раз подчеркнуть, что синовиальные фибробласты являются ключевыми клетками, участвующими в патогенезе

«поздней», развернутой стадии ревматоидного артрита. Исследования, посвященные изучению нарушений их эпигенетической регуляции, находятся в начале своего пути, а ферменты и молекулярные комплексы, участвующие в регуляции, могут быть потенциальными терапевтическими мишенями.

Список литературы / References

1. Шнайдер М.А., Ширинский В.С., Ширинский И.В. Культура фибробластоподобных синовиальных клеток больных ревматоидным артритом: свойства и возможности // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2. С. 107-118. [Schneider M.A., Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Cultures of fibroblast-like synovial cells from patients with rheumatoid arthritis: properties and opportunities. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 107-118. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-107-118.
2. Arce C., Segura-Pacheco B., Perez-Cardenas E., Taja-Chayeb L., Candelaria M., Duennas-Gonzalez A. Hydralazine target: from blood vessels to the epigenome. *J. Transl. Med.*, 2006, Vol. 4, pp. 10-22.
3. Fu L.H., Ma C.L., Cong B., Li S.J., Chen H.Y., Zhang J.G. Hypomethylation of proximal CpG motif of interleukin-10 promoter regulates its expression in human rheumatoid arthritis. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 2011, Vol. 32, pp. 1373-1380.
4. Ishida K., Kobayashi T., Ito S., Komatsu Y., Yokoyama T., Okada M., Abe A., Murasawa A., Yoshie H. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, 2012, Vol. 83, pp. 917-925.
5. Kanbe K., Takemura T., Takeuchi K., Chen Q., Takagishi K., Inoue K. Synovectomy reduces stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1) which is involved in the destruction of cartilage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J. Bone Joint. Surg. Br.*, 2004, Vol. 86, pp. 296-300.
6. Karouzakis E., Gay R.E., Michel B.A., Gay S., Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*, 2009, Vol. 60, pp. 3613-3622.
7. Karouzakis E., Rengel Y., Jungel A., Kolling C., Gay R.E., Michel B.A., Tak P.P., Gay S., Neidhart M., Ospelt C. DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Genes Immun.*, 2011, Vol. 12, pp. 643-652.
8. Li J., Gang D., Yu X., Hu Y., Yue Y., Cheng W., Pan X., Zhang P. Genistein: the potential for efficacy in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.*, 2013, Vol. 32, pp. 535-540.
9. Matsukura H., Aisaki K., Igarashi K., Matsushima Y., Kanno J., Muramatsu M., Sudo K., Sato N. Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, Vol. 412, pp. 366-372.
10. Nile C.J., Read R.C., Akil M., Duff G.W., Wilson A.G. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, pp. 2686-2693.
11. Ospelt C., Reedquist K.A., Gay S., Tak P.P. Inflammatory memories: is epigenetics the missing link to persistent stromal cell activation in rheumatoid arthritis? *Autoimmun. Rev.*, 2011, Vol. 10, no. 9, pp. 519-524.
12. Portela A., Esteller M. Epigenetic modifications and human diseases. *Nat. Biotechnol.*, 2010, Vol. 28, pp. 1057-1068.
13. Rosengren S., Boyle D.L., Firestein G.S. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods Mol. Med.*, 2007, Vol. 135, pp. 365-375.
14. Takami N., Osawa K., Miura Y., Komai K., Taniguchi M., Shiraishi M., Sato K., Iguchi T., Shiozawa K., Hashiramoto A., Shiozawa S. Hypermethylated promoter region of DR3, the death receptor 3 gene, in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum.*, 2006, Vol. 54, pp. 779-787.
15. van Oosterhout M., Levarht E.W., Sont J.K., Huizinga T.W., Toes R.E., van Laar J.M. Clinical efficacy of infliximab plus methotrexate in DMARD naive and DMARD refractory rheumatoid arthritis is associated with decreased synovial expression of TNF alpha and IL18 but not CXCL12. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, Vol. 64, pp. 537-543.
16. Wang J., Zhang Q., Jin S., He D., Zhao S., Liu S. Genistein modulate immune responses in collagen-induced rheumatoid arthritis model. *Maturitas*, 2008, Vol. 59, pp. 405-412.

17. Whitaker J.W., Boyle D.L., Hillman J., Anderson D., Wang W., Firestein G.S. An imprinted rheumatoid arthritis methylome signature reflects pathogenic phenotype. *Genome Med.*, 2013, Vol. 5, no. 4, p. 40.
18. Zimmermann T., Kunisch E., Pfeiffer R., Hirth A., Stahl H.D., Sack U., Laube A., Liesaus E., Roth A., Palombo-Kinne E., Emmrich F., Kinne R.W. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture – primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res.*, 2001, Vol. 3, pp. 72-76.

Авторы:

Шнайдер М.А. — аспирант лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» СО РАН, г. Новосибирск, Россия

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

Калиновская Н.Ю. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» СО РАН, г. Новосибирск, Россия

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

Authors:

Shnayder M.A., Postgraduate Student, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Shirinsky V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Clinical Rheumatologist, Head, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Kalinovskaya N.Yu., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

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

Поступила 07.05.2018
Отправлена на доработку 14.05.2018
Принята к печати 21.05.2018

Received 07.05.2018
Revision received 14.05.2018
Accepted 21.05.2018

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ЦИТОКИНОВ И ПЛАЦЕНТАРНАЯ ДИСФУНКЦИЯ У БЕРЕМЕННЫХ С ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ

Хворостухина Н.Ф., Новичков Д.А.

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского»
Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Резюме. Панкреатит занимает третье место в структуре острых хирургических заболеваний органов брюшной полости. Развитие данной патологии при беременности осложняется преждевременными родами в 58% случаев, что непосредственно отражается на показателях перинатальной заболеваемости и смертности.

Цель исследования: изучить особенности синтеза цитокинов и их влияние на состояние фетоплацентарной системы при остром панкреатите у беременных, а также оценить эффективность разработанного комплекса лечебных мероприятий для коррекции выявленных нарушений и профилактики осложнений гестации.

В исследование включены 127 беременных с острым панкреатитом. Основную группу составили 43 беременные, которым в комплекс лечебно-профилактических мероприятий дополнительно были включены: дискретный плазмаферез на 1 и 3 сутки и микронизированный прогестерон (патент на изобретение № 2535108 от 08.10.2014 г.). В группе сравнения (n = 84) проводилась стандартная терапия острого панкреатита. Контрольная группа (n = 30) была представлена здоровыми беременными. Обследование проводили в соответствии со стандартами, дополнительно изучали содержание цитокинов (интерлейкинов IL-1 β , IL-4, интерферона IFN γ , фактора некроза опухоли TNF α), маркера апоптоза Fas-лиганда, параметры гемодинамики в маточных артериях, концентрации трофобластического бета-1-гликопротеина (ТБГ) и плацентоспецифического альфа-1-микроглобулина (ПАМГ-1) в сыворотке крови беременных.

При сочетании беременности с острым панкреатитом выявлено возрастание уровней IFN γ — в 2,5 раза, IL-1 β — в 2,1 раза, TNF α — в 2,5 раза, IL-4 — в 1,3 раза в сравнении с контрольными данными, на фоне снижения Fas-L — в 1,3 раза и увеличения индексов периферического сопротивления в маточных артериях — в 1,3-1,4 раза, что сопровождалось дезадаптацией синтеза гравидарных белков: уменьшением ТБГ (в 1,3 раза) и повышением ПАМГ-1 (в 1,9 раза). Динамический контроль исследуемых параметров показал сохранение высоких концентраций цитокинов и прогрессирование нарушений маточной гемодинамики при стандартном лечении заболевания, которые привели к появлению признаков угрожающего прерывания беременности на 7-10 сутки у 83,3% женщин. Кроме того, развитие панкреатита на различных сроках гестации увеличивает риск самопроизвольного выкидыша до 11,9%, неразвивающейся беременности — до 29,8%, преждевременных родов — до 60,7%, в результате формирования хронической (78,9%) и острой (21,1%) плацентарной недостаточности.

Адрес для переписки:

Хворостухина Наталья Федоровна
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ
410012, Россия, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112.
Тел.: 8 (927) 277-79-35.
E-mail: Khvorostukhina-NF@yandex.ru

Address for correspondence:

Khvorostukhina Natalia F.
Saratov State V. Razumovsky Medical University
410012, Russian Federation, Saratov,
Bolshaya Kasachya str., 112.
Phone: 7 (927) 277-79-35.
E-mail: Khvorostukhina-NF@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.Ф. Хворостухина, Д.А. Новичков «Особенности синтеза цитокинов и плацентарная дисфункция у беременных с острым панкреатитом» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 239-250.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-239-250
© Хворостухина Н.Ф., Новичков Д.А., 2019

For citation:

N.F. Khvorostukhina, D.A. Novichkov "Features of the cytokine synthesis of and placental dysfunction in pregnant women with acute pancreatitis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 239-250. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-239-250

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-239-250

Дополнительное использование дискретного плазмафереза и препаратов прогестерона способствовало восстановлению баланса про- и противовоспалительных цитокинов уже к 3-м суткам лечения, предотвращая их длительное негативное воздействие на структуру и функцию маточно-плацентарного комплекса.

Сочетание беременности с острым панкреатитом сопровождается диссоциацией иммунного ответа с преобладанием Th1-цитокинов на фоне угнетения апоптоза и развития плацентарной дисфункции. Применение разработанного способа комплексного лечения позволяет сократить частоту угрожающего прерывания беременности при развитии острого панкреатита — в 3 раза, уменьшить число преждевременных родов — в 13 раз, а потери беременности свести до нуля.

Ключевые слова: беременность, острый панкреатит, цитокины, доплерометрия, плацентарная дисфункция, перинатальные потери

FEATURES OF THE CYTOKINE SYNTHESIS OF AND PLACENTAL DYSFUNCTION IN PREGNANT WOMEN WITH ACUTE PANCREATITIS

Khvorostukhina N.F., Novichkov D.A.

Saratov State V. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Abstract. Pancreatitis ranks third in the structure of acute surgical diseases of the abdominal cavity. The development of this pathology during pregnancy results into premature birth in 58% of cases, thus directly affecting the indexes of perinatal morbidity and mortality.

The present study was aimed for assessment of cytokine synthesis pattern and their impact on fetoplacental system in acute pancreatitis in pregnant women, as well as to evaluate efficiency of the developed system of therapeutic measures for the correction of the disturbances and prevention of complications of gestation.

The study included 127 pregnant women with acute pancreatitis. The main group consisted of 43 pregnant women, who were additionally included into the complex of therapeutic and preventive measures: discrete plasmapheresis for 1 and 3 days, and micronized progesterone (patent № 2535108 from 08.10.2014). Standard therapy of acute pancreatitis was performed in the comparison group (n = 84). The control group (n = 30) was represented by healthy pregnant women. The examination was carried out in accordance with approved protocol, including measurement of cytokines (interleukins IL-1 β , IL-4, interferon IFN γ , tumor necrosis factor TNF α), Fas-ligand (an apoptosis marker), trophoblastic beta-1-glycoprotein (TBG) and placental specific alpha-1-microglobulin (PAMG-1) concentrations in blood serum. Hemodynamic parameters of the uterine arteries were additionally studied in pregnant women.

Results of the study were as follows: pregnancy complicated by acute pancreatitis was characterized by increased levels of IFN γ (2.5-fold), IL-1 β (2.1-fold), TNF α (2.5-fold), IL-4 (1.3-fold) over control data, along with decreased Fas-L (1.3-fold) and increased indexes of peripheral resistance in uterine artery (1.3-1.4-fold), accompanied by altered synthesis of pregnancy-associated proteins: a decrease in TBG (1.3 times) and increase of PAMG-1 (1.9 times). Dynamic control of the studied parameters showed persistence of high cytokine concentrations, and progression of uterine hemodynamic disorders during standard treatment of the disease, which led to development of signs of threatened miscarriage on days 7 to 10 in 83.3% of women. In addition, development of pancreatitis at different gestation periods increases the risk of spontaneous miscarriage to 11.9%, nondeveloping pregnancy, up to 29.8%, premature birth, up to 60.7%, due to formation of chronic (78.9%) and acute (21.1%) placental insufficiency. Additional use of discrete plasmapheresis and progesterone drugs helped to restore the balance of Pro- and anti-inflammatory cytokines by the 3rd day of treatment, preventing their long-term negative impact on the structure and function of the utero-placental complex.

In conclusion, pregnancy complicated by acute pancreatitis is accompanied by dissociated immune response, with predominance of Th1-cytokines, along with suppression of apoptosis and developing placental dysfunction. The use of a proposed complex treatment method allows to reduce the frequency of threatened miscarriage in cases of acute pancreatitis by 3 times, diminish the number of premature births by 13 times, and to reduce pregnancy losses to zero values.

Keywords: pregnancy, acute pancreatitis, cytokines, doppler study, placental dysfunction, perinatal losses

Введение

Основной задачей современного акушерства является повышение качества оказания медицинской помощи для снижения показателей материнской и перинатальной смертности. Вместе с тем в настоящее время многочисленными литературными источниками отмечен рост экстрагенитальных заболеваний, в том числе хирургических, при беременности [7, 11, 22]. Известно, что острый панкреатит (ОП) занимает третье место в структуре ургентной патологии органов брюшной полости. За десять лет частота его увеличилась с 200 до 800 случаев на 1 млн населения в год, при этом доля женщин среди заболевших возросла на 30% [1]. Распространенность ОП среди беременных составляет 1:4000, а развитие этого заболевания осложняется преждевременными родами в 50-58% наблюдений, что непосредственно отражается на перинатальной заболеваемости и смертности [9, 17, 24].

Трудности диагностики ОП при беременности обусловлены вариабельностью клинической симптоматики, идентичностью ее другим острым хирургическим нозологиям и акушерской патологии, несвоевременностью обращения женщин за медицинской помощью и зачастую непрофильной госпитализацией, способствуя удлинению времени начала патогенетической терапии и увеличивая риск развития акушерских осложнений [6, 8, 19, 28]. По данным литературы, показатель материнской смертности при ОП варьирует от 12,5 до 39% (у небеременных – 3-6%), а перинатальной – от 33,9 до 380‰ [1, 20, 23, 25].

Предметом научного обсуждения и дискуссий также остаются вопросы акушерской тактики при сочетании беременности с ОП. Существует точка зрения, что при развитии ОП до 12 недель беременности целесообразно ее прерывание [3]. В своей публикации С. Sang и соавт. (2017) рекомендуют срочное завершение беременности при ОП, независимо от срока гестации, для снижения риска развития тяжелой преэклампсии и повышения частоты благоприятных исходов [27]. Между тем до настоящего времени в литературе не представлены убедительные доказательства того, что прерывание беременности в I триместре или досрочное родоразрешение улучшают прогноз для матери.

Представляется закономерным, что, пытаясь решить проблему непосредственных и отдаленных осложнений при ОП у беременных, необходимо, прежде всего, изучить механизмы их формирования. Отсутствие четкого представления об особенностях функционирования системы «мать—плацента—плод» в условиях ОП, а также механизмах формирования плацентарной недостаточности и ее роли в развитии акушер-

ских и перинатальных осложнений, недостаточные возможности эффективной профилактики и коррекции возможных осложнений гестации диктуют необходимость проведения дальнейшего научного поиска в этом направлении.

Цель — изучить особенности синтеза цитокинов и их влияние на состояние фетоплацентарной системы при остром панкреатите у беременных, а также оценить эффективность разработанного комплекса лечебных мероприятий для коррекции выявленных нарушений и профилактики осложнений гестации.

Материалы и методы

В исследование включены 127 беременных с острым панкреатитом, находившихся на лечении в хирургическом и реанимационном отделениях ГУЗ «Саратовская городская клиническая больница № 1 им. Ю.Я. Гордеева» в период с 1992 по 2014 гг. Основную группу составили 43 беременные, которым в комплекс лечебно-профилактических мероприятий дополнительно были включены: дискретный плазмаферез на 1 и 3 сутки и микронизированный прогестерон (патент на изобретение № 2535108 от 08.10.2014 г.). В группе сравнения ($n = 84$) проводилась стандартная терапия острого панкреатита. Контрольная группа ($n = 30$) была представлена здоровыми беременными. Критериями включения являлись: отечная форма ОП в сочетании с беременностью, срок гестации от 4 до 37 недель. Критериями исключения стали: панкреонекроз, органная недостаточность, врожденные тромбофилии, сопутствующие злокачественные или предраковые заболевания.

Обследование проводили в соответствии со стандартами. Дополнительно в динамике изучали содержание цитокинов (интерлейкинов IL-1 β , IL-4, интерферона IFN γ , фактора некроза опухоли TNF α), маркера апоптоза Fas-лиганда методом твердофазного иммуноанализа, используя наборы реактивов фирм «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), Biosource (США) и Bender MedSystems (Австрия). Для оценки параметров гемодинамики в маточных артериях применяли комплексное ультразвуковое исследование (УЗИ) с доплерометрией на аппарате HITACHI-5500. Определение гравидарных белков: трофобластического бета-1-гликопротеина (ТБГ) и плацентоспецифического альфа-1-микроглобулина (ПАМГ-1) в сыворотке крови беременных выполняли методом иммуноферментного анализа наборами фирмы «Диагностика» (РФ), с учетом результатов на фотометре «Униплан» (фирма «Пикон», РФ). Для морфологического анализа плацент использовали стандартизированную схему А.П. Милованова (1999).

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью программ Excel MS Office Professional и Statistica 6.0. Для определения зависимости между показателями применяли корреляционный анализ, с оценкой результатов на основании коэффициентов ранговых корреляций Спирмена (R).

Результаты

Возраст беременных с ОП находился в интервале от 22 до 35 лет и в среднем составил в основной группе $26,4 \pm 4,1$ года, в группе сравнения — $26,8 \pm 3,2$ года, в контрольной группе — $25,7 \pm 4,2$ года, что не имело значимых межгрупповых различий ($p > 0,05$). Распределение беременных с учетом срока гестации произошло следующим образом: от 4 до 12 недель в основной группе — 4,6%, в группе сравнения — 4,8%; от 13 до 21 недели, соответственно, 18,6 и 19%; от 22 до 31 недели — 32,6 и 32,1%; от 32 до 37 недель — 44,2 и 44,1%. Следует отметить, что частота возникновения ОП возрастала прямо пропорционально сроку гестации, при этом во II половине беременности диагноз панкреатита устанавливался в 7-10 раз чаще в сравнении с I триместром.

Результаты динамического исследования содержания цитокинов в сыворотке крови беременных с ОП представлены в таблице 1.

При сочетании беременности и ОП исходно установлено значительное возрастание всех цитокинов. Концентрация $IFN\gamma$, который является активатором макрофагов и стимулирует продукцию всех провоспалительных цитокинов, при развитии ОП увеличивалась в 2,5 раза в сравнении с показателем здоровых беременных ($p < 0,05$). Уровень $IL-1\beta$ у пациенток основной группы и группы сравнения увеличивался в 2,1 раза, $TNF\alpha$ — в 2,5 раза по отношению к аналогичным параметрам контрольной группы ($p < 0,05$). Содержание противовоспалительного цитокина $IL-4$ у беременных с ОП превышало значения при физиологическом течении гестации в 1,3 раза ($p < 0,05$). В то же время при изучении маркера апоптоза Fas-L в сыворотке крови беременных с ОП установлено снижение его концентрации в 1,3 раза в сравнении с данными контрольной группы ($p < 0,05$), что в условиях воспалительного процесса может стать причиной распространения и генерализации инфекции.

Динамический контроль показателей иммунной системы в процессе лечения ОП показал прогрессирующее снижение концентрации провоспалительных цитокинов (табл. 1). При этом на фоне стандартного ведения беременных с ОП прослежено незначительное их снижение на 3-и сутки. И даже на 7-10-е сутки в группе сравнения содержание $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ превышало аналогич-

ные параметры основной и контрольной групп в 1,6 раза, $IL-1\beta$ — в 1,5 раза ($p < 0,05$).

Совершенно иная динамика была констатирована в основной группе. После проведения первого сеанса дискретного плазмафереза уже на 3-и сутки выявлено уменьшение $IL-1\beta$, $TNF\alpha$ и $IFN\gamma$ в 1,8 раза по отношению к исходным данным ($p < 0,05$). А полученные значения всех изучаемых цитокинов и на 3-и, и на 5-е, и даже на 7-10 сутки проводимой терапии имели достоверные различия с параметрами группы сравнения ($p < 0,05$). Сывороточная концентрация противовоспалительного цитокина $IL-4$ в основной группе снижалась до значений контрольной группы уже на 3-и сутки лечения, в то время как в группе сравнения снижение показателя во все определяемые сроки интенсивной терапии было незначительным (табл. 1). При исследовании маркера апоптоза Fas-L (табл. 1) мы зафиксировали достоверное повышение его уровня на 3-и сутки только у беременных основной группы, что в 1,3 раза превысило значение параметра в группе сравнения, но было сопоставимо с данными контрольной группы.

По заключениям ультразвуковой фетометрии у беременных с ОП до начала лечения отсутствовали достоверные межгрупповые различия: размеры эмбриона/плода соответствовали во всех случаях срокам гестации по аменорее. Задержки роста плода (ЗРП) и маркеров хромосомных аномалий развития плода мы не зафиксировали ни в одном наблюдении. Для качественной оценки маточного кровотока был использован индекс резистентности (ИР) в правой и левой маточных артериях. Определение показателя маточной гемодинамики проводили с учетом срока беременности (табл. 2). Учитывая отсутствие достоверных различий между полученными данными в правой и левой маточных артериях, для дальнейшей работы были использовали усредненные значения показателя.

У всех беременных с ОП исходно мы наблюдали снижение систолической и диастолической скоростей кровотока в обеих маточных артериях. При этом ИР достоверно возрастал у пациенток основной группы и группы сравнения в 1,3 раза по отношению к контрольным данным ($p < 0,05$).

Для определения влияния выявленных иммунных нарушений при ОП на состояние маточной гемодинамики мы провели корреляционный анализ полученных данных с применением непараметрических методов проверки статистических гипотез. При физиологическом течении беременности между показателями цитокинового профиля и ИР в маточных артериях были прослежены лишь слабые корреляционные связи. Сочетание беременности с ОП способствовало

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ У БЕРЕМЕННЫХ С ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ

TABLE 1. DYNAMICS OF CYTOKINE CONTENT IN PREGNANT WOMEN WITH ACUTE PANCREATITIS

Исследуемый показатель Indicator under study		Группы обследуемых женщин Groups of women surveyed		
		Основная группа Major group (n = 43)	Группа сравнения Comparison group (n = 84)	Контрольная группа Control group (n = 30)
IL-1 β	При поступлении At admission	18,62 \pm 1,24*	18,73 \pm 1,65*	7,51 \pm 0,44
	3 сутки 3 days	10,23 \pm 1,15* ^{###}	15,84 \pm 1,30*	
	5 сутки 5 days	8,16 \pm 0,44 ^{###}	13,62 \pm 1,89*	
	7-10 сутки 7-10 days	7,82 \pm 0,12 ^{###}	11,95 \pm 0,67* [#]	
IL-4	При поступлении At admission	18,67 \pm 1,62*	18,59 \pm 1,54*	14,59 \pm 0,38
	3 сутки 3 days	14,71 \pm 0,12 [#]	17,43 \pm 2,97	
	5 сутки 5 days	14,63 \pm 0,16 [#]	16,78 \pm 2,51	
	7-10 сутки 7-10 days	14,62 \pm 0,15 [#]	16,41 \pm 1,63	
TNF α	При поступлении At admission	7,74 \pm 0,16*	7,76 \pm 0,20*	3,09 \pm 0,12
	3 сутки 3 days	4,35 \pm 0,24 ^{###}	6,99 \pm 0,34*	
	5 сутки 5 days	3,78 \pm 0,13 ^{###}	6,21 \pm 0,26*	
	7-10 сутки 7-10 days	3,21 \pm 0,07 ^{###}	5,11 \pm 0,13* [#]	
IFN γ	При поступлении At admission	18,23 \pm 1,08*	18,24 \pm 1,12*	8,25 \pm 0,63
	3 сутки 3 days	10,25 \pm 0,74 ^{###}	16,97 \pm 0,84*	
	5 сутки 5 days	9,16 \pm 0,23 ^{###}	15,22 \pm 0,30*	
	7-10 сутки 7-10 days	8,44 \pm 0,15 ^{###}	13,16 \pm 0,24* [#]	
Fas-L	При поступлении At admission	0,31 \pm 0,03*	0,31 \pm 0,02*	0,41 \pm 0,02
	3 сутки 3 days	0,40 \pm 0,02 ^{###}	0,32 \pm 0,03*	
	5 сутки 5 days	0,40 \pm 0,03 [#]	0,36 \pm 0,07	
	7-10 сутки 7-10 days	0,41 \pm 0,02 [#]	0,38 \pm 0,06	

Примечание. * – различия показателей в сравнении с контрольной группой достоверны, $p < 0,05$; # – различия показателей до и после начала терапии достоверны, $p < 0,05$; ## – различия показателей по отношению к группе сравнения, $p < 0,05$.

Note. *, differences of indicators in comparison with the control group are reliable, $p < 0.05$; #, differences of indicators before and after start of treatment reliable, $p < 0.05$; ##, differences of indicators in relation to the comparison group, $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ДИНАМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ИНДЕКСА РЕЗИСТЕНТНОСТИ (ИР) В МАТОЧНЫХ АРТЕРИЯХ У БЕРЕМЕННЫХ С ПАНКРЕАТИТОМ

TABLE 2. RESULTS OF DYNAMIC STUDY OF RESISTANCE INDEX (IR) IN UTERINE ARTERIES IN PREGNANT WOMEN WITH PANCREATITIS

Группы обследованных женщин Groups of women surveyed	ИР маточных артерий в зависимости от срока беременности Uterine artery IR depending on the pregnancy period			
	4-12 нед. 4-12 weeks	13-21 нед. 13-21 weeks	22-31 нед. 22-31 weeks	32-36 нед. 32-36 weeks
Контрольная группа Control group (n = 30)	0,73±0,03	0,52±0,02	0,45±0,03	0,44±0,05
Основная группа при поступлении Major group at admission (n = 43)	0,98±0,02*	0,70±0,02*	0,59±0,04*	0,58±0,02*
4-5 сутки лечения 4-5 days of treatment	0,73±0,02 ^{###}	0,53±0,03 ^{###}	0,46±0,03 ^{###}	0,44±0,02 ^{###}
Группа сравнения при поступлении Comparison group at admission (n = 84)	0,96±0,02*	0,69±0,02*	0,58±0,02*	0,57±0,02*
4-5 сутки лечения 4-5 days of treatment	0,99±0,02*	0,74±0,02*	0,63±0,02*	0,64±0,02*
7-10 сутки лечения 7-10 days of treatment (n = 70)	n = 4 0,71±0,02 [#]	n = 12 0,51±0,02 [#]	n = 21 0,44±0,02 [#]	n = 33 0,43±0,02 [#]

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

возрастанию коэффициентов корреляции между всеми провоспалительными цитокинами и параметром маточной гемодинамики. Самую широкую корреляционную связь с ИР имели IL-1 β ($r = 0,692$; $p < 0,01$), TNF α ($r = 0,763$; $p < 0,001$) и IFN γ ($r = 0,769$; $p < 0,001$), которые определяют активность клеточного иммунного ответа. Между показателем доплерометрии и уровнем IL-4 установлена положительная корреляция средней силы ($r = 0,412$; $p < 0,2$), что, в свою очередь, свидетельствует о слабом влиянии гуморального звена иммунной системы на резистентность сосудистой стенки и выраженность гемодинамических нарушений. Достоверная отрицательная корреляционная зависимость была установлена между сывороточной концентрацией Fas-L и ИР ($r = -0,421$; $p < 0,05$).

Исследование параметров доплерометрии в динамике у беременных группы сравнения показало дальнейшее возрастание ИР в маточных артериях на 4-5-е сутки проводимой терапии (табл. 2), что свидетельствовало о сохранении нарушений маточно-плацентарного кровотока, при этом отсутствовала разница полученных значений с исходными данными. В то же время

при появлении клинических симптомов угрожающего прерывания беременности у пациенток этой группы ($n = 70$) на 7-10-е сутки наблюдалось достоверное снижение ИР в сравнении с показателем до начала лечения ОП ($p < 0,05$), сопровождающееся увеличением скоростей кровотока в маточных артериях и достоверным укорочением шейки матки по данным цервикометрии (в 1,5 раза, до $23,16 \pm 1,17$ мм). В основной группе нормализация индекса периферического сопротивления прослежена уже на 4-5 сутки, при этом были установлены значимые различия с ИР группы сравнения в эти же сроки проводимого лечения (табл. 2).

Для оценки функционального состояния системы «мать—плацента—плод» мы провели изучение динамики содержания белков «зоны беременности» ПАМГ-1 и ТБГ. При развитии ОП у беременных выявлено достоверное снижение специфического маркера плодовой части плаценты ТБГ (в 1,3 раза) во все сроки гестации в сравнении с контрольными данными (табл. 3). Использование стандартного лечения привело к прогрессирующему уменьшению синтеза протеина, и на 7-10-е сутки его концентрация была

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ДИНАМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО БЕТА-1-ГЛИКОПРОТЕИНА (ТБГ)

TABLE 3. RESULTS OF DYNAMIC STUDY OF TROPHOBLASTIC BETA-1-GLYCOPROTEIN (TBG)

Группы обследованных женщин Groups of women surveyed	Уровень ТБГ (мкг/мл) в зависимости от срока беременности Level of TBG (mcg/ml) depending on the duration of pregnancy			
	4-12 нед. 4-12 weeks	13-21 нед. 13-21 weeks	22-31 нед. 22-31 weeks	32-36 нед. 32-36 weeks
Контрольная группа Control group (n = 30)	n = 2 27,4±2,1	n = 6 114,2±8,3	n = 10 173,3±11,7	n = 12 214,5±12,5
Основная группа при поступлении Major group at admission (n = 43)	n = 2 21,2±1,4*	n = 8 88,93±4,2*	n = 14 134,4±10,4*	n = 19 166,4±11,5*
4-5 сутки лечения 4-5 days of treatment	26,8±2,6 ^{###}	113,7±6,4 ^{###}	172,0±10,2 ^{###}	210,9±12,7 ^{###}
7-10 сутки лечения 7-10 days of treatment	27,3±3,1 ^{###}	114,6±8,2 ^{###}	173,2±10,3 ^{###}	214,5±11,4 ^{###}
Группа сравнения при поступлении Comparison group at admission (n = 84)	n = 4 21,4±1,2*	n = 16 89,2±3,6*	n = 27 135,4±10,2*	n = 37 167,6±10,2*
4-5 сутки лечения 4-5 days of treatment	20,1±1,1*	83,5±6,2*	129,9±12,2*	161,1±11,6*
7-10 сутки лечения 7-10 days of treatment	18,7±1,2*	79,3±5,8*	121,6±10,8*	150,5±11,7*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ниже показателя контрольной группы в 1,4 раза. В основной группе восстановление уровня ТБГ до нормативных значений зафиксировано уже на 4-5 сутки разработанного комплекса лечебных мероприятий (табл. 3).

При изучении динамики специфического маркера материнской части плаценты ПАМГ-1 (табл. 4) у беременных с ОП констатировано исходно увеличение его содержания в 1,9 раза в сравнении с показателем контрольной группы ($p < 0,05$). В процессе лечения хирургической патологии в группе сравнения наблюдалось прогрессирующее возрастание протеина, в то время как в основной группе достоверное снижение уровня ПАМГ-1 прослежено уже на 4-5 сутки, с нормализацией параметра к 7-10 суткам комплексной терапии.

При дальнейшем наблюдении за беременными после перенесенного ОП выявлена высокая частота осложнений гестации в группе сравнения, где проводилось общепринятое лечение (рис. 1).

Клинические и ультразвуковые признаки угрожающего прерывания беременности на 7-10

сутки лечения в условиях хирургического стационара установлены у 83,3% женщин группы сравнения. Самопроизвольным выкидышем беременность закончилась в этой группе в 11,9% наблюдений, а неразвивающейся беременностью – в 29,8%. Удельный вес преждевременных родов при стандартном лечении ОП достигал 60,7%, при этом оперативное родоразрешение имело место только у 8,3% беременных, в связи с преждевременной отслойкой плаценты и кровотечением. Показатель перинатальной смертности в группе сравнения, с учетом мертворождений, составил 281,3‰, а общие репродуктивные потери – 45,2% (n = 38).

В основной группе применение разработанного комплекса лечебных мероприятий, основанного на использовании дискретного плазмафеза на 1 и 3 сутки, а также микронизированного прогестерона с 1-х суток лечения ОП, позволило пролонгировать беременность во всех случаях. У большинства пациенток основной группы беременность закончилась родами в срок (95,3%). Удельный вес преждевременных родов в этой группе составил 4,7%. У всех женщин основной

ТАБЛИЦА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ДИНАМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПЛАЦЕНТОСПЕЦИФИЧЕСКОГО АЛЬФА-1-МИКРОГЛОБУЛИНА (ПАМГ-1)

TABLE 4. RESULTS OF DYNAMIC STUDIES PLANTSPECIFIC ALPHA-1-MICROGLOBULIN (PAMG-1)

Группы обследованных женщин Groups of women surveyed	Уровень ПАМГ-1 (нг/мл) в зависимости от срока беременности Level of PAMG-1 (ng/ml), depending on the duration of pregnancy			
	4-12 нед. 4-12 weeks	13-21 нед. 13-21 weeks	22-31 нед. 22-31 weeks	32-36 нед. 32-36 weeks
Контрольная группа Control group (n = 30)	n = 2 36,2±4,1	n = 6 72,6±5,3	n = 10 78,3±6,3	n = 12 92,1±8,2
Основная группа при поступлении Major group at admission (n = 43)	n = 2 67,6±4,3*	n = 8 135,8±9,4*	n = 14 146,5±10,3*	n = 19 172,2±11,6*
4-5 сутки лечения 4-5 days of treatment	41,8±3,7 ^{###}	83,8±7,6 ^{###}	90,4±10,4 ^{###}	106,2±12,4 ^{###}
7-10 сутки лечения 7-10 days of treatment	38,1±3,4 ^{###}	77,1±6,3 ^{###}	83,2±8,1 ^{###}	97,1±9,2 ^{###}
Группа сравнения при поступлении Comparison group at admission (n = 84)	n = 4 68,0±4,8*	n = 16 136,5±10,2*	n = 27 147,2±11,3*	n = 37 173,1±12,4*
4-5 сутки лечения 4-5 days of treatment	70,3±5,1*	139,3±11,3*	149,8±13,3*	175,7±13,2*
7-10 сутки лечения 7-10 days of treatment	75,1±3,8*	152,8±10,8*	162,2±13,5*	193,9±14,5*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

группы родоразрешение осуществлялось через естественные родовые пути с оценкой новорожденных по Апгар 7-9 баллов.

По заключениям гистологического исследования плацент в группе сравнения (n = 80) диагностические критерии хронической плацентарной недостаточности обнаружены в 78,8%, острой недостаточности плаценты — в 21,2% случаев. В основной группе морфологические признаки хронической компенсированной плацентарной недостаточности выявлены в 34,9%, а в остальных наблюдениях (65,1%) была описана нормальная гистоструктура плацентарной ткани.

Обсуждение

Результаты нашего исследования показали, что риск развития ОП возрастает с увеличением срока гестации, что совпадает с мнением большинства исследователей [1, 16, 17, 27]. При изучении особенностей цитокинового профиля у беременных с ОП выявлено значительное усиление синтеза провоспалительных цитокинов, на фоне недостаточной продукции противовоспалитель-

ного IL-4 и угнетения апоптоза. Диссоциация иммунного ответа организма с преобладанием Th1-цитокинов, обладающих эмбриотоксическим влиянием, при сочетании беременности и ОП, безусловно, оказывает негативное влияние на функционирование системы «мать—плацента—плод».

Согласно имеющимся публикациям, повышение концентраций IL-1β, IL-2, IL-6, TNFα связывают с инициацией самопроизвольного аборта и преждевременных родов [4]. В работе О.В. Севрука (2010) высказано предположение о связи нарушения апоптоза при беременности с задержкой развития плода и его гибелью [5]. Кроме того, проведенными ранее исследованиями доказано, что высокие показатели эндогенной интоксикации у беременных с ОП способствуют нарушениям коагуляционного гомеостаза и процессам микроциркуляции в маточно-плацентарном бассейне, которые также могут привести к гибели плодного яйца или фетоплацентарной недостаточности [11, 12]. Последние сообщения зарубежных авторов, основанные на экспери-

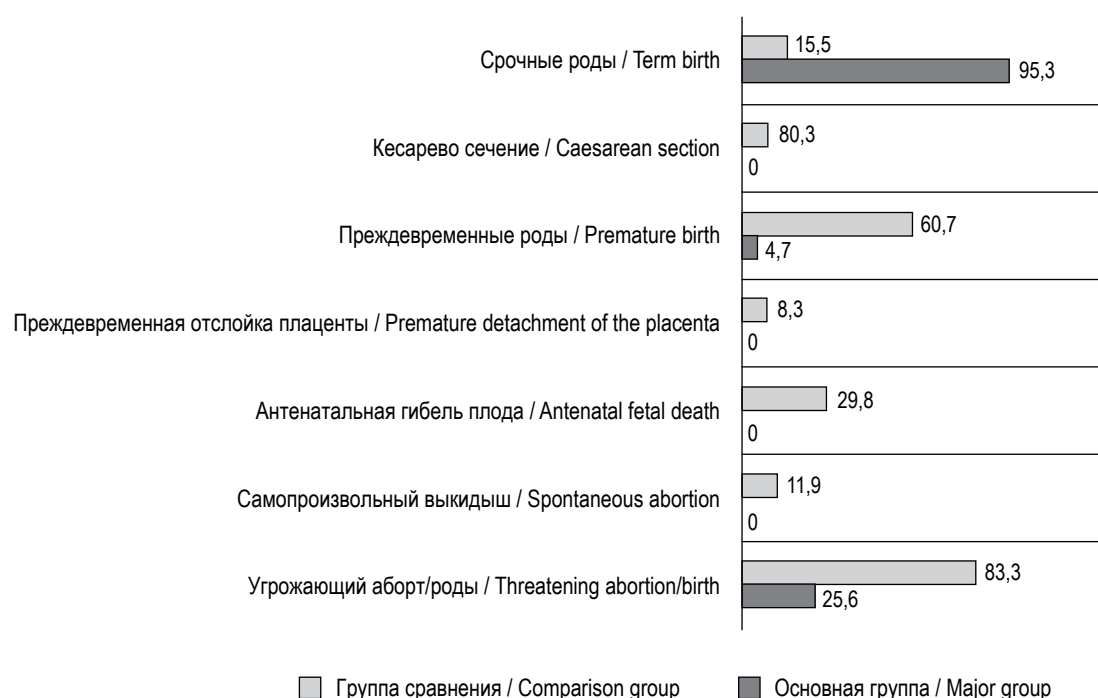


Рисунок 1. Течение и исход беременности в группах беременных с острым панкреатитом

Figure 1. The course and outcome of pregnancy in groups of pregnant women with acute pancreatitis

ментальных исследованиях, показали повреждающее действие провоспалительных цитокинов при ОП на ткань печени, легких и почек плода у крыс [21, 26, 29].

Оценка параметров УЗИ с доплерометрией у беременных с ОП позволила нам констатировать значимые изменения качественных параметров маточной гемодинамики, свидетельствующих о нарушениях маточно-плацентарного кровотока при данной патологии. Формирование плацентарной дисфункции при сочетании беременности с ОП подтверждалось разнонаправленными изменениями в синтезе специфических протеинов: уменьшение содержания ТБГ в 1,3 раза и увеличение ПАМГ-1 в 1,9 раза. Снижение ТБГ и увеличение ПАМГ-1, по мнению некоторых ученых, необходимо относить к проявлениям дезадаптивного характера системы «мать—плацента—плод» с доминированием программ, направленных на угнетение или остановку дальнейшего развития беременности [12, 14]. В публикации Н.А. Ляличкиной и соавт. (2012) рекомендовано расценивать снижение ТБГ до 12 недель гестации как предиктор развития плацентарной недостаточности при дальнейшем пролонгировании беременности [2].

Установленный характер взаимосвязей между ИР в маточных артериях и изучаемыми цитокинами у беременных с ОП свидетельствует о том, что повышение уровней про- и противовоспалитель-

ных цитокинов будет способствовать прогрессирующему возрастанию индекса периферического сопротивления маточных артерий и возникновению нарушений маточно-плацентарного кровотока. С другой стороны, повышение ИР повлечет за собой дальнейшее подавление апоптоза, распространение и генерализацию воспалительного процесса, создавая неблагоприятные условия для пролонгирования беременности. В то же время полученные результаты корреляционного анализа позволили предположить, что ликвидация воспалительных изменений паренхимы поджелудочной железы, коррекция гомеостаза, иммунных и гормональных нарушений, с помощью дополнительного использования дискретного плазмафереза и препаратов прогестерона в программе стандартного лечения ОП, могут восстановить гемодинамику в маточных артериях, предотвращая тем самым дальнейшие нарушения маточно-плацентарного кровотока и негативные последствия для развития плода/эмбриона.

Необходимо отметить, что в настоящее время накоплен достаточно обширный опыт эффективного использования плазмафереза при лечении различной акушерско-гинекологической патологии, а также при сочетании беременности с острыми хирургическими заболеваниями [10, 12, 15]. Доказано, что к специфическим эффектам плазмафереза, помимо детоксикации, отно-

сится коррекция гемостаза, иммунных и гормональных нарушений.

Динамическое исследование показателей цитокинового статуса у беременных с ОП показало сохранение высоких концентраций IL-1 β , IFN γ , TNF α , IL-4 при стандартном лечении до 7-10 суток. При контроле УЗИ в группе сравнения наблюдалось сохранение и некоторое прогрессирование нарушений маточной гемодинамики до 4-5 суток общепринятой интенсивной терапии ОП. В то же время увеличение скоростей кровотока и снижение индекса периферического сопротивления сосудов до нормативных значений на 7-10 сутки лечения ОП способствовали появлению клинических симптомов угрожающего прерывания беременности и структурным изменениям шейки матки. В проведенном исследовании М.Л. Чехонацкой и соавт. (2008) увеличение скоростей артериального и венозного кровотоков при снижении периферического сопротивления маточных сосудов установлено при возникновении координированных сокращений матки в последние две недели гестации [13].

Кроме того, использование стандартных подходов при лечении беременных с ОП привело к прогрессированию нарушений белковосинтетической функции маточно-плацентарного комплекса: на 7-10-е сутки прослежено снижение ТБГ в 1,4 раза, а концентрация ПАМГ-1 возросла уже в 2 раза по отношению к нормативным значениям, что в дальнейшем отразилось на исходах гестации после перенесенного ОП. Частота самопроизвольных выкидышей в группе сравне-

ния составила 11,9%, неразвивающейся беременности – 29,8%, преждевременных родов – 60,7%. Полученные данные о высокой частоте потерь беременности и антенатальной гибели плода при возникновении ОП согласуются с мнением большинства исследователей [9, 18, 25].

Дополнительное применение дискретного плазмафереза на 1 и 3 сутки от начала интенсивной терапии ОП позволяет восстановить баланс про- и противовоспалительных цитокинов уже к 3-м суткам, предотвращая их длительное негативное воздействие на структуру и функцию маточно-плацентарного комплекса. Сочетанное использование плазмафереза и препаратов прогестерона в программе стандартной терапии ОП также оказало позитивное влияние на коррекцию нарушений маточной гемодинамики и синтеза гравидарных белков, что позволило пролонгировать беременность во всех случаях у пациенток основной группы.

Заключение

Сочетание беременности с острым панкреатитом сопровождается диссоциацией иммунного ответа с преобладанием Th1-цитокинов на фоне угнетения апоптоза и развития плацентарной дисфункции. Применение разработанного способа комплексного лечения позволяет сократить частоту угрожающего прерывания беременности при развитии острого панкреатита в 3 раза, уменьшить число преждевременных родов – в 13 раз, а потери беременности свести до нуля.

Список литературы / References

1. Еремина Е.Ю. Панкреатит у беременных // Практическая медицина, 2012. № 3 (58). С. 23-28. [Eremina E.Yu. Pancreatitis in pregnancy. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2012, no. 3 (58), pp. 23-28. (In Russ.)]
2. Ляличкина Н.А., Пешев Л.П., Шукина Л.П. Прогностические маркеры плацентарной недостаточности при угрожающем аборте // Современные проблемы науки и образования, 2012. № 6. С. 206. [Lylichkina N.A., Peshev L.P., Schukina L.P. Prognostic markers of placental insufficiency in threatened abortion. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2012, no. 6, p. 206. (In Russ.)]
3. Маев И.В., Бурков С.Г., Кучерявый Ю.А., Овлащенко Е.И. Течение, диагностика и лечение острого панкреатита в период беременности // Проблемы женского здоровья, 2007. Т. 2, № 4. С. 38-45. [Maev I.V., Burkov S.G., Kucheryavy Yu.A., Ovlashenko E.I. Course, diagnosis and treatment of acute pancreatitis during pregnancy. *Problemy zhenskogo zdorovya = Problems of Women Health*, 2007, Vol. 2, no. 4, pp. 38-45. (In Russ.)]
4. Салов И.А., Хворостухина Н.Ф., Михайлова Ю.В., Шехтер М.С. Беременность и дисфункция иммунной системы: монография. Саратов, 2014. 135 с. [Salov I.A., Khvorostukhina N.F., Mikhailova Yu.V., Shekhter M.S. *Pregnancy and immune system dysfunction: monograph*. Saratov, 2014. 135 p.
5. Севрук О.В. Апоптоз – участник патологических процессов в организме человека // Репродуктивное здоровье в Беларуси, 2010. № 1. С. 139-151. [Sevruk O.V. Apoptosis party of pathological processes in humans. *Reproduktivnoe zdorovye v Belarusi = Reproductive Health in Belarus*, 2010, no. 1, pp. 139-151. (In Russ.)]
6. Стяжкина С.Н., Борисова И.Н., Ефремова Н.С. Дифференциальная диагностика острого аппендицита и острого панкреатита у беременных // Современные тенденции развития науки и технологий, 2016. № 4-2. С. 88-92. [Styazhkina S.N., Borisova I.N., Efremova N.S. Differential diagnosis of acute appendicitis and acute pancreatitis in pregnancy. *Sovremennye tendentsii razvitiya nauki i tekhnologiy = Modern Trends in Science and Technology*, 2016, no. 4-2, pp. 88-92. (In Russ.)]

7. Стяжкина С.Н., Агазова А.Р., Салихова Г.С., Акимов А.А. Острый холецистит и панкреонекроз у беременных // Наука и образование сегодня, 2017. № 1 (12). С. 84-85. [Styazhkina S.N., Agazova A.R., Salikhova G.S., Akimov A.A. Acute cholecystitis and pankreonekros in pregnant women. *Nauka i obrazovanie segodnya = Science and Education Today*, 2017, no. 1 (12), pp. 84-85. (In Russ.)]
8. Хворостухина Н.Ф., Новичков Д.А., Столярова У.В. Особенности течения острого панкреатита при беременности // Международный журнал экспериментального образования, 2014. № 8-2. С. 69-70. [Khvorostukhina N.F., Novichkov D.A., Stolyarova U.V. Features of acute pancreatitis in pregnancy. *Mezhdunarodnyy zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya = International Journal of Experimental Education*, 2014, no. 8-2, pp. 69-70. (In Russ.)]
9. Хворостухина Н.Ф., Салов И.А., Столярова У.В. Анализ причин осложнений гестации у беременных с острым панкреатитом // Фундаментальные исследования, 2014. № 2. С. 180-185. [Khvorostukhina N.F., Salov I.A., Stolyarova U.V. Analysis of complicated gestation of pregnant women with acute pancreatitis. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2014, no. 2, pp. 180-185. (In Russ.)]
10. Хворостухина Н.Ф., Салов И.А., Новичков Д.А. Плазмаферез в комплексном лечении беременных с острым аппендицитом // Акушерство, гинекология и репродукция, 2014. Т. 8, № 3. С. 26-30. [Khvorostukhina N.F., Salov I.A., Novichkov D.A. Plasmapheresis in complex treatment of pregnant women with acute appendicitis. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduksiya = Obstetrics, Gynecology and Reproduction*, 2014, Vol. 8, no. 3, pp. 26-30. (In Russ.)]
11. Хворостухина Н.Ф., Салов И.А., Новичков Д.А. Острый панкреатит беременных // Клиническая медицина, 2015. Т. 93, № 2. С. 61-66. [Khvorostukhina N.F., Salov I.A., Novichkov D.A. Acute pancreatitis of pregnancy. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*, 2015, Vol. 93, no. 2, pp. 61-66. (In Russ.)]
12. Хворостухина Н.Ф., Салов И.А., Новичков Д.А. Пути снижения перинатальных потерь у беременных с острым панкреатитом // Акушерство и гинекология, 2017. № 5. С. 50-57. [Khvorostukhina N.F., Salov I.A., Novichkov D.A. Ways to reduce perinatal losses in pregnant women with acute pancreatitis. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2017, no. 5, pp. 50-57. (In Russ.)]
13. Чехонацкая М.Л., Рогожина И.Е., Яннаева Н.Е. Характеристика изменений маточного кровотока накануне родов // Саратовский научно-медицинский журнал, 2008. Т. 4, № 2. С. 67-70. [Chekhonatskaya M.L., Rogozhina I.E., Yannaeva N.E. Change characteristics blood flow uterine before labor. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2008, Vol. 4, no. 2, pp. 67-70. (In Russ.)]
14. Чикин В.Г., Пчелинцев В.В. Изменения синтеза протеинов беременности при некоторых клинических проявлениях маточно-плацентарной недостаточности // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова, 2012. № 3. С. 28-33. [Chikin V.G., Pchelintsev V.V. The changes in the synthesis of proteins of pregnancy in some clinical manifestations of uteroplacental insufficiency. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I.P. Pavlova = Pavlov Russian Medical Biological Bulletin*, 2012, no. 3, pp. 28-33. (In Russ.)]
15. Altun D., Eren G., Cukurova Z., Hergünel O., Yasar L. An alternative treatment in hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis in pregnancy: Plasmapheresis. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.*, 2012, Vol. 28, no. 2, pp. 252-254.
16. Avsar A.F., Yildirim M., Cinkaya A. Unexpected fetal demise despite the reactive nonstress test during the conservative management of acute pancreatitis in pregnancy. *Int. J. Surg. Case Rep.*, 2014, Vol. 5, no. 12, pp. 1047-1049.
17. Charlet P., Lambert V., Carles G. Acute pancreatitis and pregnancy: Cases study and literature review. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)*, 2015, Vol. 44, no. 6, pp. 541-549.
18. Fan S.J., Xiang J.X., Xiao M., Wang F.H., Lin X.J., Zhou X.H., Ai T., Liu L. Influence of acute pancreatitis in pregnancy on pregnancy outcomes and neonates. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 274-278.
19. Frise C.J., Ashcroft A., Jones B.A., Mackillop L. Pregnancy and ketoacidosis: Is pancreatitis a missing link? *Obstet. Med.*, 2016, Vol. 9, no. 2, pp. 60-63.
20. Gilbert A., Patenaude V., Abenhaim H.A. Acute pancreatitis in pregnancy: a comparison of associated conditions, treatments and complications. *J. Perinat. Med.*, 2014, Vol. 42, no. 5, pp. 565-570.
21. Guo Z.D., Zhao L., Wang P., Deng W.H., Shi Q., Zuo T., Hong Y.P., Wang W.X. Fetal liver injury ameliorated by migration inhibitory factor inhibition in a rat model of acute pancreatitis in pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2018, Vol. 44, no. 3, pp. 374-383.
22. Hostinská E., Huml K., Pilka R. Acute pancreatitis in pregnancy, complicated by rupture of aneurysm of artery lienalis. *Ceska Gynekol. Summer*, 2016, Vol. 81, no. 3, pp. 208-211.
23. Lawani I., Kpessou A.R., Noukpozounkou B., Gnanon F.H.R., Souaibou Y.I., Gbessi D.G., Houngpatin B., Dossou F.M., Olory-Togbe J.L. Severe acute pancreatitis during pregnancy among black African women: about a case. *Pan Afr. Med. J.*, 2017, no. 26, p. 175.
24. Lim R., Rodger S.J., Hawkins T.L. Presentation and management of acute hypertriglyceridemic pancreatitis in pregnancy: A case report. *Obstet. Med.*, 2015, Vol. 8, no. 4, pp. 200-203.
25. Luo L., Zen H., Xu H., Zhu Y., Liu P., Xia L., He W., Lv N. Clinical characteristics of acute pancreatitis in pregnancy: experience based on 121 cases. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2018, Vol. 297, no. 2, pp. 333-339.

26. Mei F, Zuo T, Zhao L, Shi Q, Xiang M, Hong Y, Li M, Wang W. Differential JNK, p38 and ERK response to renal injury in a rat model of acute pancreatitis in pregnancy. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2018, Vol. 297, no. 4, pp. 933-942.
27. Sang C., Wang S., Zhang Z., Lu J. Characteristics and outcome of severe preeclampsia/eclampsia concurrent with or complicated by acute pancreatitis: a report of five cases and literature review. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, 2017, no. 17, pp. 1-8.
28. Yang L., Zhao Z., Zhou K., Zhang Y. Acute hyperlipidemic pancreatitis accompanied by chylous ascites with normal amylase and lipase in pregnancy. *J. Clin. Lipidol.*, 2017, Vol. 11, no. 4, pp. 1091-1094.
29. Zhou Y., Zhao L., Mei F., Hong Y., Xia H., Zuo T., Ding Y., Wang W. Macrophage migration inhibitory factor antagonist (S,R)3 (4 hydroxyphenyl) 4,5 dihydro 5 isoxazole acetic acid methyl ester attenuates inflammation and lung injury in rats with acute pancreatitis in pregnancy. *Mol. Med. Rep.*, 2018, Vol. 17, no. 5, pp. 6576-6584.

Авторы:

Хворостухина Н.Ф. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Новичков Д.А. — к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Authors:

Khvorostukhina N.F., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, OBGYN Department, Saratov State V. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Novichkov D.A., PhD (Medicine), Associate Professor, OBGYN Department, Saratov State V. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Поступила 31.05.2018
Отправлена на доработку 13.06.2018
Принята к печати 22.06.2018

Received 31.05.2018
Revision received 13.06.2018
Accepted 22.06.2018

АНАЛИЗ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ Т-КЛЕТОК И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ИНСУЛЬТЕ

Овсепян Л.М., Казарян Г.С., Зангинян А.В., Захарян Г.В.

Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, Армения

Резюме. Проведено исследование уровня экспрессии генов транскрипционных факторов (GATA-3, TBX21, IL-2RG), а также изменения окислительных процессов при ишемическом инсульте.

Обнаружено, что при инсульте наблюдается активирование Th2-клеток (повышение экспрессии транскрипционного фактора GATA-3) и подавление Th1-клеток (понижение экспрессии IL-2 и его рецепторов, а также гена TBX21). Повышение экспрессии транскрипционного фактора GATA-3 у больных инсультом лежит в основе увеличения продукции у этих больных Th2-цитокинов. Сравнительный анализ окисления белков в плазме крови выявил повышение интенсивности окислительной модификации белков у больных инсультом. Исследование содержания глутатиона, активности ферментов глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы в эритроцитах при инсульте обнаружило уменьшение содержания глутатиона и глутатионредуктазы и увеличение активности глутатионпероксидазы.

Полученные данные могут быть полезными для более полного понимания механизмов инсульта.

Ключевые слова: инсульт, экспрессия генов, окислительная модификация белков, глутатион

ANALYSIS OF THE EXPRESSION LEVEL OF T CELL GENES AND OXIDATIVE PROCESSES IN STROKE

Ovsepyan L.M., Kazaryan G.S., Zanginyan A.V., Zakharyan G.V.

Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Yerevan, Armenia

Abstract. The expression levels of the genes encoding transcription factors (GATA-3, TBX21, IL-2PG), and changes of oxidative processes in ischemic stroke were studied in T cells. We have found a potential activation of Th2 cells (increased expression of transcription factor GATA-3), and suppression of Th1 cells was observed in stroke (a decrease in IL-2 and IL-2 receptors, as well as the TBX21 gene expression,). Increased expression of GATA-3 transcription factor in stroke patients underlies an increased production of Th2-cytokines in these patients.

A comparative analysis of protein oxidation in blood plasma revealed an increase in the intensity of oxidative modification of proteins in stroke patients.

Measurements of glutathione content, activity of erythrocyte glutathione peroxidase and glutathione reductase enzymes in the patients with stroke revealed a decreased content of glutathione and glutathione reductase, along with increased activity of glutathione peroxidase. These findings may be useful for better understanding of pathogenetic mechanisms in brain stroke.

Keywords: stroke, gene expression, oxidative modification of protein, glutathione

Адрес для переписки:

Зангинян Асмик Владимировна
Институт молекулярной биологии Национальной
академии наук Республики Армения
0014, Армения, Ереван, ул. Эзраса Азратяна, 7.
Тел.: +3749 142-82-29.
E-mail: hzang@mail.ru

Address for correspondence:

Zanginyan Asmik V.
Institute of Molecular Biology
0014, Armenia, Yerevan, Ezras Hasratyan str., 7.
Phone: +3749 142-82-29.
E-mail: hzang@mail.ru

Образец цитирования:

Л.М. Овсепян, Г.С. Казарян, А.В. Зангинян,
Г.В. Захарян «Анализ уровня экспрессии генов
Т-клеток и окислительные процессы при инсульте»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2.
С. 251-256.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-251-256
© Овсепян Л.М. и соавт., 2019

For citation:

L.M. Ovsepyan, G.S. Kazaryan, A.V. Zanginyan,
G.V. Zakharyan "Analysis of the expression level of T cell
genes and oxidative processes in stroke", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2,
pp. 251-256. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-251-256

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-251-256

Введение

Проблема ишемических поражений головного мозга является одной из наиболее актуальных в современной неврологии. Среди ишемических заболеваний мозга наибольшую значимость представляет инсульт, который является следствием снижения мозгового кровотока, в большинстве случаев вызванного окклюзией мозговых артерий тромбом, в результате которого происходит уменьшение доставки к нейронам необходимого количества глюкозы и кислорода, которые требуются для нормальной функции [1].

Одним из механизмов повреждения нервной ткани при инсульте является воспаление, связанное с утратой иммунного ответа на Т-клеточные рецепторы, сопровождающееся нарушением нейроиммунного гомеостаза мозга и центральной регуляции функций иммунной системы [8, 9].

Процессы пролиферации, дифференцировки и функциональная активность всех иммунокомпетентных клеток находятся под контролем цитокинов, которые в основном продуцируются Th1- и Th2-клетками. Эти Т-хелперы различаются по продуцируемым ими цитокинам и роли в стимулировании развития иммунного ответа по клеточному или гуморальному типу. Нарушение баланса продукции цитокинов Th1/Th2-клетками играет важную роль в иммунопатогенезе [7]. Метаболическое состояние клеток иммунной системы, определяющее уровень продукции активных форм кислорода, является одним из регуляторов Th1/Th2-баланса в организме.

Целью настоящей работы явилось исследование уровня экспрессии генов транскрипционных факторов (GATA-3, TBX21), IL-2 и его рецептора IL-2RG, изменения окислительной модификации белка, а также содержания глутатиона и активности ферментов (глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы) при ишемическом инсульте мозга (ИИМ).

Материалы и методы

Субъектами исследования являлись больные ишемическим инсультом (n = 55) и здоровые

люди (n = 74). Больные ишемическим инсультом находились на лечении в Медицинском центре «Святой Григорий Просветитель» и Республиканском медицинском центре «Армения». Контрольную группу составили доноры медицинского центра «Эребуни» МЗ РА. Исследования были одобрены Комитетом по этике Института молекулярной биологии НАН РА (IRB #00004079).

Средний возраст больных – $72,07 \pm 1,5$.

У больных кровь бралась в течение первых двух дней после ишемического инсульта. Кровь брали в вакуумные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта ЭДТА. Для выделения лейкоцитов к 5 мл цельной крови добавляли 10 мл лизирующего раствора, включающего в свой состав (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 и 0,1 mM Na_2EDTA , pH = 7).

Полученный осадок лимфоцитов дважды промывали PBS (фосфатно-солевой буфер, pH = 7,4), а затем хранили при -20°C в растворе, состоящем из 100 мкл RNeasy lysis reagent и 50 мкл PBS.

Выделение РНК из лимфоцитов проводили с использованием коммерческого набора реагентов ("High pure miRNA Isolation Kit"; Roche Applied Science, Германия). Выделенную РНК хранили при -80°C до обратной транскрипции PCR.

Обратную транскрипцию проводили ПЦР с помощью Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit согласно инструкции протокола. Полученные ДНК хранили при -30°C [5].

RPL32 использовали в качестве контрольного гена для ПЦР в реальном времени. Информация о праймерах представлена в таблице 1.

ПЦР в реальном времени и предварительный анализ полученных результатов были сделаны на системе Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Сидней, Австралия).

Для статистической обработки данных использовали программу GraphPad Prism 5 Demo (<http://www.graphpad.com>). Результаты представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка ($M \pm m$). При установлении достоверности различий данных использовали t-критерий Стьюдента и U-критерий Манна–Уитни.

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ ГЕНОВ PSMB2, IL-2 И IL-2PG, GATA-3

TABLE 1. SEQUENCES OF THE PSMB2, IL-2 AND IL-2PG, GATA-3 GENE PRIMERS

Ген Gene	Правый праймер Right primer	Левый праймер Left primer	Пробы № Probe N	Длина ампликона Length of amplicon
PSMB2	5'-aggtggcagattcaggatg	5'-agagggcagtggaactcctt	#50	72 нуклеотид 72 nucleotide
IL-2	5'-aagtgaagttttgcttgagc	5'-aggccacagaactgaaacatc	#65	94 нуклеотид 94 nucleotide
IL-2PG	5'-gctgggattcactcagttt	5'-gacagggccacacagatgcta	#50	90 нуклеотид 90 nucleotide
GATA-3	5'-aggtggcagattcaggatg	5'-agagggcagtggaactcctt	#71	68 нуклеотид 68 nucleotide

Значение $p < 0,05$ рассматривалось как статистически достоверное

Для количественного определения продуктов окислительной модификации белков был применен метод, основанный на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков и 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, количество которых определяли спектрофотометрически. Оптическую плотность образовавшихся карбонильных производных динитрофенилгидразонов регистрировали при разной длине волн: 356 нм — алифатические кетондинитрофенилгидразоны (КДНФГ) нейтрального характера; 370 нм — алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны (АДНФГ) нейтрального характера; 430 нм — алифатические КДНФГ основного характера; 530 нм — алифатические АДНФГ основного характера [11]. Уровень карбонильных групп рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции, равный $21\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Белок определяли по Лоури [12].

Состояние тиол-дисульфидной системы изучали по содержанию глутатиона и активности ферментов — глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР) в эритроцитах [6].

Результаты и обсуждение

Одной из главных предпосылок к активному изучению роли Т-клеток в формировании защиты является их способность синтезировать цитокины. Регуляторами функций лимфоцитов выступают транскрипционные факторы, способные как активировать, так и подавлять деятельность клетки.

Сравнительное изучение уровня экспрессии гена IL-2 в лейкоцитах периферической крови показало, что уровни экспрессии гена IL-2 пони-

жены у больных инсультом по сравнению со здоровыми (рис. 1), что свидетельствует о супрессии его продукции Т-лимфоцитами.

Первоначальным эффектом IL-2 является его взаимодействие с CD4^+ лимфоцитами, что в дальнейшем приводит к формированию клонов Т-хелперов 1 типа. При получении активирующего сигнала в Th1-лимфоцитах начинают экспрессироваться гены IL-2, IFN, TNF α .

IL-2 и его рецептор необходимы для пролиферации Т-клеток, отсутствие одного из них приводит к иммунному дефициту, IL-2 обладает выраженной способностью индуцировать активность практически всех клонов цитотоксических клеток. Он был первым интерлейкином, у которого была выявлена эта способность. IL-2 повышает цитолитическую функцию Т-киллеров и НК-клеток, увеличивает продукцию перфоринов и IFN γ этими клетками, активирует моноциты и макрофаги, которые повышают синтез и секрецию TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 [8].

Основными эндогенными продуцентами IL-2 являются активированные Th1 CD4^+ лимфоциты, а также цитотоксические CD8^+ лимфоциты. Главное действие, оказываемое им на Т-лимфоциты, — индукция пролиферации в результате преодоления точки рестрикции между фазами цикла G1a и G1b.

Биологическая активность IL-2 возникает (или проявляется) при его связывании со специфическими рецепторами, которые экспрессируются активированными клетками-мишенями на своей мембране.

У-рецептор IL-2 является рецептором многих цитокинов, участвующих в индукции и регуляции иммунного ответа (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9).

Результаты исследования показали нарушение генов кодирующих IL-2, IL-2RG при инсульте.

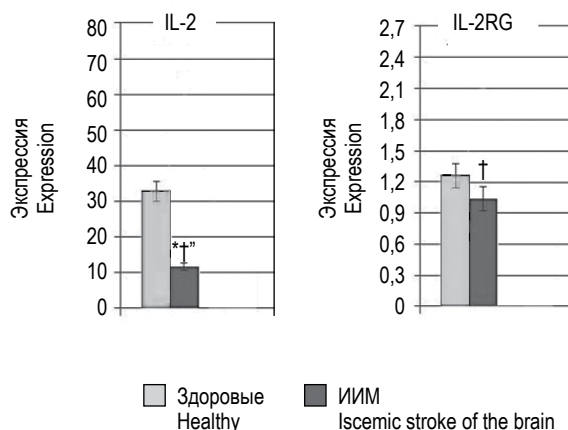


Рисунок 1. Уровень экспрессии IL-2 и IL-2RG у здоровых и больных инсультом

Figure 1. Expression levels of IL-2 and IL-2RG genes in healthy persons and stroke patients

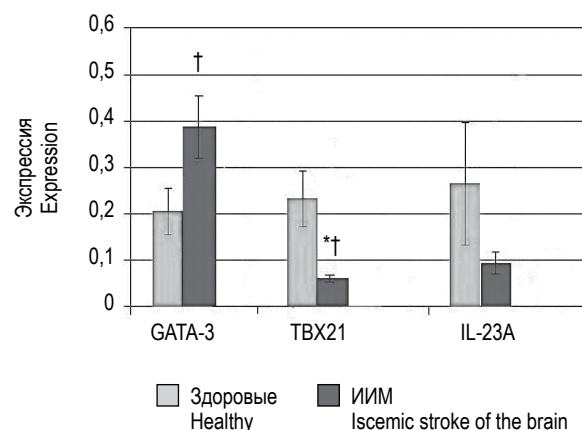


Рисунок 2. Уровень экспрессии GATA-3, TBX21, IL-23A у здоровых и больных инсультом

Figure 2. Expression levels of GATA-3, TBX-21, IL-23A genes in healthy persons and patients with stroke

Результаты оценки экспрессии генов GATA-3 в лимфоцитах показали, что у больных инсультом увеличивается экспрессия GATA-3 по сравнению со здоровыми, усиленная экспрессия GATA-3 индуцирует образование Th2-клеток (рис. 2).

GATA-3 необходим для развития Th2-фенотипа и действует посредством активации секреции соответствующих цитокинов в Th2-клетках (IL-4, IL-5 и IL-13) [4].

Исходя из полученных нами данных, повышение экспрессии GATA-3 приводит к усилению образования Th2-клеток.

Особый интерес вызывает изменение гена TBX21 при инсульте.

Продуктом гена TBX21 является транскрипционный фактор T-bet. Основная функция T-bet состоит в индукции дифференцировки Th1-клетки и подавления развития Th2-клеток [11]. Основным типом клеток, в которых TBX21 экспрессируется, является разновидность CD4 T-лимфоцитов – Th1-клетки. В Th2-клетках этот ген не экспрессируется.

Известно, что дисбаланс Th1/Th2 приводит к иммунопатологии. Согласно нашим данным, при инсульте наблюдается активирование Th2-клеток (повышение экспрессии транскрипционного фактора GATA-3) и подавление Th1-клеток (понижение экспрессии IL-2 и гена TBX21).

Регуляция экспрессии генов происходит главным образом на уровне транскрипции и определяется составом и активностью белков-активаторов, связывающихся с cis-регуляторными последовательностями ДНК и определяющими скорость инициации транскрипции при взаимодействии с транскрипционным комплексом. Экспрессия многих генов зависит от окислительно-восстановительного потенциала клетки, что обеспечивается нормальным составом белков в клетке и осуществляется редокс-активными белками [2].

Универсальными индукторами изменений редокс-баланса в ответ на стрессорные воздействия выступают активные метаболиты кислорода, а также продукты свободнорадикальных процессов липидов и белков [5].

Исходя из этого, нами было проведено исследование по определению окислительной модификации белков в плазме крови у больных инсультом людей.

Как показали результаты исследования, при инсульте статистически значимо увеличивается уровень алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов, регистрируемых при длине волн 356, 370, 430, 530 нм. Данный факт свидетельствует об увеличении интенсивности процесса окислительной деструкции белков свободными радикалами (табл. 2).

Фактически все аминокислотные остатки белков способны к окислению, что приводит к изменению их функций. Окислению подвергнутся сульфо- и аминокислотные группы аминокислот, которые могут приводить к образованию поперечных сшивок между белками или между белком и другой молекулой, содержащей NH₂ группу. Наиболее распространенным пусковым механизмом окислительного повреждения мембранных белков является реакция сульфигидрильных (SH) групп аминокислот со свободными радикалами. При этом образуются радикалы с локализацией неспаренного электрона около атома серы (-S•), которые затем взаимодействуют друг с другом с образованием дисульфидов.

Результатом окисления аминокислот может быть нарушение вторичной и третичной структуры белков, облегчающее дальнейшее окисление аминокислотных остатков, и денатурация белковых молекул, в результате чего нарушаются их функции, в частности инактивируются ферменты.

Свободные радикалы атакуют белки по всей длине полипептидной цепи, нарушая не только первичную, но и вторичную, и третичную структуру белков, что приводит к агрегации или фрагментации белковой молекулы. Многие ферменты, содержащие SH-группы, такие как АТФазы или дегидрогеназы, легко окисляются в результате свободнорадикальной атаки. В первую очередь воздействию кислородных радикалов подвергаются остатки пролина, гистидина и аргинина, поскольку именно их окисление приводит к снижению содержания восстановленных и повышению уровня окисленных SH-групп. Модификация

ТАБЛИЦА 2. ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ У ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ (ед. опт. плот./мг белка) (n = 20)

TABLE 2. OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN BLOOD PLASMA IN DONORS AND PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE (units of optical density/ per mg protein) (n = 20)

	Длина волны Wave length			
	356	370	430	530
Контроль Control	13,94±0,8	16,0±0,6	8,34±0,5	3,15±0,5
Инсульт Stroke	19,72±0,9 p < 0,001	22,93±0,7 p < 0,001	11,25±0,6 p < 0,001	4,45±0,6

фикация белков делает их более чувствительными к протеолизу. Удаление модифицированных белков осуществляется двумя механизмами — с помощью протеасом и протеаз. Увеличение карбонильных белков может быть результатом снижения активности клеточных протеазных систем. Показано, что снижение функции протеасом сопровождается накоплением поврежденных белков. Накопление поврежденных белков указывает на повышение уровня окислительного стресса и на повреждение протеасом клеток, что приводит не только к накоплению поврежденных белков, но и к упадку функциональной активности Т-клеток [14].

Биохимические процессы генной экспрессии — транскрипция на первом этапе (биосинтез молекул информационной или матричной РНК на матрице ДНК) и трансляция на втором этапе (процесс синтеза белка на основе кодовой последовательности нуклеотидов в мРНК) — определяются доступностью АТФ и GTP и в целом сохранностью энергетического метаболизма. Одной из причин развития инсульта является ишемия, в результате которой нарушается доставка кислорода в мозг, что приводит к ряду регуляторных функционально-метаболических изменений в митохондриях, среди которых нарушения состояния митохондриальных ферментных комплексов играют ведущую роль, приводя к активации свободнорадикальных реакций, к падению мембранного потенциала, к нарушению синтеза АТФ и развитию окислительного стресса [1]. Окислительный стресс и/или изменение клеточного редокс-статуса могут влиять на состояние ядерного хроматина и вызывать изменения экспрессии генов [3].

Генерация АФК в дыхательной цепи вызывает повреждение расположенных в непосредственной близости SH-групп тиоловых ферментов и самих мембранных структур, в которых компартментализована система переноса электронов. В условиях окислительного стресса большое значение имеет антиоксидантная система митохондрий, что обеспечивается находящимися внутри митохондрий антиоксидантами. Одним из основных антиоксидантов в клетках является глутатион. Согласно литературным данным, уменьшение содержания глутатиона приводит к изменению уровня транскрипции в ядре, что может модулировать структурную организацию хроматина [4]. Ядерный глутатион связан с синтезом ДНК, возможно, являясь «редокс-сенсором» для начала процесса синтеза ДНК, поддерживая при этом необходимую архитектуру в ядре за счет оптимального редокс-статуса для репликации ДНК и сохранения ее целостности [10]. Основу клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза, с помощью которого может поддерживаться редокс-состояние тиольных групп белков, составляет отношение восстанов-

ленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона. Нарушение данного соотношения оказывает существенное влияние с точки зрения редокс-регуляции функционирования белков на процессы сигнальной трансдукции, контроля экспрессии генов, клеточной пролиферации, дифференцировки, состояния клеточного метаболизма и жизнедеятельности клетки в целом.

Как показали результаты исследования, у больных инсультом в эритроцитах наблюдается понижение содержания глутатиона и глутатионредуктазы, при повышении активности глутатионпероксидазы.

Система глутатиона, включающая собственно глутатион, глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу, является одним из важнейших компонентов антиоксидантной, антирадикальной защиты клеток. Скорость ее реакции и сродство к гидроперекисям настолько велики, что она может конкурировать за гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот, включенные в цепь радикального процесса, ведущего к образованию перекисей, МДА, и благодаря этому выступать в роли своеобразного антиоксиданта. Продукты восстановления перекисей липидов — оксикислоты метаболизируют далее, а окисленный глутатион восстанавливается в GSH — редуктазной реакции глутатиона. По структуре глутатион — это трипептид, состоящий из аминокислот глутамина, цистеина и глицина. Сульфгидридная группа (SH) является основным инструментом глутатиона в реализации антиоксидантного и детоксикационного действия — используется как донор электрона в антиоксидантных реакциях.

Важнейшая роль глутатиона как антиоксиданта объясняется высоким восстановительным потенциалом молекулы и высокой внутриклеточной концентрацией, система глутатиона связывает свободные радикалы, восстанавливает перекиси, а также продукты перекисного окисления липидов, фосфолипидов мембран, белков, нуклеиновых кислот и выводит их из организма в виде нетоксичных конъюгатов глутатиона, обеспечивая нормальное функционирование белков, липидов, нуклеиновых кислот, которые регулируют процессы сигнальной трансдукции, контроля экспрессии генов и состояние клеточного метаболизма.

Заключение

Таким образом, полученные нами данные, касающиеся изменения экспрессии транскрипционных факторов, показали, что при инсульте имеет место нарушение экспрессии генов в Т-клетках, изменение окислительной модификации белков, а также изменение содержания глутатиона и его ферментов. Полученные данные могут быть полезны для более полного понимания механизмов инсульта.

Список литературы / References

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина, 2001. 327 с. [Gusev E.I., Skvortsova V.I. Ischemia of the brain]. Moscow: Medicine, 2001. 327 p.
2. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б. Окислительная модификация липопротеинов низкой плотности // Успехи современной биологии, 1996. Т. 116, № 6. С. 286-296. [Zenkov N.K., Menshikova E.B. Oxidative modification of low-density lipoproteins. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 1996, Vol. 116, no. 6, pp. 286-296. (In Russ.)]
3. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // Успехи биологической химии, 2014. Т. 54. С. 299-384. [Kalinina E.V., Chernov N.N., Novichkova M.D. The role of glutathione transferase and glutaredoxin in the regulation of redox-dependent processes. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry*, 2014, Vol. 54, pp. 299-384. (In Russ.)]
4. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Глутатитон ядра клетки и его функции // Биомедицинская химия, 2010. Т. 56, вып. 6. С. 657-662. [Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. Glutatiton cell nucleus and its functions. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2010, Vol. 56, issue 6, pp. 657-662. (In Russ.)]
5. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Капелько В.И., Шепелькова Г.С., Шумаев К.Б., Панасенко О.М., Коновалова Г.Г., Беленков Ю.Н. Механизмы окислительной модификации липопротеидов низкой плотности при окислительном и карбонильном стрессах // Биохимия, 2007. Т. 72, № 10. С. 1330-1341. [Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Kapelko V.I., Shepelkova G.S., Shumayev K.B., Panasenko O.M., Konovalova G.G., Belenkov Yu.N. Mechanisms of oxidative modification of low-density lipoproteins under oxidative and carbonyl stress. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2007, Vol. 72, no. 10, pp. 1330-1341. (In Russ.)]
6. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. 272 с. [Prokhorova M.I. Methods of biochemical research]. Leningrad: Leningrad State University, 1982. 272 p.
7. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
8. Brait V.H., Arumugam T.V., Drummond G.R., Sobey C.G. Importance of T lymphocytes in brain injury, immunodeficiency, and recovery after cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2012, Vol. 32, no. 4, pp. 598-611.
9. Chamorro Á., Meisel A., Planas A.M., Urra X., van de Beek D., Veltkamp R. The immunology of acute stroke. *Nat. Rev. Neurol.*, 2012, Vol. 8, no. 7, pp. 401-410.
10. Fratelli M., Goodwin L.O., Ørom U.A., Lombardi S., Tonelli R., Mengozzi M., Ghezzi P. Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, Vol. 10, no. 39, pp. 13998-14003.
11. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.*, 1990, Vol. 186, pp. 464-478.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, Vol. 193, no. 1, pp. 265-275.
13. Overholtzer M., Brugge J.S. The cell biology of cell-in-cell structures. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, Vol. 9, no. 10, pp. 796-809.
14. Ponnappan S., Ova H., Ponnappan U. Lower expression of catalytic and structural subunits of the proteasome contributes to decreased proteolysis in peripheral blood T lymphocytes during aging. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, Vol. 39, no. 4, pp. 799-809.
15. Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L., Zhang X., Fathman C.G., Glimcher L.H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 2000, Vol. 100, no. 6, pp. 655-669.

Авторы:

Овсеян Л.М. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, Армения

Казарян Г.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, Армения

Зангинян А.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, Армения

Захарян Г.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, Армения

Authors:

Ovsepyan L.M., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Yerevan, Armenia

Kazaryan G.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Yerevan, Armenia

Zanginyan A.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Yerevan, Armenia

Zakharyan G.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Yerevan, Armenia

Поступила 06.06.2018

Отправлена на доработку 29.06.2018

Принята к печати 20.09.2018

Received 06.06.2018

Revision received 29.06.2018

Accepted 20.09.2018

ОЦЕНКА УРОВНЯ СУБПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ CD14⁺/CD16⁺ У БОЛЬНЫХ ЮНОШЕСКИМИ ДЕПРЕССИЯМИ

Васильева Е.Ф., Секирина Т.П., Сарманова З.В., Зозуля С.А.,
Омельченко М.А., Ключник Т.П.

ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Резюме. В настоящее время моноциты крови разделяют по крайней мере на две фенотипически различные субпопуляции: «классические» моноциты с фенотипом CD14⁺⁺/CD16⁻ и «неклассические» (провоспалительные) с фенотипом CD14⁺/CD16⁺. Установлено, что моноциты CD14⁺/CD16⁺, наряду с нейтрофилами крови и микроглиальными клетками мозга, которые являются аналогом моноцит/макрофагальной системы в мозге, участвуют в развитии скрытого, или так называемого системного, воспаления рассматривают как одно из звеньев нейродегенеративного процесса неинфекционного воспаления в организме человека, нарушения функций моноцитов, лежащего в основе нейровоспалительной гипотезы развития шизофрении. В связи с этим целью настоящего исследования было изучение количества провоспалительных моноцитов у больных юношескими депрессиями по уровню экспрессии рецепторов CD14⁺/CD16⁺, а также активности лейкоцитарной эластазы и α 1-протеиназного ингибитора. Представлялось также интересным определить механизмы их взаимодействия в патогенезе иммуновоспаления, в частности, выявить возможную связь моноцитов CD14⁺CD16⁺ с активностью лейкоцитарной эластазы и α 1-протеиназного ингибитора у больных юношескими депрессиями на ранней стадии заболевания. Было обследовано 27 больных мужского пола в возрасте 17-23 лет. Диагностическая оценка заболевания проводилась в соответствии с критериями МКБ-10, согласно которой у всех больных в структуре психопатологических расстройств выявлялась депрессия с синдромом аттенуированных психотических симптомов (Attenuated Psychotic Syndrome). В качестве контроля обследовали 12 психически здоровых мужчин соответствующего возраста. Моноциты получали общепринятым способом адгезии к пластиковой поверхности из мононуклеарных клеток, выделенных из периферической венозной крови больных и здоровых центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077$). Изучали в крови больных и здоровых уровень моноцитов с фенотипом CD14⁺/CD16⁺, энзиматическую активность лейкоцитарной эластазы и функциональную активность α 1-протеиназного ингибитора эластазы. В ходе проведенного клинико-лабораторного исследования выявлено повышение более чем в два раза уровня провоспалительной субпопуляции моноцитов CD14⁺/CD16⁺ у больных по сравнению с его уровнем у здоровых индивидов, которое сопровождалось увеличением активности лейкоцитарной эластазы и α 1-протеиназного ингибитора. Выявлена положительная корреляционная связь между повышением экспрессии поверхностных рецепторов CD14⁺/CD16⁺ на моноцитах и увеличением активности лейкоцитарной эластазы.

Эти результаты подтверждают участие моноцитов CD14⁺/CD16⁺ в развитии скрытого или неинфекционного иммунного воспаления, а также определяют механизмы возможного взаимодействия

Адрес для переписки:

Васильева Елена Федоровна
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»
115522, Россия, Москва, Каширское ш., 34.
Тел.: 8 (905) 779-72-37.
Факс: 8 (495) 109-03-67 (доб. 9705).
E-mail: el_vasilyeva@mail.ru

Address for correspondence:

Vasilyeva Elena F.
Mental Health Research Center
115522, Russian Federation, Moscow, Kashirskoe highway, 34.
Phone: 7 (905) 779-72-37.
Fax: 7 (495) 109-03-67 (add. 9705).
E-mail: el_vasilyeva@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Ф. Васильева, Т.П. Секирина, З.В. Сарманова, С.А. Зозуля, М.А. Омельченко, Т.П. Ключник «Оценка уровня субпопуляции моноцитов CD14⁺/CD16⁺ у больных юношескими депрессиями» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 257-268.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-257-268
© Васильева Е.Ф. и соавт., 2019

For citation:

E.F. Vasilyeva, T.P. Sekirina, Z.V. Sarmanova, S.A. Zozulya, M.A. Omelchenko, T.P. Klyushnik "Estimation of CD14⁺/CD16⁺ monocyte subpopulation levels in patients with juvenile depressions", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 257-268.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-257-268
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-257-268

моноцитов и нейтрофилов в развитии иммунного воспаления у больных юношескими депрессиями с синдромом аттенуированных психотических симптомов.

Ключевые слова: юношеские депрессии, «классические» моноциты CD14⁺⁺/CD16⁻, провоспалительные моноциты CD14⁺/CD16⁺, лейкоцитарная эластаза, α 1-протеиназный ингибитор, иммунное воспаление

ESTIMATION OF CD14⁺/CD16⁺ MONOCYTE SUBPOPULATION LEVELS IN PATIENTS WITH JUVENILE DEPRESSIONS

Vasilyeva E.F., Sekirina T.P., Sarmanova Z.V., Zozulya S.A.,
Omelchenko M.A., Klyushnik T.P.

Mental Health Research Center, Moscow, Russia Federation

Abstract. At present, two major subpopulations of blood monocytes have been identified which are phenotypically different: “classical” CD14⁺⁺/CD16⁻ monocytes and “non-classical” (pro-inflammatory) CD14⁺/CD16⁺ cells. The CD14⁺/CD16⁺ monocytes have been shown to participate in latent, or so-called systemic non-infectious inflammation in humans, along with blood neutrophils and microglial cells. The latter represent an analogue of monocyte/macrophage system in the brain. Monocyte functional disorders are considered a pathogenetic link in neurodegenerative process underlying neuroinflammatory hypothesis in schizophrenia development. In this connection, the aim of present research was to study the amounts of pro-inflammatory monocytes, in terms of expression levels of CD14⁺/CD16⁺ receptors, as well as activity of leukocyte elastase, and α 1-proteinase inhibitor in the patients with juvenile depression. Of interest was also to determine the mechanisms of their interactions in pathogenesis of immune suppression, in particular, to identify a possible connection of pro-inflammatory monocytes with activity of the leukocyte elastase and α 1-proteinase inhibitor in patients with juvenile depression at the early stage of disease. Twenty-seven male patients (17 to 23 years old) were observed. Clinical diagnostics of the disease was carried out in accordance with ICD-10 criteria, thus showing depression with a syndrome of attenuated psychotic symptoms in all the patients (Attenuated Psychotic Syndrome) in the structure of psychopathological disorders. 12 mentally healthy age- and gender-matched persons were examined as controls. Monocytes were obtained by a conventional method by adhesion of mononuclear cells to plastic surface after preceding isolation of mononuclear cell fraction from peripheral venous blood of the patients and healthy controls in a Ficoll-Urografin density gradient ($\rho = 1.077$). The levels of monocytes with CD14⁺/CD16⁺ phenotype, enzymatic activity of leukocyte elastase, and functional activity of α 1-proteinase inhibitor were studied in blood samples of the patients and healthy controls. The clinical and laboratory study showed a more than two-fold increase in the levels of pro-inflammatory CD14⁺/CD16⁺ monocyte subpopulations in the patients compared with appropriate values in healthy controls. The increase was accompanied by elevation of leukocyte elastase, and α 1-proteinase inhibitor activity. A positive correlation was found between the increase of surface receptors CD14⁺/CD16⁺ expression on monocytes, and elevation of the leukocyte elastase activity.

These results confirm participation of CD14⁺/CD16⁺ monocytes in development of latent, or non-infectious immune inflammation, and determine the mechanisms of possible interaction between monocytes and neutrophils in development of immune inflammation in the patients suffering from juvenile depressions with Attenuated Psychotic Syndrome.

Keywords: juvenile depression, “classical” CD14⁺⁺/CD16⁻ monocytes, pro-inflammatory CD14⁺/CD16⁺ monocytes, leukocyte elastase, α 1-proteinase inhibitor, immune inflammation

Введение

В клинко-биологических исследованиях, направленных на изучение заболеваний, основу которых составляет скрытое, или так называемое системное стерильное, воспаление, обнаружена активация моноцитов и макрофагов [3, 23] и увеличение продукции ими провоспалительных цитокинов [15]. Скрытое воспаление

отличается от острого воспаления, которое является ответом на вирусную или бактериальную инфекцию или реакцией на повреждение ткани тем, что протекает практически бессимптомно. Скрытое воспаление также называют иммунным, неинфекционным или стерильным воспалением, так как основной причиной его появления являются эндогенные факторы, такие как ци-

токины, продуцируемые Т-хелперами 2-го типа (Th2-цитокины), ростовые факторы, высокие концентрации глюкозы, модифицированные липопротеиды и некоторые другие [3]. Иммунное воспаление инициируется также экзогенными факторами: к ним относят геномный стресс, гипоксический стресс, пищевой стресс и др. Все эти факторы стимулируют тщательно управляемый иммунный ответ, который индуцирует рекрутирование клеток, отвечающих на воспаление [23]. Если токсические компоненты не элиминируются, то происходит развитие патологического процесса, который лежит в основе патофизиологии многих болезней человека, включая и психические заболевания [8].

В иммунологических исследованиях было установлено, что одними из основных клеток врожденного иммунитета, участвующих в системном иммунном воспалении наряду с нейтрофилами [27], являются моноциты и тканевые макрофаги [15], а также глиальные клетки, которые являются аналогом моноцит/макрофагальной системы в мозге [18].

Уже в конце прошлого века в исследованиях ряда авторов было выявлено, что популяция моноцитов является гетерогенной. В начале этих исследований сообщалось о делении моноцитов на два подтипа по размеру и плотности: большие и малые, различающиеся по их фагоцитирующей и провоспалительной активности [12].

В настоящее время установлено, что моноциты различаются также по уровню экспрессии рецепторов, представленных на их поверхности. Известно, что на поверхности моноцитов/макрофагов находятся наиболее значимые в функциональном отношении мембранные молекулы, так называемые Toll-подобные (TL) рецепторы [12], которые распознают консервативные структурные компоненты бактерий, вирусов и грибов. Эти рецепторы играют основную роль во врожденном иммунитете. Они в основном локализованы на клеточной мембране, но могут находиться и внутри клетки. На моноцитах/макрофагах экспрессируются все разновидности TL-рецепторов: от TLR1 до TLR11 [17], с помощью которых макрофаги и моноциты распознают фактически все основные группы патогенов. При этом с мембранным рецептором TLR4 функционально связан один из основных маркеров моноцитов и макрофагов – молекула CD14, которая взаимодействует с комплексом бактериальных и грибковых липополисахаридов (ЛПС), липопротеидов и др. либо с микробными нуклеиновыми кислотами или белками (флагеллин, профилин) [21].

К другой группе рецепторов, представленных на моноцитах/макрофагах, относят Fc-рецепторы (молекулы, распознающие Fc-участок молекул

иммуноглобулинов, обычно в связанном с антигеном состоянии). Эти рецепторы обеспечивают распознавание и фагоцитоз моноцитами и макрофагами опсонизированных антителами клеток (в том числе патогенных). На моноцитах присутствует полный набор Fcγ-рецепторов – FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16) [11].

По современным представлениям, в организме человека определяется по меньшей мере два подтипа моноцитов, которые различаются фенотипически по экспрессии рецепторов CD14 и CD16 [30]. Преобладающим подтипом являются так называемые «классические» моноциты (“classical” monocytes), экспрессирующие на своей поверхности высокий уровень CD14 и не экспрессирующие CD16 (CD14⁺⁺/CD16⁻). По данным некоторых авторов, у здоровых молодых индивидуумов они составляют свыше 93% от всех моноцитов периферической крови. При этом 3% моноцитов экспрессируют на своей поверхности CD16 и очень низкий уровень CD14 – это так называемые «неклассические» моноциты (“nonclassical” monocytes, CD14⁺/CD16⁺ [20]. У людей старшего возраста или у пациентов с хроническим воспалением процент субпопуляции моноцитов с фенотипом CD14⁺⁺/CD16⁻ снижается, при этом субпопуляция моноцитов с фенотипом CD14⁺/CD16⁺ может увеличиваться до 20%.

К настоящему времени накоплено достаточно большое количество сообщений, характеризующих функции, которые осуществляют разные подтипы моноцитов. Так, некоторые исследователи показали, что «классические» моноциты с фенотипом CD14⁺⁺/CD16⁻ выполняют функцию фагоцитов, но не принимают участие в воспалительных процессах [21]. Моноциты с фенотипом CD14⁺/CD16⁺ являются антиген-презентирующими клетками и осуществляют воспалительные реакции, продуцируя провоспалительные цитокины TNFα [13, 24] и IL-1β [22]. При этом в ряде работ было показано, что избыток TNFα в крови является пусковым фактором для развития системного воспаления [26, 30].

В недавно проведенных модельных экспериментах на мышах, направленных на изучение механизмов участия моноцитов в развитии системного воспаления, продемонстрировано взаимодействие провоспалительных моноцитов с другими клетками крови, в частности с нейтрофилами. А именно выявлено снижение уровня циркулирующих провоспалительных моноцитов и цитокинов у мышей, дефицитных по лейкоцитарной эластазе (ЛЭ) [28].

В 90-е годы прошлого века появилась теория развития шизофрении, в основе которой лежит взаимодействие макрофагов и Т-лимфоцитов

[25]. В настоящее время существует достаточно большое количество исследований, свидетельствующих о вовлеченности иммунной системы в генез эндогенных психозов. В частности, в исследованиях, направленных на изучение состояния иммунного статуса у больных шизофренией и больных с риском развития эндогенных психозов, выполненных в ФГБНУ НЦПЗ, выявлено повышение по сравнению с контролем уровня продуцируемого моноцитами провоспалительного цитокина IL-1 β [6, 7], а также обнаружено значительное повышение активности показателей иммунного воспаления: ЛЭ – протеолитического фермента нейтрофилов, выделяющегося из клетки при развитии воспаления и функциональной активности α 1-протеиназного ингибитора (α 1-ПИ) – белка острой фазы воспаления [2, 4, 5]. Известно, что повышение энзиматической активности ЛЭ в острой стадии заболевания в большинстве случаев сопровождается повышением функциональной активности α 1-ПИ, который, связываясь с ЛЭ, снижает ее уровень в крови, что способствует ограничению и обратному развитию воспалительного процесса [5].

Данные, касающиеся участия моноцитов в патогенезе психопатологических расстройств, представлены сообщениями об активации микроглии мозга, которая является аналогом моноцит/макрофагальной системы в мозге, а также о повышении количества циркулирующих моноцитов у пациентов с биполярными расстройствами, большими депрессивными расстройствами и шизофренией [8, 14]. Эти данные были подтверждены авторами в соответствующих модельных экспериментах на животных, в которых также была выявлена активация микроглии и циркулирующих моноцитов и показано влияние активированной микроглии на развитие и функции нейронов в областях мозга, связанных с развитием депрессивных и шизофреноподобных состояний [8, 14]. В другом исследовании показано, что активирование микроглии и макрофагов головного мозга может оказывать пагубное воздействие на патологию головного мозга в процессе стимулирования воспалительных процессов при неврологических заболеваниях [16]. Исследований, посвященных изучению уровня провоспалительных моноцитов с помощью их фенотипирования по специфическим антигенам CD14 и CD16 и патогенетических механизмов взаимодействия субпопуляции провоспалительных моноцитов с другими клетками иммунной системы у больных шизофренией на ранней стадии психопатологического процесса, в доступной нам литературе не найдено.

Целью настоящего исследования было изучение количества провоспалительных моноци-

тов по уровню экспрессии рецепторов CD14⁺/CD16⁺, а также активности ЛЭ и α 1-ПИ и определение механизмов их взаимодействия в патогенезе иммуновоспаления, в частности выявление возможной связи моноцитов CD14⁺CD16⁺ с активностью ЛЭ и α 1-ПИ у больных юношескими депрессиями на ранних этапах заболевания.

Материалы и методы

Обследовали 27 больных мужского пола юношеского возраста (от 17 до 23 лет; в среднем 19,8 \pm 0,4 лет), впервые госпитализированных в клиническое отделение ФГБНУ «Научный центр психического здоровья». Критериями включения в исследование были: депрессивное расстройство, юношеский возраст, длительность заболевания не более двух лет, отсутствие ранее перенесенных психотических приступов. Критерии невключения: наличие сопутствующей психической (органическое психическое расстройство, алкоголизм, наркомания, умственная отсталость) и клинически значимой соматической или неврологической патологии. Согласно критериям МКБ-10 у всех больных в структуре психопатологических расстройств выявлялась депрессия с синдромом аттенуированных психотических симптомов (Attenuated Psychotic Syndrome) в виде повторяющихся ослабленных, подпороговых или коротких, ограниченных во времени, интермиттирующих психотических симптомов (DSM-V, глава III). Контрольную группу составили 12 психически и соматически здоровых мужчин соответствующего возраста.

Проведение данной работы соответствовало Хельсинкской декларации 1964 г., принятой на 18-й ассамблее Всемирной ассоциации врачей (Хельсинки, Финляндия, июнь) с поправками, принятыми в 1975 г. на 29-й ассамблее Всемирной ассоциации врачей (Токио, Япония, октябрь), и этическим стандартам Локального Этического комитета ФГБНУ «Научный центр психического здоровья». Все обследованные дали письменное информированное согласие на взятие крови и участие в исследовании.

Моноциты в составе мононуклеарных клеток (МНК) выделяли из периферической венозной крови больных и здоровых центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077$, ПанЭко) по стандартной методике. Полученную взвесь МНК разводили в среде 1640 с глутаматом (ПанЭко) до концентрации 5 млн/мл, наслаивали в чашки Петри диаметром 60 мкм (Nuncclon, Delta, Дания) и инкубировали в CO₂ инкубаторе при 37 °C в течение 1 часа. Затем сливали надосадочную жидкость, а прикрепившиеся клетки (моноциты) открепляли со дна чашки Петри с помощью охлажденного раствора

Версена (ПанЭко) в течение 20 мин. Полученные клетки отмывали средой 1640 с добавлением 10% FCS (Seriva, США). Моноциты разводили до концентрации 1 млн/мл в среде 1640 и использовали для проведения фенотипирования методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США): CD16-FITC – антитела к антигену дифференцировки 16, меченные fluorescein isothiocyanate и CD14-PE – антитела к антигену дифференцировки 14, меченные phycoerythrin. Цитофлуориметрический анализ выполняли на проточном лазерном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, США). Использовались единые настройки прибора для всех проб; в каждом из образцов анализировали не менее 3000 моноцитов. Для исключения дебриса порог устанавливали по FS и CD45PC5. Популяцию моноцитов выделяли по CD14 в комбинации с боковым светорассеянием (SSC) [10, 19].

По уровню экспрессии рецепторов CD14 и CD16 моноциты распределяли на две субпопуляции CD14⁺⁺/CD16⁻ («классические» моноциты) и CD14⁺/CD16⁺ («неклассические» провоспалительные моноциты). Количество моноцитов в каждой из субпопуляций выражали в процентах по отношению к общему количеству моноцитов, которое принимали за 100%.

Энзиматическую активность ЛЭ определяли ферментативным спектрофотометрическим методом (спектрофотометр Ultrospec 5300 (Amersham)) с использованием специфического хромогенного субстрата N-терт-бутокси-

карбонил-L-аланин-паранитрофенилового эфира (BOC-Ala-ONP) (ICN Biomedical Inc.) и оценивали в нмоль/мин/мл (чувствительность метода 40 нмоль/мин/мл) [1]. Измерение проводили с помощью компьютерной программы SWIFT 1000 Reaction Kinetics (version 2.03, Biochrom Ltd).

Функциональную активность α 1-ПИ определяли спектрофотометрическим методом, основанным на взаимодействии этого ингибитора с трипсином при использовании в качестве субстрата N- α -бензоил-L-аргинин этиловый эфир гидрохлорид (BAEE) (ICN Biomedical Inc.), и оценивали в ингибиторных единицах/мл (ИЕ/мл) (чувствительность метода 5 ИЕ/мл) [9]. Измерение проводили с помощью компьютерной программы SWIFT 1000 Reaction Kinetics (version 2.03, Biochrom Ltd).

Статистический анализ осуществляли в пакете программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2007). Проверку нормальности распределения величин показателей проводили по W-критерию Шапиро–Уилка. Так как изучаемые выборки данных имели нормальное распределение, результаты во всех таблицах представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – стандартное отклонение. Достоверность различий между показателями независимых выборок проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты

На рисунке 1 на примере отдельно взятого здорового индивидуума (А) и больного (Б) показано

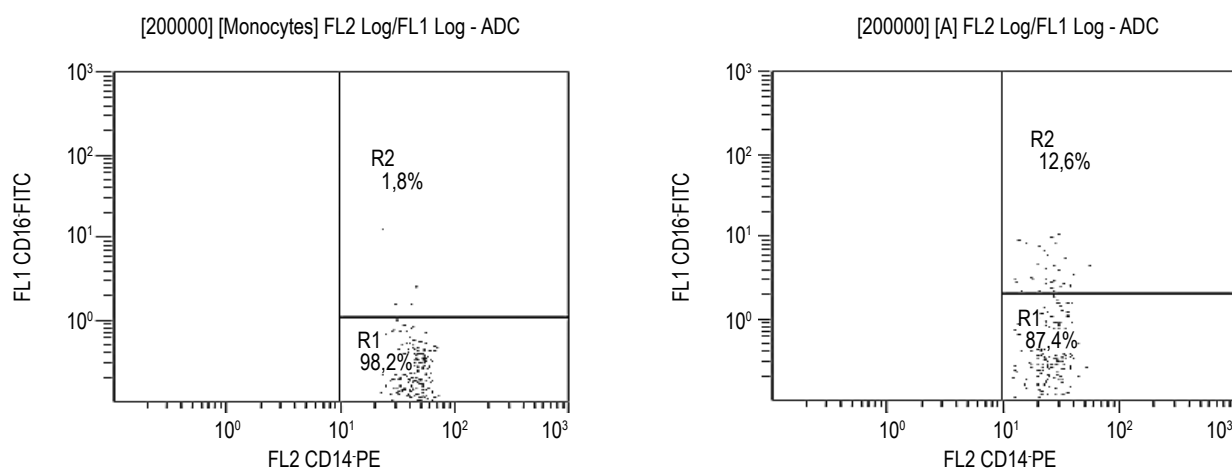


Рисунок 1. (А) Распределение моноцитов на субпопуляции по CD14/CD16 у отдельно взятого здорового индивидуума и (Б) – отдельно взятого больного

Примечание. Регион R1 – субпопуляция «классических» моноцитов; CD14/CD16; R2 – субпопуляция провоспалительных моноцитов CD14/CD16.

Figure 1. (A) Distribution of monocytes into a subpopulations according to CD14/CD16 in a single healthy individual and (B) in a single patient

Note. Region R1, a subpopulation of “classical” monocytes CD14/CD16; Region R2, a subpopulation of pro-inflammatory monocytes CD14/CD16.

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО МОНОЦИТОВ С ФЕНОТИПОМ CD14⁺⁺/CD16⁻ И CD14⁺/CD16⁺ В ОБЩЕЙ ГРУППЕ БОЛЬНЫХ И В ГРУППЕ ЗДОРОВЫХ

TABLE 1. THE NUMBER OF MONOCYTES WITH THE PHENOTYPE CD14⁺⁺/CD16⁻ AND CD14⁺/CD16⁺ IN THE GENERAL GROUP OF PATIENTS AND IN THE CONTROL GROUP

Группы обследованных Survey groups	Фенотип моноцитов Phenotype of monocytes	M±SD	Максимум Maximum	Минимум Minimum
Больные Patients (n = 27)	CD14 ⁺⁺ /CD16 ⁻ «классические» “classical”	92,2±4,1	98,3	81,7
	CD14 ⁺ /CD16 ⁺ провоспалительные pro-inflammatory	7,9±4,1*	18,3	1,7
Здоровые Control (n = 12)	CD14 ⁺⁺ /CD16 ⁻ «классические» “classical”	95,2±1,6	97,4	92,6
	CD14 ⁺ /CD16 ⁺ провоспалительные pro-inflammatory	4,7±1,5	8,0	3,0

Примечание. * – $p < 0,05$ – достоверная разница значений CD14⁺/CD16⁺ в сравнении с группой контроля; здесь и во всех последующих таблицах и на рисунках уровень субпопуляций моноцитов представлен в процентах от общего количества моноцитов.

Note. *, $p < 0.05$, significant difference in CD14⁺/CD16⁺ values compared to the control group; here and in all other tables and pictures, the level of subpopulations of monocytes is represented as a percentage of the total number of monocytes.

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ CD14⁺/CD16⁺ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ВЫСОКИМ (ПОДГРУППА 1) И НОРМАЛЬНЫМ (ПОДГРУППА 2) ЗНАЧЕНИЯМИ ПОКАЗАТЕЛЯ

TABLE 2. CD14⁺/CD16⁺ MONOCYTE LEVEL IN PATIENTS WITH A HIGH (SUBGROUP 1) AND NORMAL (SUBGROUP 2) INDICATOR VALUES

Подгруппы больных Subgroups of patients	M±SD	Максимум Maximum	Минимум Minimum
Подгруппа 1 Subgroup 1 (n = 13)	11,1±2,8*	18,3	8,1
Подгруппа 2 Subgroup 2 (n = 14)	4,6±1,8	7,3	1,7

Примечание. * – $p < 0,001$ – достоверная разница значений CD14⁺/CD16⁺ в сравнении с группой контроля.

Note. *, $p < 0.001$, significant difference in CD14⁺/CD16⁺ values compared to the control group.

распределение моноцитов по экспрессии рецепторов CD14/CD16 на «классические» и провоспалительные.

В таблице 1 представлены результаты определения количества «классических» CD14⁺⁺/CD16⁻ и провоспалительных CD14⁺/CD16⁺ моноцитов в общей группе больных и здоровых индивидумов. Из таблицы 1 видно, что уровень CD14⁺/CD16⁺ моноцитов у больных был достоверно выше, чем в контроле ($p < 0,05$).

На рисунке 2 представлено распределение здоровых и больных в общей группе по уровню провоспалительных моноцитов CD14⁺/CD16⁺. Можно видеть, что все значения показателя у здоровых находятся ниже его среднего значения у больных, тогда как больные распределились неравномерно в диапазоне от минимального уровня CD14⁺/CD16⁺ моноцитов, равного 1,7%, до максимального – 18%. Поэтому для получения выборок больных с более равномерным распределением

значений изучаемого показателя был предпринят способ дихотомического распределения больных в общей группе по двум подгруппам. А именно в подгруппу 1 вошли больные с высоким уровнем CD14⁺/CD16⁺ (выше значения M+2SD) по отношению к его среднему значению у здоровых; в подгруппу 2 – больные с уровнем, соответствующим значению показателя в контрольной группе. В результате такого подхода больные распределились практически поровну в обозначенные подгруппы со статистически выраженным различием между ними ($p < 0,001$).

Оценка результатов, полученных в двух подгруппах больных, представлена в таблице 2, из которой видно, что в подгруппе 1 с высоким уровнем CD14⁺/CD16⁺ его значение было более чем в два раза выше по сравнению с его уровнем в контроле ($p < 0,001$).

Результаты определения активности ЛЭ и α 1-ПИ в двух сформированных по уровню CD14⁺/CD16⁺ подгруппах больных представлены в таблице 3. Можно видеть, что в первой подгруппе больных с высокой экспрессией на моноцитах рецепторов CD14⁺/CD16⁺ выявлялись достоверно более высокие уровни активности ЛЭ и α 1-ПИ по сравнению с их значениями в контроле ($p < 0,001$). В подгруппе 2 выявлялось также более высокое значение ЛЭ по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Следует добавить, что в подгруппе 1 с высоким уровнем провоспалительных моноцитов CD14⁺/CD16⁺ значение ЛЭ было достоверно

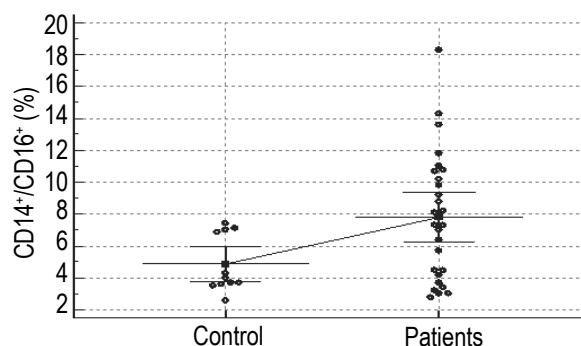


Рисунок 2. Распределение здоровых и больных в общей группе по уровню CD14⁺/CD16⁺ моноцитов

Примечание. Здесь и на всех последующих рисунках: ° – обозначение значения показателя у отдельно взятого здорового индивидуума и больного.

Figure 2. Distribution of healthy individual and patients in the general group according to the level of CD14⁺/CD16⁺ monocytes
Note. Here and in all other pictures: °, designation of the indicator value for a single healthy individual and patient.

более высоким по сравнению с его величиной у больных в подгруппе 2 с нормальным уровнем CD14⁺/CD16⁺ ($p < 0,05$).

На рисунках 3 и 4 представлены результаты распределения больных по уровню активности, соответственно, ЛЭ и α 1-ПИ в подгруппах с высоким (подгруппа 1) и нормальным (подгруппа 2) уровнем моноцитов с фенотипом CD14⁺/CD16⁺. Как видно из рисунка 3, значения активности ЛЭ у всех больных в подгруппе 1 (EI_1) находи-

ТАБЛИЦА 3. ЗНАЧЕНИЯ ЛЭ И α 1-ПИ В ПОДГРУППАХ БОЛЬНЫХ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ CD14⁺/CD16⁺ МОНОЦИТОВ И В ГРУППЕ ЗДОРОВЫХ

TABLE 3. THE VALUES OF LEUKOCYTE ELASTASE AND α 1-PI IN SUBGROUPS OF PATIENTS WITH DIFFERENT LEVEL OF CD14⁺/CD16⁺ MONOCYTES AND IN THE GROUP OF CONTROL

Группы обследованных Survey groups	Значения показателей Indicator values (M \pm SD)	
	ЛЭ (нмоль/мин/мл) Leukocyte elastase (nmol/min/ml)	α 1-ПИ (ИЕ/мл) α 1-PI (IU/ml)
Больные (подгруппа 1) Patients (subgroup 1) (n = 11)	253,4 \pm 30,2**	43,6 \pm 11,5#
Больные (подгруппа 2) Patients (subgroup 2) (n = 14)	230,0 \pm 26,1#	38,9 \pm 12,7
Здоровые Control (n = 12)	178,2 \pm 25,0	30,2 \pm 3,3

Примечание. * – $p < 0,05$ – достоверная разница значений ЛЭ между 1 и 2 подгруппами больных;
– $p < 0,001$ – достоверная разница значений ЛЭ и α 1-ПИ по сравнению с контролем.

Note. *, $p < 0.05$, significant difference in the leukocyte elastase values between subgroup 1 and subgroup 2; #, $p < 0.001$, a significant difference in leukocyte elastase and α 1-PI values in compared to the control group.

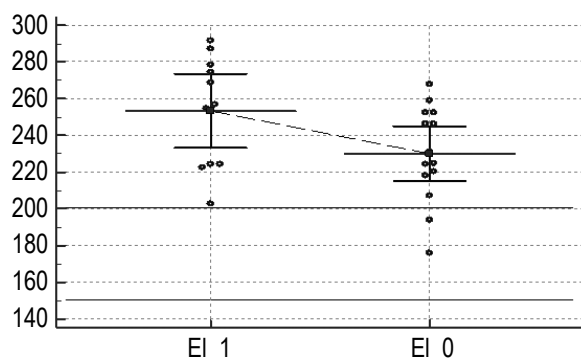


Рисунок 3. Распределение больных по активности ЛЭ в подгруппах с разным уровнем CD14⁺/CD16⁺ моноцитов
Примечание. Распределение больных по уровню ЛЭ: EI_1 – в подгруппе 1; EI_0 – в подгруппе 2; горизонтальными линиями обозначены верхняя и нижняя границы активности ЛЭ в контрольной группе.

Figure 3. Distribution of patients according to the activity of le in subgroup with different level of CD14⁺/CD16⁺ monocytes
Note. Distribution of patients according to leukocyte elastase level: EI_1, in the subgroup 1; EI_0, in a subgroup 2; the horizontal lines indicate upper and lower limits of leukocyte elastase activity in the control group.

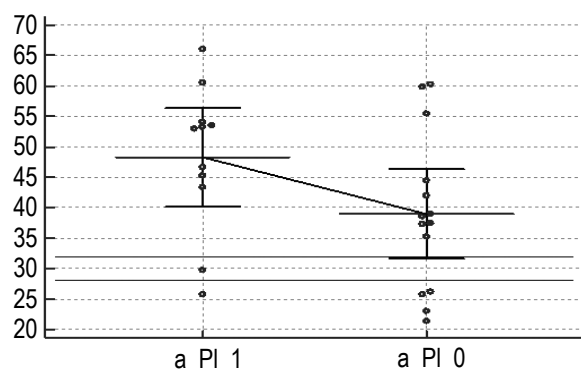


Рисунок 4. Распределение больных по активности α1-ПИ в подгруппах с разным уровнем CD14⁺/CD16⁺ моноцитов

Примечание. Распределение больных по уровню α1-ПИ в подгруппе 1 (a_PI_1) и в подгруппе 2 (PI_0); горизонтальными линиями обозначены верхняя и нижняя границы активности α1-ПИ в контрольной группе.

Figure 3. Distribution of patients according to the activity of α1-PI in subgroups with different level of CD14⁺/CD16⁺ monocytes
Note. Distribution of patients according to α1-PI level in the subgroup 1 (a_PI_1) and in the subgroup 2 (a_PI_0); the horizontal lines indicate upper and lower limits of α1-PI level activity in the control group.

лись выше верхней границы значения показателя в контроле, равного 203 нмоль/мин/мл.

Как видно из рисунка 4, распределение больных по уровню активности α1-ПИ в 2-х подгруппах больных: a_PI_1 (подгруппа 1) и a_PI_0 (подгруппа 2) существенно не различалось между собой. Однако в подгруппе 1 пропорция больных

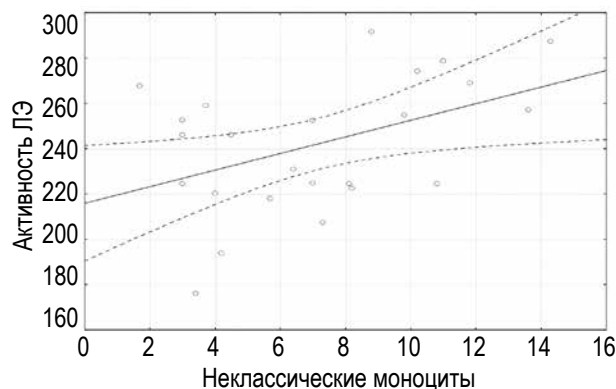


Рисунок 5. Корреляция по Pearson's между активностью ЛЭ и уровнем провоспалительных CD14⁺/CD16⁺ моноцитов в общей группе больных

Примечание. Коэффициент корреляции Пирсона – $r = 0,45$; 95% доверительный интервал для r – от 0,056 до 0,72; уровень достоверности – $p = 0,028$.

Figure 5. Pearson's correlation between leukocyte elastase activity and the level of pro-inflammatory monocytes CD14⁺/CD16⁺ in the general group of patients

Note. Pearson's correlation coefficient is $r = 0.45$; 95% confidence interval for r , from 0.056 to 0.72; confidence level, $p = 0.028$.

со значением α1-ПИ, превышающем значение верхней границы нормы для этого показателя, равного 33,5 ИЕ/мл, была высокой и составляла 82%.

Для подтверждения обнаруженных зависимостей между изучаемыми показателями провели корреляционный анализ, который позволил выявить в общей группе больных положительную корреляционную связь между уровнем экспрессии провоспалительных CD14⁺/CD16⁺ моноцитов и активностью ЛЭ ($p < 0,05$). Полученная корреляционная кривая представлена на рисунке 5.

Обсуждение

У больных юношескими депрессиями с синдромом аттенуированных психотических симптомов впервые выявлено значительное повышение количества провоспалительных моноцитов с фенотипом CD14⁺/CD16⁺ по сравнению с их уровнем у здоровых. С нашей точки зрения, представленные результаты могут свидетельствовать о наличии скрытого иммунного воспаления у больных юношескими депрессиями, что согласуется с результатами, полученными в многочисленных исследованиях других системных заболеваний, в которых сообщается о значительном повышении у больных уровня провоспалительных моноцитов с фенотипом CD14⁺/CD16⁺ [13, 22, 24, 29, 26]. Следует отметить, что при моделировании скрытого иммунного воспаления в экспериментальных исследованиях, направленных на изучение механизмов изменения уровня

CD14⁺/CD16⁺ моноцитов, выявлено снижение уровня циркулирующих провоспалительных моноцитов у мышей, дефицитных по ЛЭ [28]. В связи с этим представлялось интересным изучить возможную связь между уровнем провоспалительных моноцитов CD14⁺/CD16⁺ и показателями иммунного воспаления: ЛЭ и ее ингибитором α 1-ПИ [2, 4, 5] у обследованных больных. Так как изученная группа больных была гетерогенной по количеству провоспалительных моноцитов, перед проведением анализа все больные были распределены дихотомически в две подгруппы по отношению к среднему уровню CD14⁺/CD16⁺ моноцитов в контроле. Это позволило выявить подгруппу больных, в которой уровень провоспалительных моноцитов CD14⁺/CD16⁺ был существенно выше (более чем в два раза) его значения в контроле. Во второй подгруппе больных количество моноцитов CD14⁺/CD16⁺ не отличалось от его контрольного значения. В результате проведенного анализа в подгруппе больных с высоким уровнем провоспалительных моноцитов CD14⁺/CD16⁺ был отмечен достоверно более высокий уровень активности показателей иммунного воспаления: ЛЭ и α 1-ПИ по сравнению с их значениями у здоровых. В подгруппе с нормальным уровнем моноцитов с фенотипом CD14⁺/CD16⁺ подобный эффект обнаружен не был. Следует добавить, что отмеченная статистически значимая связь между уровнем провоспалительных моноцитов CD14⁺/CD16⁺ и активностью ЛЭ была подтверждена выявлением в общей группе больных положительной корреляционной связи между этими показателями. Полученные результаты свидетельствуют о возможном взаимодействии моноцитов и нейтрофилов в развитии психопатологических расстройств у больных юношескими депрессиями,

а также согласуются с данными исследований, в которых показано, что повышение активности ЛЭ и α 1-ПИ у больных юношескими депрессиями связано с развитием иммунного воспаления при этой патологии [2, 4, 5].

Заключение

Таким образом, выявленное у обследованных нами больных с юношескими депрессиями с синдромом аттенуированных психотических симптомов существенное повышение количества провоспалительных моноцитов CD14⁺/CD16⁺ по сравнению с его значением в контроле свидетельствует о развитии скрытого системного иммунного воспаления в генезе психопатологических расстройств у этих больных уже на ранней стадии их проявления. Обнаруженная нами положительная связь между количеством моноцитов CD14⁺/CD16⁺ и уровнем лейкоцитарной эластазы подтверждает существование возможной взаимосвязи между моноцитами и нейтрофилами и, с нашей точки зрения, определяет один из механизмов развития нейроиммуновоспаления у больных с этой патологией.

Благодарности

Авторы выражают признательность и благодарность Марине Петровне Рыковой, доктору медицинских наук, ведущему научному сотруднику, и Антроповой Евгении Николаевне, кандидату биологических наук, ведущему научному сотруднику ГНЦ РФ «Института медико-биологических проблем» за помощь в разработке метода фенотипирования моноцитов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Доценко В.Л., Нешкова Е.А., Яровая Г.А. Выявление лейкоцитарной эластазы человека из комплекса с плазменным α 1-протеиназным ингибитором по ее энзиматической активности с синтетическим субстратом // Вопросы медицинской химии, 1994. Т. 40, № 3. С. 20-25. [Dotsenko V.L., Neshkova E.A., Yarovaya G.A. Detection of human leukocyte elastase from the complex with a plasma α 1-proteinase inhibitor by its enzymatic activity with a synthetic substrate. *Voprosy meditsinskoy khimii = Problems of Medical Chemistry*, 1994, Vol. 40, no. 3, pp. 20-25. (In Russ.)]
2. Каледа В.Г., Ключник Т.П., Сарманова З.В., Отман И.Н., Дупин А.М. Корреляция клинических и иммунологических показателей при первом приступе юношеского эндогенного психоза // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2009. Т. 109, № 1. С. 16-19. [Kaleda V.G., Klyushnik T.P., Sarmanova Z.V., Otman I.N., Dupin A.M. Correlation of clinical and immunological parameters at the first attack of juvenile endogenous psychosis. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2009, Vol. 109, no. 1, pp. 16-19. (In Russ.)]
3. Кжышковска Ю.Г., Грачев А.Н. Маркеры моноцитов и макрофагов для диагностики иммунопатологий // Патогенез, 2012. Т. 10, № 1. С. 14-19. [Kzhyshkowska Yu.G., Gratchev A.N. [Monocyte and macrophage markers for diagnostics of immunopathologies. *Patogenez = Pathogenesis*, 2012. Vol. 10, no. 1. pp. 14-19. (In Russ.)]
4. Ключник Т.П., Зозуля С.А., Андросова Л.В., Сарманова З.В., Отман И.Н., Дупин А.М., Абрамова Л.И., Столяров С.А., Шипилова Е.С., Борисова О.А. Иммунологический мониторинг эндогенных при-

ступообразных психозов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2014. Т. 114, № 2-1. С. 37-41. [Klyushnik T.P., Zozulya S.A., Androsova L.V., Sarmanova Z.V., Otman I.N., Dupin A.M., Abramova L.I., Stolyarov S.A., Shipilova E.S., Borisova O.A. Immunological monitoring of endogenous attack-like psychoses. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova* = *S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2014, Vol. 114, no. 2-1, pp. 37-41. (In Russ.)]

5. Ключник Т.П., Омельченко М.А., Сарманова З.В., Зозуля С.А., Отман И.Н., Дупин А.М., Каледа В.Г. Возможность использования иммунологических показателей для оценки риска манифестации эндогенных психозов у больных с непсихотическими расстройствами юношеского возраста // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2014. Т. 114, № 10-1. С. 97-101. [Klyushnik T.P., Omelchenko M.A., Sarmanova Z.V., Zozulya S.A., Otman I.N., Dupin A.M., Kaleda V.G. Possibilities of the use of immunological indicators for the assessment of the risk of manifestation of endogenous psychoses in patients with nonpsychotic disorders of the juvenile age. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova* = *S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2014, Vol. 114, no. 10-1, pp. 97-101. (In Russ.)]

6. Коляскина Г.И., Андросова Л.В., Секирина Т.П., Кушнер С.Г., Каледа В.Г. Система интерлейкинов у больных шизофренией // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2004. Т. 104, № 2. С. 43-47. [Kolyaskina G.I., Androsova L.V., Sekirina T.P., Kushner S.G., Kaleda V.G. The system of interleukins in patients with schizophrenia. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova* = *S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2004, Vol. 104, no. 2, pp. 43-47. (In Russ.)]

7. Коляскина Г.И., Секирина Т.П., Васильева Е.Ф., Кушнер С.Г., Петракова Л.Н., Бархатова А.Н., Омельченко М.А. Особенности иммунной системы и риск развития эндогенного психоза в юношеском возрасте // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2014. Т. 114, № 3-1. С. 46-49. [Kolyaskina G.I., Sekirina T.P., Vasilyeva E.F., Kushner S.G., Petrakova L.N., Barkhatova A.S., Omelchenko M.A. Features of the immune system and the risk of endogenous psychosis at juvenile age. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova* = *S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2014, Vol. 114, no. 3-1, pp. 46-49. (In Russ.)]

8. Костюкова А.Б., Мосолов С.Н. Нейровоспалительная гипотеза шизофрении и некоторые новые терапевтические подходы // Современная терапия психических расстройств, 2013. № 4. С. 8-17. [Kostyukova A.B., Mosolov S.N. Neuroinflammatory hypothesis of schizophrenia and new therapeutical approaches. *Sovremennaya terapiya psikhicheskikh rasstroystv* = *Modern Therapy for Mental Disorders*, 2013, no. 4, pp. 8-17. (In Russ.)]

9. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Унифицированный метод определения активности альфа1-анти-трипсина и альфа2-макроглобулина активности в сыворотке крови человека (плазмы) // Вопросы медицинской химии, 1979. Т. 25, № 4. С. 494-499. [Nartikova V.F., Paschina T.S. A unified method for determination of the alpha1-antitrypsin activity and alpha2-macroglobulin activity in human blood serum (plasma). *Voprosy meditsinskoy khimii* = *Problems of Medical Chemistry*, 1979, Vol. 25, no. 4, pp. 494-499. (In Russ.)]

10. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (Проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khaidukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolyan Areg A. Standardized technology "Investigation of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytofluorimeters-analyzers" (Project). *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.

11. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.

12. Akiyama Y., Miller P.J., Thurman G.B., Neubauer R.H., Oliver C., Favilla T., Beman J.A., Oldham R.K., Stevenson H.C. Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *J. Clin. Invest.*, 1983, Vol. 72, pp. 1093-1105.

13. Belge K.U., Dayyani F., Horelt A., Siedlar M., Frankenberger M., Frankenberger B., Espevik T., Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, pp. 3536-3542.

14. Beumer W., Gibney S.M., Drexhage R.C., Pont-Lezica L., Doorduyn J., Klein H.C., Steiner J., Connor T.J., Harkin A., Versnel M.A., Drexhage H.A. The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, Vol. 92, no. 5, pp. 959-975.

15. Capobianco A., Rovere-Querini P. Endometriosis, a disease of the macrophage. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 9.

16. Eder C. Ion channels in monocytes and microglia/brain macrophages: promising therapeutic targets for neurological diseases. *J. Neuroimmunol.*, 2010, Vol. 224, no. 1-2, pp. 51-55.

17. Hansson G.K., Edfeldt K. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, Vol. 25, no. 6, pp. 1085-1087.

18. Lopez-Castejon G., Denes A., Brough D. NLRP3-inflammasome activating DAMPs stimulate an inflammatory response in glia in the absence of priming which contributes to rain inflammation after injury. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, p. 288.

19. Luider J.I., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *Lab. Hematol.*, 2004, Vol. 10, pp. 102-108.

20. Merino A., Buendia P., Martin-Malo A., Aljama P., Ramirez R., Carracedo J. Senescent CD14⁺CD16⁺ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 3, pp. 1809-1815.
21. Randhawa A.K., Hawn T.R. Toll-like receptors: their roles in bacterial recognition and respiratory infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2008, Vol. 6, no. 4, pp. 479-495.
22. Rodríguez N., Morer A., González-Navarro E.A., Serra-Pages C., Boloc D., Torres T., García-Cerro S., Mas S., Gassó P., Lázaro L. Inflammatory dysregulation of monocytes in pediatric patients with obsessive-compulsive disorder. *J. Neuroinflammation*, 2017, Vol. 14, no. 1, p. 261.
23. Rubartelli A., Lotze M.T., Latz E., Manfredi A. Mechanisms of sterile inflammation. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 398.
24. Schlitt A., Heine G.H., Blankenberg S., Espinola-Klein C., Doppeide J.F., Bickel C., Lackner K.J., Iz M., Meyer J., Darius H., Rupprecht H.J. CD14⁺CD16⁺ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF- α levels. *Thromb. Haemost.*, 2004, Vol. 92, no. 2, pp. 419-424.
25. Smith R.S., Maes M. The macrophage-T-lymphocyte theory of schizophrenia: additional evidence. *Med. Hypotheses*, 1995, Vol. 45, pp. 135-141.
26. Thomas G., Tacke R., Hedrick C.C., Hanna R.N. Nonclassical patrolling monocyte function in vasculature. *Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 35, no. 6, pp. 1306-1315.
27. Tian X., Sun H., Casbon A.J., Lim E., Francis K.P., Hellman J., Prakash A. Inflammasome mediates dormant neutrophil recruitment following sterile lung injury and protects against subsequent bacterial pneumonia in mice. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 31, no. 8, p. 1337.
28. Wen G., An W., Chen J., Maguire E.M., Chen Q., Yang F., Pearce S.W.A., Kyriakides M., Zhang L., Ye S., Nourshargh S., Xiao Q. Genetic and pharmacologic inhibition of the neutrophil elastase inhibits experimental atherosclerosis. *J. Am Heart Assoc.*, 2018, Vol. 7, no. 4, pii: e008187. doi: 10.1161/JAHA.117.008187.
29. Zhu M., Lei L., Zhu Z., Li Q., Guo D., Xu J., Chen J., Sha H., Zhang X., Yang X., Song B., Li B., Yan Y., Xiong Y. Excess TNF- α in the blood activates monocytes with the potential to directly form cholesteryl ester-laden cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 2015, Vol. 47, no. 11, pp. 899-907.
30. Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 81, no. 3, pp. 584-592.

Авторы:

Васильева Е.Ф. — к.б.н., старший научный сотрудник
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»,
Москва, Россия

Секирина Т.П. — к.б.н., ведущий научный сотрудник
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»,
Москва, Россия

Сарманова З.В. — к.м.н., научный сотрудник ФГБНУ
«Научный центр психического здоровья», Москва,
Россия

Authors:

Vasilyeva E.F., PhD (Biology), Senior Research Associate,
Mental Health Research Center, Moscow, Russia Federation

Sekirina T.P., PhD (Biology), Leading Research Associate,
Mental Health Research Center, Moscow, Russia Federation

Sarmanova Z.V., PhD (Medicine), Research Associate, Mental
Health Research Center, Moscow, Russia Federation

Зозуля С.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»,
Москва, Россия

Zozulya S.A., PhD (Biology), Leading Research Associate,
Mental Health Research Center, Moscow, Russia Federation

Омельченко М.А. — к.м.н., ведущий научный сотрудник
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»,
Москва, Россия

Omelchenko M.A., PhD (Medicine), Leading Research
Associate, Mental Health Research Center, Moscow, Russia
Federation

Клюшник Т.П. — профессор, директор ФГБНУ
«Научный центр психического здоровья» ФГБНУ
«Научный центр психического здоровья», Москва,
Россия

Klushnik T.P., Professor, Director, Mental Health Research
Center, Moscow, Russia Federation

Поступила 30.06.2018

Отправлена на доработку 19.09.2018

Принята к печати 24.09.2018

Received 30.06.2018

Revision received 19.09.2018

Accepted 24.09.2018

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ В ОПРЕДЕЛЕНИИ АКТИВНОСТИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Старшинова А.А.^{1,3}, Истомина Е.В.¹, Зинченко Ю.С.^{1,3},
Филатов М.В.^{1,2}, Ланда С.Б.², Бурдаков В.С.^{1,2,3}, Беляева Е.Н.¹,
Назаренко М.М.¹, Сапожникова Н.В.¹, Яблонский П.К.^{1,3}

¹ ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Гатчина, Ленинградская обл., Россия

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

Резюме. Диагностика туберкулезной инфекции, в том числе с применением иммунологических методов, претерпела значительные изменения. Внедрение новых диагностических тестов позволило улучшить диагностику латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ). Однако положительные результаты иммунологических тестов как у больных туберкулезом, так и у лиц с ЛТИ не позволяют прежде всего иммунологически разделить эти состояния, что требует разработки и внедрения новых диагностических подходов.

Было проведено проспективное исследование с обследованием двух групп пациентов: I группа (n = 50) – больные с верифицированным туберкулезом легких, МБТ (+); II группа (n = 15) – лица с ЛТИ и группа контроля – здоровые лица (n = 14). Комплекс обследования включал клинические, лучевые, бактериологические, иммунологические (пробу Манту с 2 ТЕ, тест Т-SPOT, QFT и пробу с Диаскинтестом) методы. У всех пациентов и здоровых лиц с помощью метода динамического светорассеяния после добавления *in vitro* антигенов специфических пептидов ESAT-6 и SFP-10 были определены иммунные комплексы.

Полученные данные наглядно демонстрируют низкую информативность клинического метода в диагностике туберкулеза легких. При наличии характерных рентгенологических изменений бактериологическая верификация диагноза туберкулеза была получена только в 46% случаев. Применение различных иммунологических тестов позволяет получить положительные результаты тестов в 84-90% случаев одновременно с получением в 100% случаев положительных тестов у лиц с ЛТИ. Определение специфических иммунных комплексов методом динамического светорассеяния позволяет в 100% случаев определять активность туберкулезной инфекции и выявлять группу высокого риска по развитию активного туберкулеза у лиц с латентной туберкулезной инфекцией.

Адрес для переписки:

Зинченко Юлия Сергеевна
ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ
191036, Россия, Санкт-Петербург, пр. Лиговский, 2-4.
Тел.: 8 (921) 373-45-18.
Факс: 8 (812) 579-25-73.
E-mail: Ulia-Zinchenko@yandex.ru

Address for correspondence:

Zinchenko Yulia S.
St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology
191036, Russian Federation, St. Petersburg,
Ligovsky ave., 2-4.
Phone: 7 (921) 373-45-18.
Fax: 7 (812) 579-25-73.
E-mail: Ulia-Zinchenko@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Старшинова, Е.В. Истомина, Ю.С. Зинченко, М.В. Филатов, С.Б. Ланда, В.С. Бурдаков, Е.Н. Беляева, М.М. Назаренко, Н.В. Сапожникова, П.К. Яблонский «Диагностическое значение специфических иммунных комплексов в определении активности туберкулезной инфекции» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 269-278.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-269-278

© Старшинова А.А. и соавт., 2019

For citation:

A.A. Starshinova, E.V. Istomina, Yu.S. Zinchenko, M.V. Filatov, S.B. Landa, V.S. Burdakov, E.N. Belyaeva, M.M. Nazarenko, N.V. Sapozhnikova, P.K. Yablonkiy "Diagnostic value of specific immune complexes in detection of active tuberculosis infection", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 269-278. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-269-278

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-269-278

Выводы: полученные в исследовании данные могут быть применены не только в диагностике активного туберкулеза при отсутствии верификации диагноза, но также позволяют выделить группу высоко риска по развитию заболевания у лиц с латентной туберкулезной инфекцией.

Ключевые слова: туберкулез, тест с аллергеном туберкулезным рекомбинантным, иммунологические тесты, латентная туберкулезная инфекция, метод динамического светорассеяния

DIAGNOSTIC VALUE OF SPECIFIC IMMUNE COMPLEXES IN DETECTION OF ACTIVE TUBERCULOSIS INFECTION

Starshinova A.A.^{a, c}, Istomina E.V.^a, Zinchenko Yu.S.^{a, c}, Filatov M.V.^{a, b}, Landa S.B.^b, Burdakov V.S.^{a, b, c}, Belyaeva E.N.^a, Nazarenko M.M.^a, Sapozhnikova N.V.^a, Yablonkiy P.K.^{a, c}

^a St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg B. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, National Research Center "Kurchatov Institute", Gatchina, Leningrad Region, Russian Federation

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

Abstract. The diagnostics of tuberculosis infection, including immunological methods, evolved significant changes over time. Introduction of new diagnostic tests allowed to improve the diagnosis of latent tuberculosis infection (LTI). However, positive results of immunological tests in both tuberculosis patients and in those with LTI do not allow to differentiate between these conditions, thus requiring development and implementation of new diagnostic approaches.

A prospective study enrolling two groups of patients was conducted as follows: group I (n = 50) included patients with verified pulmonary tuberculosis, MBT (+), whereas group II (n = 15) consisted of subjects with LTI, and control group was represented by healthy subjects (n = 14). The entire examination protocol included clinical, radiological, bacteriological, and immunological methods (Mantoux test with 2 TU, T-SPOT.TB, QFT and Diaskin test). Immune complexes were determined in all patients and healthy individuals by means of dynamic light scattering after the in vitro addition of specific antigens (ESAT-6 and SFP-10 peptides).

The data obtained have shown low informativity of clinical methods in diagnostics of pulmonary tuberculosis. In the presence of characteristic X-radiographic changes, bacteriological verification of tuberculosis was proven only in 46% of cases. Usage of various immunological tests allowed to obtain positive results in 84-90% of cases, along with 100% positivity in subjects with LTI. Detection of specific immune complexes by the method of dynamic light scattering allows to determine the activity of tuberculosis infection in 100 % of cases, and to identify the high-risk group for development of active tuberculosis among the subjects with latent tuberculosis infection.

Conclusions: the obtained data may be applied both for diagnosis of active tuberculosis in the absence of verified diagnosis, but also enable identification of a high-risk group for development of the disease in subjects with latent tuberculosis infection.

Keywords: tuberculosis, test with allergen tuberculosis recombinant, immunological tests, latent tuberculosis infection, dynamic light scattering method

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»).

Введение

Туберкулез известен с глубокой древности. Однако, несмотря на повсеместно проводимую работу по борьбе с туберкулезом и совершенствование методов его диагностики и лечения, эпидемическая ситуация по туберкулезу остается весьма напряженной [3, 8, 19].

Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2015 г. туберкулезом заболело 10,4 млн человек, в т.ч. 5,9 млн (56,0%) мужчин, 3,5 млн (34,0%) женщин и 1,0 млн (10,0%) детей. Более половины новых случаев (60,0%) заболевания приходится на шесть стран: Индию, Индонезию, Китай, Нигерию, Пакистан и Южную Африку [21]. С 2014 по 2015 г. темпы снижения заболеваемости ТБ составили во всем мире лишь 1,5%. В 2015 г. от туберкулеза умерло около 1,4 млн человек. Отмечено, что в период с 2000 по 2015 г. численность умерших от ТБ сократилась на 22,0%, однако и до настоящего

времени во всем мире туберкулезная инфекция остается одной из 10 ведущих причин смерти людей [18].

Осуществлять контроль за распространением туберкулезной инфекции без раннего выявления заболевания не представляется возможным [11, 14].

Латентная, или скрытая, туберкулезная инфекция является закономерным этапом развития инфекционного процесса в организме, который сопровождается персистенцией *M. tuberculosis* в организме и характеризуется длительным бессимптомным пребыванием возбудителя с сохранением его патогенетических свойств, способности к размножению и реверсии, о чем писали Dienes L. и Parish N.M. еще в середине и конце XX века.

В последние годы к диагностике латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ) приковано особое внимание, в том числе благодаря внедрению различных иммунологических методов определения активности туберкулезной инфекции [1, 7, 17].

Революцией в разработке новых методов иммунологической диагностики стала расшифровка генома микобактерий туберкулеза, в котором закодировано более 4000 белков. Была выделена группа белков, экспрессирующихся при размножении микобактерий, кодируемых в зоне RDI (region of difference), названных ESAT-6 и CFP-10, что позволило разработать новые высокоинформативные иммунологические тесты *in vitro* (IGRA—тесты: QuantiFERON (QFT)-TB, T-SPOT.TB тест, IP-10) и *in vivo* (с туберкулином, с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (проба с Диаскинтестом®)) [4, 10].

По мнению ряда авторов, лабораторные тесты QuantiFERON-TB Gold/ QuantiFERON-TB Gold In-Tube и ELISPOT/T-SPOT.TB должны дополнять туберкулинодиагностику, в первую очередь для идентификации ложноотрицательных результатов выявления латентной туберкулезной инфекции, активного туберкулеза и новых случаев туберкулеза у больных при проведении терапии ингибиторами TNF α , особенно в странах с умеренной и высокой распространенностью туберкулеза, а также могут служить полезными инструментами для скрининга и мониторинга латентной туберкулезной инфекции в комбинации с внутрикожной туберкулиновой пробой Манту с 2 ТЕ [4, 13, 16].

В России на основе белков, кодируемых в зоне RDI, в 2006 г. был разработан новый диагностический препарат Диаскинтест®, который представляет собой рекомбинантный белок CFP-10-ESAT-6, продуцируемый *Escherichia coli*. Основным механизмом действия теста также является формирование реакции гиперчувстви-

тельности замедленного типа. При этом белок CFP-10-ESAT-6 не обладает сенсибилизирующей активностью и не токсичен. Высокая диагностическая ценность пробы с Диаскинтестом (ДСТ) подтверждается во многих российских исследованиях [1, 7, 9].

Однако применение данных иммунологических методов не позволило проводить дифференциальную диагностику между латентной туберкулезной инфекцией и активным туберкулезом, так как тесты показывают положительный результат в обоих случаях [2, 12, 20].

Поиск новых диагностических критериев для определения активности туберкулезной инфекции является приоритетной задачей при определении группы высокого риска развития туберкулеза.

Цель исследования — повышение ранней диагностики туберкулеза с помощью определения новых иммунологических критериев активности туберкулезной инфекции.

Материалы и методы

Проспективное исследование было проведено за период с декабря 2016 года по июль 2017 года с включением 135 больных туберкулезом легких (I группа), которые проходили лечение на базе ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава РФ, 28 лиц с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТИ) (II группа) и 24 человек (здоровых лиц) — группа контроля (III группа). Исследование было одобрено независимым этическим комитетом ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России (выписка из протокола № 34.2 от 19.01.2017) и ФГБОУ ВО СПбГУ (выписка из протокола № 02-126 от 30.07.2017), все участники исследования подписали информированное согласие.

Диагноз «туберкулез легких» устанавливался при наличии клинических проявлений, характерных рентгенологических изменений; положительных результатов обследования на туберкулез (выявление в анализах мокроты *M. tuberculosis* (МБТ) и/или МТВ ДНК по данным молекулярно-генетических и бактериологических методов), гистологической верификации изменений в легких (выявление эпителиоидно-клеточных гранул с участками казеозного некроза и кислотоустойчивых бактерий).

Критериями включения являлись: возраст от 18 до 65 лет; у больных туберкулезом — наличие бактериовыделения по данным лабораторного обследования; у лиц с ЛТИ — наличие положительного результата иммунологического теста при отсутствии клинических и рентгенологических данных об активном туберкулезе.

Критериями исключения являлись: анамнестические данные о применении иммуносупрессивной терапии, лечение противотуберкулезными препаратами более одного месяца, наличие ВИЧ-инфекции, сифилиса, опухолевых заболеваний, сахарного диабета, а также выявление других гранулематозных заболеваний легких.

Критериями включения для группы здоровых лиц являлись: отсутствие острых и хронических заболеваний, отсутствие риска развития туберкулеза и отрицательные результаты иммунологических тестов.

Методы исследования

Все пациенты прошли комплекс обследования, включавший клиническую оценку заболевания, мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) органов грудной клетки, лабораторные исследования крови, стандартный комплекс обследования на туберкулез.

После комплексного обследования проводился забор крови для проведения QuantiFERON TB Gold (QFT) и ELISPOT, далее — постановка пробы Манту с 2ТЕ (ПМ/ТСТ) и пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР/Диаскинтест /DST). За 5-летний период наблюдения тесты на высвобождение интерферона- γ (ИГРА-тесты) из-за ограниченных возможностей были выполнены только у части обследованных. Оценка результатов иммунологических проб осуществлялась с учетом полученной выборки по каждому тесту.

Постановка пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (DST) аналогична пробе с туберкулином. Инъекция проводится внутривенно, считывание результата осуществляется через 72 часа путем измерения диаметра папулы в месте инъекции.

Согласно инструкции при наличии папулы любого размера результаты DST интерпретировались как положительные. Наличие гиперемии при отсутствии папулы расценивалось как сомнительная проба. В настоящем исследовании для объективной оценки наличия папулы определен cut off ≥ 5 мм.

TST (tuberculin skin test) в рамках российского законодательства осуществлялся с применением туберкулина ППД-Л с 2 туберкулиновыми единицами (Россия, АО «Фармстандарт»). Результаты TST оценивались следующим образом: положительный — папула 5 и более мм, сомнительный — папула до 4 мм включительно или гиперемия любого размера. Отсутствие папулы и гиперемии при обоих тестах являлось отрицательным результатом.

Тест T-SPOT®.TB был выполнен в соответствии с инструкцией изготовителя (Оксфорд Иммунотек, Великобритания). Очищенные лим-

фоциты периферической крови инкубировали с антигенами теста с использованием культуральной среды GIBCO AIM-V™ (Invitrogen, Пейсли, Великобритания). Количество пятен в каждой лунке (представляющих клетки, секретирующие IFN γ) оценивалось визуально при помощи увеличительного стекла двумя независимыми наблюдателями, которые не знали результатов QFT. Результаты были интерпретированы в соответствии с критериями, определенными изготовителем для использования теста за пределами США. Положительный результат был определен как ≥ 6 пятен либо в лунке ESAT-6, либо в лунке CFP-10 после вычитания количества пятен, обнаруженных в отрицательной контрольной лунке, где отрицательный контроль имеет 0-5 пятен. Если отрицательная контрольная часть имела ≥ 6 пятен, панель ESAT-6 или CFP-10 для положительного результата должна была содержать по крайней мере вдвое больше пятен, обнаруженных на отрицательной панели. Результат был неопределенным, если в отрицательной контрольной лунке было более 10 пятен или менее 20 в контроле митогена (с < 6 в лунках ESAT-6 и CFP-10).

Тест QuantiFERON-TB Gold (QFT) также был выполнен в соответствии с инструкцией изготовителя (Селлестис Лимитед, Австралия). Венозную кровь собирали у каждого пациента из трех специальных эвакуированных и гепаринизированных пробирок крови, откалиброванных для натягивания 1 мл крови. Набор включал трубку, покрытую TB-Antigen, трубку NIL (отрицательный контроль) и митогенную (фитогемагглютининовую) трубку в качестве положительного контроля. Как рекомендовано, значение отсечки для положительного теста было IFN $\gamma > 0,35$ МЕ/мл, для TB-Antigen — минус NIL. Отрицательный результат был зарегистрирован, если этот ответ составлял $< 0,35$ МЕ/мл, а контроль митогена — минус NIL $\geq 0,5$ МЕ/мл. Если уровень IFN γ как для TB-Antigen-NIL, так и для mitogen-NIL был меньше, чем их соответствующие отсечки, результат интерпретировался как неопределенный. Максимальный уровень IFN γ , точно определяемый с помощью ИФА с QFT, составляет 10 МЕ/мл, и, таким образом, превышающие значения сообщаются как 10 МЕ/мл.

Результаты ИГРА-тестов пограничной линии были классифицированы как отрицательные из-за неопределенной вероятности заражения ТБ.

Плазма всех включенных пациентов была исследована в ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» с определением образующихся *in vitro* иммунных комплексов (ИК) методом динамического светорассеяния (ДСР) по предложенной методике (заявка

на патент № 2015149694; дата публикации 24 мая 2017 г., Филатов М.В., Ланда С.Б.). Измерения проводились на лазерном корреляционном спектрометре (сертификат RU. С. 39.003. А № 5381) ЛКС-03 (ИНТОКС-МЕД, Россия) [5, 6].

Метод ДСР позволяет определить входящие в состав ИК компоненты без выделения комплексов из плазмы и определить крупные частицы, которыми являются ИК. Кроме того, метод позволяет работать с нативными образцами в физиологических условиях и имеет узкий круг необходимых преаналитических процедур: разбавление, центрифугирование, фильтрование [15].

Полученная от пациентов плазма крови разбавляется в 4 раза фосфатным буфером, содержащим 10 мМ концентрацию этилендиамин-тетрауксусной кислоты, подвергается центрифугированию в течение 15 минут при 15 тысячах оборотов в минуту и фильтрации через фильтр с размерами пор 100 нм для удаления всех частиц и белковых агрегатов, превышающих данный размер. Измерение ДСР полученного препарата должно показывать отсутствие каких-либо образований, превышающих по размеру 100 нм.

В полученные образцы плазмы объемом 400 мкл добавляют 10 мкл приготовленного антигена. В качестве специфического туберкулезного антигена применялись ESAT-6/SFP-10 (Генериум, Россия).

Для статистического анализа данных были использованы методы, доступные в программе Stata 14. При обработке результатов также методы описательной статистики, характеризующей субъекты, включенные в исследование. Для количественных параметров оценивались арифметическое среднее (Mean); стандартное отклонение (SD); 95% доверительный интервал (ДИ) для среднего. Для качественных переменных анализировалось абсолютное количество в формате n/N, а также доля (%). Для сравнения чувствительности различных тестов в каждой из групп был использован Q-критерий Кохрена. Для всех тестов было проведено попарное сравнение с результатами кожной пробы с Диаскинтестом при

величине cut-off ≥ 5 мм. Для целей проведения анализа отрицательные, сомнительные и неинтерпретируемые результаты были объединены в одну группу. Для каждой пары тестов был рассчитан коэффициент согласованности каппа, который учитывает возможность случайного совпадения результатов. Сравнение частоты наличия признака между подгруппами пациентов проводилось с помощью точного теста Фишера. Различия в сравниваемых группах считали достоверными при уровне статистических различий $p < 0,05$.

Также оценивались показатели диагностической значимости методов: диагностическая чувствительность (ДЧ); диагностическая специфичность (ДС); диагностическая эффективность (ДЭ). Расчет показателя отношения шансов (odds ratio, OR) производился по формуле: $(a/c)/(b/d) = (a \cdot d)/(b \cdot c)$ (a — истинно положительный и b — ложноположительный результат; c — ложноотрицательный и d — истинно отрицательный результат). Значимой считалась величина относительного риска более 1,0.

Результаты

Положительные результаты обследования по данным клинических, рентгенологических и бактериологических методов у больных туберкулезом (I группа) представлены в таблице 1.

Представленные в таблице 1 данные демонстрируют возможность получения положительного результата по данным методов, на основании которых осуществлялась диагностика туберкулеза. У всех больных определялось только наличие рентгенологических изменений, при этом клиническая симптоматика могла определяться в 70% случаев, а бактериологическое подтверждение диагноза было получено только в 45,2% случаев.

Применение иммунологических методов может улучшить диагностику туберкулеза в условиях отсутствия бактериовыделения. С целью анализа результатов тестов группа больных туберкулезом легких была разделена на две подгруппы Ia и Ib,

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ КОМПЛЕКСНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

TABLE 1. RESULTS OF EXAMINATION PATIENTS WITH TUBERCULOSIS WITH USING OF VARIOUS METHODS

Группа наблюдения Groups	Клиническая симптоматика Clinical symptoms (%/n)	Бактериологическое исследование мокроты Bacteriologic methods (%/n)	Рентгенологические изменения X-ray (%/n)
Больные туберкулезом TB patients n = 135	69,6 (94)	45,2 (61)	100 (135)
95% ДИ	62,4-72,6	36,6-51,6	100,0

с бактериовыделением и без бактериовыделения соответственно. Положительные результаты иммунологических тестов в подгруппах представлены в таблице 2.

Как представлено в таблице 2, получение положительных результатов с применением иммунологических тестов у больных туберкулезом варьируется от 84,9 до 90,6% в Ia и от 69,4

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗЛИЧНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

TABLE 2. RESULTS OF DIFFERENT DIAGNOSTIC TESTS IN TB PATIENTS

Группа Group	Результат теста Results of tests	T-SPOT	QTF	DST	Проба Манту Mantoux test	p (Q-крит.) (Q test)
ТБ/МТБ (+) TB MBT (+) Ia	Положительный Positive	48/53 (90,6%)	40/46 (87,0%)	47/53 (88,7%)	45/53 (84,9%)	0,903
	95% ДИ 95% CI	82,5-98,6	77,0-96,9	80,0-97,4	75,1-94,7	
ТБ/МТБ (-) TB MBT (-) Ib	Положительный Positive	50/64 (78,1%)	25/36 (69,4%)	59/74 (79,7%)	46/55 (83,6%)	
	95% ДИ 95% CI	62,5-88,1	62,0-78,4	68,0-82,6	81,4-92,4	

ТАБЛИЦА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ В КРОВИ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ АНТИГЕННОГО МАТЕРИАЛА ESAT-6/SFP-10 В ГРУППАХ, М±SD/n (%)

TABLE 3. DETECTION OF IMMUNE COMPLEXES AFTER STIMULATION ESAT-6/CFP-10 ANTIGENS IN BLOOD IN GROUPS, М±SD/n (%)

Показатели Indicators	Норма Norm	Ia подгруппа (туберкулез легких, МБТ (+)) Ia subgroup (pulmonary tuberculosis, MBT (+)) (n = 50)	II группа (ЛТИ) II group (LTI) (n = 15)	III группа здоровые лица (группа контроля) III group healthy subjects (control group) (n = 14)
Суммарные иммунные комплексы Immune complexes	Менее 1,0 Less	7,25±2,8 50 (100,0)	2,28±1,5* 14 (93,3)	2,92±0,8** 13 (92,9)
IgG1	Менее 1,0 Less	4,25±2,0 50 (100,0)	2,38±2,0* 13 (86,7)	2,99±0,3** 12 (85,7)
IgG3	Менее 1,0 Less	3,2±1,2 48 (96,0)	0,32±1,2* 3 (20,0)*	0,3±0,3** 1 (7,4)**
IgE	Менее 1,0 Less	3,48±1,9 46 (92,0)	0,2±1,9* 1 (6,7)*	0,27±0,1** 2 (14,3)**
IgG1 + IgG3	Менее 1,0 Less	4,08±2,1 47 (94,0)	0,16±1,1* 1 (6,7)*	0 0
IgG1 + IgE	Менее 1,0 Less	7,72±4,0 13 (26,0)	0,42±2,0* 1(6,7)	0,73±2,0** 2(14,3)**
IgG3 + IgE	Менее 1,0 Less	7,15±3,6 30 (57,0)	0 0	0 0

Примечание. * – отличия значимы (p < 0,001 для всех показателей) по сравнению с группой II; ** – отличия значимы (p < 0,001 для всех показателей) по сравнению с контрольной группой.

Note. *, differences are significant (p < 0.001 for all indicators) in comparison with group II. **, differences are significant (p < 0.001 for all indicators) in comparison with control group.

до 83,6% в Ib подгруппе в зависимости от применения тестов.

Таким образом, проведенный комплекс обследования наглядно демонстрирует отсутствие возможности верификации диагноза туберкулеза легких в половине случаев, при этом при наличии соответствующих рентгенологических изменений клиническая симптоматика регистрируется в 60% случаев.

Регистрация латентной туберкулезной инфекции возможна только при наличии положительного иммунологического теста. В данном исследовании учитывались только результаты новых иммунологических тестов (T-SPOT, QFT и DST) при отсутствии клинических и рентгенологических проявлений активного туберкулеза. Очевидно, что у лиц с ЛТИ в 100% случаев имеет место положительный иммунологический тест, тогда как положительный тест у больных туберкулезом был в 69,4 и 90,6% случаев в зависимости от диагностических возможностей применяемого теста. Полученные данные демонстрируют отсутствие возможности подтвердить туберкулез на основании бактериологических методов и различить ЛТИ и активный туберкулез при отсутствии различий по результатам существующих иммунологических методов, что требует разработки новых критериев определения активности туберкулезной инфекции на основании именно иммунологических методов, которые позволяют без выявления возбудителя констатировать им-

мунный ответ на наличие микобактерий туберкулеза в организме человека.

Далее был проведен анализ уровня иммуноглобулинов, которые определялись в трех группах наблюдения с помощью метода динамического светорассеяния. При этом определение иммуноглобулинов осуществлялось у больных туберкулезом с верифицированным диагнозом (Ia подгруппа).

Результаты определения уровня специфических ИК в плазме крови в группах сравнения (Ia и II), а также в группе контроля (III) представлены в таблице 3.

Согласно представленным в таблице 3 данным, суммарные ИК определялись во всех группах в одинаковом проценте случаев, но во II и III группах они регистрировались на достоверно низком уровне, так же как IgG1. Следует отметить, что во II и III группах в единичных случаях определялись IgG3 и IgE, так же как изотипы IgG1 + IgG3, IgG1 + IgE и IgG3 + IgE.

На основании полученных данных был проведен расчет показателей диагностической значимости метода, которые представлены в таблице 4.

Как представлено в таблице 4, определение общих ИК, стимулированных специфическим антигеном, не имеет высокой диагностической значимости при определении туберкулезной инфекции, но изотипы иммуноглобулинов демонстрируют высокую специфичность и чувствительность.

ТАБЛИЦА 4. ПОКАЗАТЕЛИ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ

TABLE 4. INDICATORS OF THE DIAGNOSTIC OF DEFINITION SPECIFIC IMMUNE COMPLEXES

Показатели Indicators	Диагностическая чувствительность Diagnostic sensitivity	Диагностическая специфичность Diagnostic specificity	Диагностическая значимость Diagnostic value
	(%)		
Суммарные иммунные комплексы Immune complexes	79,3	7,7	43,5
IgG1	80,6	1,6	41,2
IgG3	97,9	100,0	98,9
IgE	95,8	100,0	97,9
IgG1 + IgG3	100,0	100,0	100,0
IgG1 + IgE	86,7	100,0	93,4
IgG3 + IgE	100,0	100,0	100,0

Определение низкого уровня иммунных комплексов в условиях высокого уровня распространения туберкулезной инфекции является допустимым и может свидетельствовать о наличии слабых проявлений латентной туберкулезной инфекции, а также подтверждает высокую чувствительность метода. Однако не является понятным отсутствие высокого уровня ИК у лиц с латентной туберкулезной инфекцией. При этом полученные результаты позволяют выявлять группу высокого риска по развитию активного туберкулеза среди лиц с латентной туберкулезной инфекцией.

Обсуждение

Известно, что, несмотря на значительную долю инфицированных микобактерией туберкулеза (МБТ) людей, составляющую примерно одну треть населения земного шара, только в 5-10% случаев происходит развитие туберкулеза в той или иной клинической форме. У остальных инфекция носит латентный, бессимптомный характер. В результате взаимодействия звеньев врожденного и адаптивного иммунитета в большинстве случаев происходит либо полное освобождение от инфекции, либо подавление ее активности и перевод в латентную форму. В отдельных случаях возможны нарушения в этой цепи взаимодействий, что приводит к развитию инфекции не только в легких, но и распростра-

нение МБТ с кровью в различные ткани организма. Уже доказано, что лица, которые имеют положительные иммунологические тесты, определяющие латентную туберкулезную инфекцию, являются группой высокого риска по развитию активной туберкулезной инфекции. Однако результаты проведенных до настоящего времени исследований не продемонстрировали достоверно значимых иммунологических различий между этими состояниями [13].

Определение специфических иммунных комплексов позволило наиболее точно из всех существующих сегодня иммунологических методов в 100% случаев определить активность туберкулезной инфекции у больных туберкулезом, а также выявить достоверную разницу между активной и латентной туберкулезной инфекцией. В исследовании удалось получить данные, которые позволяют выявить группу особого риска в развитии активного туберкулеза среди лиц с положительными иммунологическими тестами. Низкий уровень изотипов специфических иммуноглобулинов у лиц с ЛТИ позволяет говорить о благоприятном прогнозе в отношении развития активного туберкулеза, и, наоборот, нарастание в динамике уровня изотипов IgG3 и IgE может свидетельствовать о неблагоприятной тенденции в отношении развития туберкулезной инфекции. В настоящее время такой прогноз невозможно осуществить с применением используемых в клинической практике иммунологических тестов.

Список литературы / References

1. Белокуров М.А., Старшинова А.А., Журавлев В.Ю., Кирюхина Л.Д., Павлова М.В., Арчакова Л.И., Козак А.Р., Цинзерлинг В.А., Яблонский П.К. Возможности иммунологических методов в дифференциальной диагностике саркоидоза и туберкулеза органов дыхания // Журнал инфектологии, 2015. Т. 7, № 2. С. 98-104. [Belokurov M.A., Starshinova A.A., Zhuravlev V.Yu., Kiryukhina L.D., Pavlova M.V., Archakova L.I. Possibilities of immunological methods in differential diagnostics of sarcoidosis and tuberculosis of respiratory organs. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2015, Vol. 7, no. 2, pp. 98-104. (In Russ.)]
2. Васильева Е.А., Вербов Н.В., Тотолян А.А. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике активного туберкулеза легких и латентной туберкулезной инфекции // Медицинский альянс, 2015. № 1. С. 92-93. [Vasilyeva E.A., Verbov N.V., Totolyan A.A. Immunological methods in differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis and latent tuberculosis infection. *Meditsinskiy alyans = Medical Alliance*, 2015, no. 1, pp. 92-93. (In Russ.)]
3. Васильева И.А., Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Стерликов С.А. Глобальные отчеты Всемирной организации здравоохранения по туберкулезу: формирование и интерпретация // Туберкулез и болезни легких, 2017. Т. 95, № 5. С. 7-16. [Vasilyeva I.A., Belilovsky E.M., Borisov S.E., Sterlikov S.A. Global reports of the World Health Organization on tuberculosis: formation and interpretation. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, Vol. 95, no. 5, pp. 7-16. (In Russ.)]
4. Кисличкин Н.Н., Ленхерр-Ильина Т.В., Красильников И.В. Диагностика туберкулеза. Туберкулин и группа препаратов на основе белков ESAT-6/CFP-10 // Инфекционные болезни, 2016. Т. 14, № 1. С. 48-54. [Kislichkin N.N., Lenherr-Ilyina T.V., Krasilnikov I.V. Diagnosis of tuberculosis. Tuberculin and a group of drugs based on proteins ESAT-6/CFP-10. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2016, Vol. 14, no. 1, pp. 48-54. (In Russ.)]
5. Кораблев П.В., Ланда С.Б., Семенова Е.В., Филатов М.В. Динамическое светорассеяние – простой и чувствительный метод, позволяющий определять появление иммунных комплексов в биологических жидкостях // Биопрепараты, 2015. № 54. С. 53-58. [Korablev P.V., Landa S.B., Semenova E.V., Filatov M.V. Dynamic light scattering – a simple and sensitive method to determine the occurrence of immune complexes in biological fluids. *Biopreparaty = Biopreparation*, 2015, no. 54, pp. 53-58. (In Russ.)].

6. Ланда С.Б., Филатов М.В., Арутюнян А.В., Варфоломеева Е.В. Исследование образования мегамолекулярных комплексов в плазме крови методом лазерной корреляционной спектроскопии // Клиническая лабораторная диагностика, 2008. № 4. С. 37-41. [Landa S.B., Filatov M.V., Arutunian A.V., Varfolomeeva E.V. Study of plasma megamolecular complexation by laser correlation spectroscopy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2008, no. 4, pp. 37-41. (In Russ.)]
7. Моисеева Н.Н., Одинец В.С. Анализ результатов применения аллергена туберкулезного рекомбинантного «Диаскинтест» для массовой диагностики // Медицинский альянс, 2015. № 1. С. 132-133. [Moiseeva N.N., Odinets V.S. Analysis of the results of the application of the allergen of the tuberculous recombinant "Diaskintest" for mass diagnostics. *Meditsinskiy alyans = Medical Alliance*, 2015, no. 1, pp. 132-133. (In Russ.)]
8. Нечаева О.Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России // Заместитель главного врача, 2015. № 7. С. 17-23. [Nechaeva O.B. The epidemic situation of tuberculosis in Russia. *Zamestitel glavnogo vracha = Chief Deputy*, 2015, no. 7, pp. 17-23. (In Russ.)]
9. Слогодская Л.В. Кожные иммунологические пробы при туберкулезе – история и современность // Туберкулез и болезни легких, 2013. № 5. С. 39-47. [Slogotskaya L.V. Skin immunological tests for tuberculosis – history and modernity. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2013, no. 5, pp. 39-47. (In Russ.)]
10. Старшинова А.А., Пантелеев А.М., Васильева Е.В., Манина В.В., Павлова М.В., Сапожникова Н.В. Применение современных иммунологических методов в диагностике туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией // Журнал инфектологии, 2015. Т. 7, № 3. С. 126-130. [Starshinova A.A., Panteleev A.M., Vasilyeva E.V., Manina V.V., Pavlova M.V., Sapozhnikova N.V. Application of modern immunological methods in the diagnosis of tuberculosis in patients with HIV infection. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2015, Vol. 7, no. 3, pp. 126-130. (In Russ.)]
11. Филимонов П.Н. К дискуссии о латентной туберкулезной инфекции // Туберкулез и болезни легких, 2014. № 5. С. 69-74. [Filimonov P.N. Towards a discussion about latent tuberculosis infection. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2014, no. 5, pp. 69-74. (In Russ.)]
12. Ayubi E., Doosti-Irani A., Sanjari Moghaddam A., Khazaei S., Mansori K., Safiri S., Sani M., Mostafavi E. Comparison of QuantiFERON-TB Gold In-Tube, no. QFT-GIT and tuberculin skin test (TST) for diagnosis of latent tuberculosis in haemodialysis (HD) patients: a meta-analysis of estimates. *Epidemiol. Infect.*, 2017, Vol. 145, no. 9, pp. 1824-1833.
13. Doosti-Irani A., Ayubi E., Mostafavi Doosti-Irani E. Tuberculin and QuantiFERON-TB-Gold tests for latent tuberculosis: a meta-analysis. *Occup. Med. (Lond.)*, 2016, Vol. 66, no. 6, pp. 437-445.
14. Koufopoulou M., Sutton A.J., Breheny K., Diwakar L. Methods used in economic evaluations of tuberculin skin tests and interferon gamma release assays for the screening of latent tuberculosis infection: a systematic review. *Value Health*, 2016, Vol. 19, no. 2, pp. 267-276.
15. Lebedev A.D., Ivanova M.A., Lomakin A.V., Noskin V.A. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl. Opt.*, 1997, Vol. 36, no. 30, pp. 7518-7522.
16. Lee J.Y., Jung Y.W., Jeong I., Joh J.S., Sim S.Y., Choi B., Jee H.G., Lim D.G. Immune parameters differentiating active from latent tuberculosis infection in humans. *Tuberculosis (Edinb)*, 2015, Vol. 95, no. 6, pp. 758-763.
17. Mamishir S., Pourakbari B., Marjani M., Mahmoudi S. Diagnosis of latent tuberculosis infection among immunodeficient individuals: review of concordance between interferon-gamma release assays and the tuberculin skin test. *Br. J. Biomed. Sci.*, 2014, Vol. 71, no. 3, pp. 115-124.
18. Matteelli A., Centis R., d'Ambrosio L., Sotgiu G., Tadolini M., Pontali E., Spanevello A., Migliori G.B. World Health Organization strategies for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. *Expert. Rev. Respir. Med.*, 2016, Vol. 10, no. 9, pp. 991-1002.
19. Matteelli A., Sulis G., Capone S., d'Ambrosio L., Migliori G.B., Getahun H. Tuberculosis elimination and the challenge of latent tuberculosis. *Presse Med.*, 2017, Vol. 46, no. 2, Pt 2, pp. e13-e21.
20. Sen W., Wua J., Chena J., Gaoa Y., Shu Zh., Zhou Z., Huangb H., Shaoa L., Jina J., Zhanga Y., Ganga W. Evaluation of Mycobacterium tuberculosis-specific antibody responses for the discrimination of active and latent tuberculosis infection. *Int. J. Infect. Dis.*, 2018, Vol. 70, pp. 1-9.
21. World Health Organization. Global tuberculosis report, 2016, p. 10. [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <https://www.who.int/tb/publications/2016/en/>. [World Health Organization. Global tuberculosis report, 2016, p. 10. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.who.int/tb/publications/2016/en/>.

Авторы:

Старшинова А.А. – д.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Starshinova A.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology; St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Истомина Е.В. — врач-фтизиатр, младший научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Зинченко Ю.С. — врач-пульмонолог, младший научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Филатов М.В. — к.б.н., старший научный сотрудник, заведующий лабораторией клеточной биологии ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург; ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Гатчина, Ленинградская обл., Россия

Ланда С.Б. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской биофизики ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Гатчина, Ленинградская обл., Россия

Бурдаков В.С. — старший лаборант лаборатории клеточной биологии, научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург; ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Гатчина, Ленинградская обл.; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Беляева Е.Н. — врач-фтизиатр, младший научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Назаренко М.М. — врач-фтизиатр, младший научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Сапожникова Н.В. — к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Яблонский П.К. — д.м.н., профессор, директор ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ; декан медицинского факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Istomina E.V., Phthisiatrician, Junior Research Associate, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Zinchenko Yu.S., Pulmonologist, Junior Research Associate, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology; St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Filatov M.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Head, Laboratory of Cell Biology, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg; St. Petersburg B. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, National Research Center “Kurchatov Institute”, Gatchina, Leningrad Region, Russian Federation

Landa S.B., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Medical Biophysics, St. Petersburg B. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, National Research Center “Kurchatov Institute”, Gatchina, Leningrad Region, Russian Federation

Burdakov V.S., Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Cell Biology, Research Associate, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg; St. Petersburg B. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, National Research Center “Kurchatov Institute”, Gatchina, Leningrad Region; St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Belyaeva E.N., Phthisiatrician, Junior Research Associate, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Nazarenko M.M., Phthisiatrician, Junior Research Associate, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Sapozhnikova N.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Yablonkiy P.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology; Dean, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 21.06.2018

Отправлена на доработку 02.07.2018

Принята к печати 20.09.2018

Received 21.06.2018

Revision received 02.07.2018

Accepted 20.09.2018

ОСОБЕННОСТИ АЛЛОГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В КРАТКОСРОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ СУПРУГОВ, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА ИЛИ РАННИЕ РЕПРОДУКТИВНЫЕ ПОТЕРИ

Шабалдин А.В.¹, Шмулевич С.А.², Чистякова Г.Н.³, Ремизова И.И.³,
Лукоянычева Е.Б.⁴, Горшкова С.В.¹, Шабалдина Е.В.⁵

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

² ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени
академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства
здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

⁴ ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровская областная клиническая больница», г. Кемерово, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Кемерово, Россия

Резюме. Проведено изучение аллогенных по HLA взаимодействий в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с врожденными пороками сердца или ранние репродуктивные потери. Обследованы: 21 семейная пара (основная группа), имеющая детей со спорадическими врожденными пороками сердца (дефект межжелудочковой перегородки) без хромосомных заболеваний (ВПС); 50 семейных пар (группа сравнения), имеющих две и более репродуктивные потери (выкидыши, замершие беременности, привычное невынашивание беременности — ПНБ) в ранние сроки гестации (до 9 недель); и 41 семья, имеющая трех и более здоровых детей (контрольная группа). Оценка иммунного ответа в СКЛ оценивалась по увеличению экспрессии HLA-DR в смешанной культуре по отношению к спонтанным культурам лимфоцитов. Первичная окраска женских и мужских лимфоцитов моноклональными антителами к CD45, конъюгированными с различными флуоресцентными красителями (PC-5 и PC-7), позволила оценить иммунный ответ женских лимфоцитов на мужские и наоборот. Проведена оценка супрессорного эффекта женской аутосыворотки на смешанную культуру лимфоцитов супругов. Результаты исследования показали различие в аллогенных по HLA взаимодействиях в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих репродуктивные потери и детей с врожденными пороками сердца. Репродуктивные потери были ассоциированы с низким блокирующим эффектом женской аутосыворотки на аллогенные по HLA взаимодействия в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов. Врожденные пороки сердца были ассоциированы с высокой активностью женских В-лимфоцитов (CD3⁺/HLA-DR⁺) в краткосрочной смешанной культуре лимфоцитов супругов.

Ключевые слова: смешанная культура лимфоцитов, репродуктивные потери, врожденные пороки сердца, HLA-DR

Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
652002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.
Тел.: 8 (3842) 64-56-50.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Address for correspondence:

Shabaldin Andrey V.
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular
Diseases
652002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy blvrd, 6.
Phone: 7 (3842) 64-56-50.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, С.А. Шмулевич, Г.Н. Чистякова,
И.И. Ремизова, Е.Б. Лукоянычева, С.В. Горшкова,
Е.В. Шабалдина «Особенности аллогенных
взаимодействий в краткосрочной культуре
лимфоцитов супругов, имеющих детей с врожденными
пороками сердца или ранние репродуктивные
потери» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21,
№ 2. С. 279-292.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292

© Шабалдин А.В. и соавт., 2019

For citation:

A.V. Shabaldin, S.A. Shmulevich, G.N. Chistyakova,
I.I. Remizova, E.B. Lukoyanycheva, S.V. Gorshkova,
E.V. Shabaldina "Characteristics of allogeneic interactions
in the short-term cultures of lymphocytes from the parents of
children with congenital heart disease or early reproductive
loss", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 279-292.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292

CHARACTERISTICS OF ALLOGENEIC INTERACTIONS IN THE SHORT-TERM CULTURES OF LYMPHOCYTES FROM THE PARENTS OF CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DISEASE OR EARLY REPRODUCTIVE LOSS

Shabaldin A.V.^a, Shmulevich S.A.^b, Chistyakova G.N.^c, Remizova I.I.^c, Lukoyanycheva E.B.^d, Gorshkova S.V.^a, Shabaldina E.V.^e

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

^b Kemerovo L. Barbarash Cardiological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^c Research Institute of Maternity and Infancy Care, Ekaterinburg, Russian Federation

^d Regional Hospital, Kemerovo, Russian Federation

^e Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. We have studied HLA allogeneic interactions in short-term cultures of lymphocytes from the parents having children with congenital heart defects (CHD), or subject to early reproductive losses. Twenty-one married couples (CHD as the main group) who had children with sporadic CHD (interventricular septal defect) without chromosomal diseases were observed. Fifty married couples (a comparison group) had two or more reproductive losses in early gestation (up to 9 weeks), denoted as PNPs (miscarriages, missed abortions, habitual miscarriages). Forty-one families with three or more healthy children represented a control group. Immune response in cell cultures was evaluated by increasing expression of HLA-DR in a mixed culture, as compared to spontaneous lymphocyte cultures. Initial labeling of female and male lymphocytes with monoclonal antibodies to CD45 conjugated to different fluorescent dyes (PC-5 and PC-7) allowed us to evaluate the immune response of female lymphocytes to males and *vice versa*. The suppressor effect of autologous female serum upon the mixed culture of the lymphocytes of the spouses was also evaluated. Results of the present study showed a difference in HLA allogeneic interactions in the short-term culture of lymphocytes registered for spouses with reproductive losses and children with congenital heart defects. Reproductive losses were associated with a low blocking effect of female auto-serum upon allogeneic HLA interactions in the short-term culture of the lymphocytes of the spouses. Congenital heart defects were associated with high activity of female B-lymphocytes (CD3⁺/HL-DR⁺) in short-term mixed culture of lymphocytes from the spouses.

Keywords: mixed lymphocyte culture, HLA-DR, reproductive loss, congenital heart disease

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Введение

Согласно данным литературы, формирование и вынашивание беременности является иммунологическим феноменом, при котором затрагиваются все звенья иммунной системы на локальном и системном уровнях [1]. Остаются актуальными предположения, высказанные в 80-90-х годах прошлого столетия В.И. Говалло (1989), о раство-

римых специфических супрессорных адаптивных факторах, имеющихся у женщин и тормозящих иммунное отторжение зародыша. К этим факторам могут относиться антитела, направленные на собственные антигены иммунной презентации [2, 3]. Если принять во внимание, что антигенпрезентирующие клетки составляют до 10% пула иммунного микроокружения зародыша [4], то снижение специфической иммунной презентации аллоантигенов плода мужского происхождения будет являться существенным фактором и в ограничении эффекторных функций. Кроме того, через молекулы МНС (для человека — HLA) осуществляются антиген-специфические межклеточные контакты (антигенпрезентирующих, Т-хелперных, Т-регуляторных и Т-эффекторных клеток), обеспечивающие вынашивание беременности через прайминг Т-хелперов [5, 6]. Наличие антител к этим молекулам или особенности цитокиновой регуляции могут быть

важным фактором в вынашивании беременности. До формирования плаценты между материнским микроокружением и делящимся полуаллогенным зародышем всегда имеет место иммунный конфликт по HLA. При выношенной беременности этот конфликт носит компенсированный характер, при репродуктивных потерях — декомпенсированный.

Эмбриогенез сердца и связанный с ним тератогенез приходится на 3-6 неделю эмбрионального периода онтогенеза, когда из утолщенного сосуда с сократительной функцией формируется четырехкамерный сложноорганизованный орган с автономной сократительной системой [7]. Влияние различных тератогенов, мутагенов в этот временной промежуток приводит к развитию большого количества (более 140 нозологических форм) комбинированных и изолированных врожденных пороков сердца (ВПС). Модель формирования врожденных пороков сердца включает множественные причины, как правило, не имеющие специфического действия. Речь идет об ассоциативном влиянии комплекса повреждающих экзо- и эндогенных факторов в критические периоды развития эмбриона или отдельных его органов [8], что можно представить через эпигенетическое влияние различных ксенобиотиков и метаболитов на процессы эмбриогенеза. Широко обсуждается вопрос о посттрансляционных модификациях в белках, участвующих в регуляции эмбриогенеза сердца [9, 10]. В то же время именно иммунная система матери поддерживает гомеостаз эмбриона и плода, обеспечивая анти-тератогенную защиту [11]. Тем самым декомпенсированный иммунный конфликт между матерью и эмбрионом по HLA в этот период может активировать тератогенез в сердце.

Поиск материнских и отцовских иммунологических критериев, определяющих иммунные нарушения в системе «мать—эмбрион», как факторов индукции иммунного стресса и альтернативного компонента воспаления, является наиболее перспективным, так как дает возможность разработки методов иммунопрофилактики репродуктивных потерь и рождения детей с ВПС на этапе планирования беременности.

Исходя из этого, **целью настоящей работы** было изучение особенностей аллогенных взаимодействий в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с врожденными пороками сердца или репродуктивные потери.

Материалы и методы

Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. У всех ро-

дителей до момента включения в исследование было получено информированное согласие на использование биологического материала в научном исследовании по теме «Разработка инновационных подходов в прогнозе, диагностике, лечении и реабилитации врожденных пороков сердца у детей в Кузбасском регионе».

Для выполнения поставленной цели были сформированы три группы семей (основная, сравнения и контрольная группы). Проведено обследование 21 семейной пары (основная группа — ВПС), имеющей детей со спорадическими ВПС (дефект межжелудочковой перегородки) без хромосомных заболеваний. Группу сравнения составили 50 семейных пар, имеющих две и более репродуктивные потери (выкидыши, замершие беременности, привычное невынашивание беременности — ПНБ) в ранние сроки гестации (до 9 недель). Контрольную группу — семьи, имеющие трех и более здоровых детей ($n = 41$).

Обследование всех групп проводили с помощью разработанных и запатентованных методов определения иммунного ответа женских лимфоцитов на мужские лимфоциты, через оценку экспрессии молекулы HLA-DR на их мембране [13, 14].

Все действия по подготовке краткосрочной смешанной культуры лимфоцитов супругов выполняли в боксированном помещении для культуральных работ, в ламинарном шкафу, предназначенном для работ с микроорганизмами 3-4 групп патогенности. Лимфоцитарную взвесь каждого из супругов получали на градиенте плотности 1,077. После двукратной отмывки женские и мужские лимфоциты окрашивали моноклональными антителами к CD45. Для женских лимфоцитов использовали антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем перидин-хлорофиллом (PC-5), а для мужских — PC-7 (BioLegend, США). Далее пробирки с женскими и мужскими лимфоцитами и с соответствующими конъюгатами моноклональных антител с флуоресцентными красителями инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. После однократной отмывки в пробирки женских и мужских лимфоцитов вносили по 1000 мкл полной среды (RPMI-1640 с эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) из расчета 15%, L-глутамина из расчета 2 ммоль, 10 ммоль Нерес-буфера, 5×10^{-5} моль 2-меркаптоэтанол и 50 мкг/мл раствора гентамицина-сульфата). 500 мкл клеточной взвеси в полной ростовой среде переносили в отдельные пробирки, куда добавляли женскую ауто-сыворотку из расчета 10%. Таким образом, получали по две пробирки с женскими и мужскими лимфоцитами: лимфоциты первой пробирки со-

держали в полной ростовой среде, а лимфоциты второй пробирки — с добавлением 10% женской аутосыворотки. Далее в двенадцать пластиковых пробирок для проточной цитофлуориметрии (Beckman Coulter или Becton Dickinson, США) вносили лимфоциты (в концентрации 2000 клеток в 1 мкл) как в полной среде, так и с добавлением 10% аутосыворотки в объеме 200 мкл. Все постановки дублировали, поэтому для каждого этапа использовали две пробирки. Первые две пробирки (№ 1 и № 2) были предназначены для смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ), поэтому в каждую пробирку (№ 1 и № 2) вносили и смешивали лимфоциты мужчины и женщины в общем объеме по 100 мкл (конечный объем 200 мкл). В пробирки № 3 и № 4 вносили лимфоциты (200 мкл) женщины, и это была монокультура лимфоцитов женщин. В пробирки № 5 и № 6 вносили лимфоциты (200 мкл) мужчины (супруга), и это — монокультура лимфоцитов мужчины. Аналогичную процедуру проводили для лимфоцитов с добавлением 10% аутосыворотки. Пробирки № 7, 8 — СКЛ с добавлением 10% аутосыворотки; № 9-10 — женская монокультура с 10% женской аутосывороткой и № 11-12 — мужская монокультура с 10% женской аутосывороткой. Далее, закрыв, пробирки помещали в CO₂ инкубатор на 2 часа при 37 °С. После окончания инкубации проводили однократную отмывку лимфоцитов каждой пробирки. На окончательном этапе выполняли окрашивание лимфоцитов (смешанной культуры и отдельных монокультур) с помощью конъюгатов флуоресцентных красителей (флуоресцеин изотиоцианат — FITC и фикоэритрин — PE) с моноклональными антителами к CD3 и HLA-DR, добавляли в каждую пробирку по 5 мкл (Beckman Coulter, США). Соотношение объема антител к количеству лимфоцитов, время и температура инкубаций соответствовали прилагаемым инструкциям к каждому конъюгированному моноклональному антителу. Инкубирование проводилось в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. После окончательной отмывки в каждую пробирку вносили раствор фиксатора OptiLyse (Beckman Coulter, США) в объеме 300 мкл.

Оценку экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов CD45, CD3, HLA-DR в краткосрочной смешанной культуре лимфоцитов супругов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 с программным обеспечением CXP (Beckman Coulter, США).

Для снятия результатов был разработан протокол проточной цитофлуориметрии, представленный на рисунках 1, 2, 3 (см. 2-ю стр. обложки). Использовали пять гистограмм. В первой гистограмме выделяли популяцию лимфоцитов по их

размерам (прямое (малоугловое) светорассеяние — forward scatter — FSL) и по внутриклеточной организации (боковое светорассеяние — side scatter — SSL). В следующих двух гистограммах лимфоциты разделяли на женские, меченные CD45-PC7 (против SSL), и мужские, окрашенные CD45-PC5 (против SSL). Далее в двух следующих гистограммах анализировали, соответственно, мужские и женские субпопуляции лимфоцитов CD3⁺/HLA-DR⁺, CD3⁺/HLA-DR⁺ и CD45⁺/HLA-DR⁺. Анализ этих субпопуляций проводили как в смешанной культуре лимфоцитов, так и в монокультурах. Для каждой женской и мужской субпопуляции лимфоцитов рассчитывали коэффициент прироста (КП) — удельный вес анализируемой субпопуляции лимфоцитов в смешанной культуре по отношению к ее удельному весу в соответствующей монокультуре:

$$КП_{CD3^+HLA-DR^+} = \frac{((CD3^+HLA-DR^+_{СКЛ} - CD3^+HLA-DR^+_{кон.}) \times 100)}{CD3^+HLA-DR^+_{кон.}},$$

где CD3⁺HLA-DR⁺_{СКЛ} — относительное число субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ в смешанной культуре лимфоцитов, %; CD3⁺HLA-DR⁺_{кон.} — относительное число субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ в монокультуре анализируемого донора, %.

$$КП_{CD3^+HLA-DR^+} = \frac{((CD3^+HLA-DR^+_{СКЛ} - CD3^+HLA-DR^+_{кон.}) \times 100)}{CD3^+HLA-DR^+_{кон.}},$$

где CD3⁺HLA-DR⁺_{СКЛ} — относительное число субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ в смешанной культуре лимфоцитов, %; CD3⁺HLA-DR⁺_{кон.} — относительное число субпопуляции CD3⁺HLA-DR⁺ в монокультуре анализируемого донора, %.

$$КП_{CD45^+HLA-DR^+} = \frac{((CD45^+HLA-DR^+_{СКЛ} - CD45^+HLA-DR^+_{кон.}) \times 100)}{CD45^+HLA-DR^+_{кон.}},$$

где CD45⁺HLA-DR⁺_{СКЛ} — относительное число субпопуляции CD45⁺HLA-DR⁺ в смешанной культуре лимфоцитов, %; CD45⁺HLA-DR⁺_{кон.} — относительное число субпопуляции CD45⁺HLA-DR⁺ в монокультуре анализируемого донора, %.

Фактически в СКЛ оценивали краткосрочное увеличение или уменьшение мембранной экспрессии HLA-DR на различных субпопуляциях лимфоцитов по отношению к базовой экспрессии этой молекулы в спонтанных культурах. Следует отметить, что мембранная краткосрочная экспрессия молекул HLA-DR не связана с экспрессией соответствующих генов. Для рецепторов межклеточных контактов показаны их краткосрочные мембранные реаранжировки [15]. Следовательно, изменение экспрессии HLA-DR может также свидетельствовать о краткосрочных

мембранных реаранжировках HLA-DR под воздействием аллогенных межклеточных контактов.

Блокирующий эффект (коэффициент блокирования – КБ) женской аутосыворотки клеточных взаимодействий в СКЛ рассчитывался по разнице КП соответствующих субпопуляций в СКЛ в полной ростовой среде (с ЭТС) и в ростовой среде с добавлением 10% женской аутосыворотки. Общая формула:

$$КБ = ((КП_{СКЛ\alpha} - КП_{СКЛ\beta}) \times 100) / |КП_{СКЛ\beta}|,$$

где $КП_{СКЛ\alpha}$ – коэффициент прироста в СКЛ с 10% женской аутосывороткой, $КП_{СКЛ\beta}$ – коэффициент прироста в СКЛ в полной ростовой среде с ЭТС; $|КП_{СКЛ\beta}|$ – модуль коэффициента прироста в СКЛ в полной ростовой среде с ЭТС.

Отрицательное значение показателя КБ демонстрировало блокирующий эффект женской аутосыворотки на клеточные реакции в СКЛ, а положительное – стимулирующий.

Кроме того, проводили сравнения КП и КБ в клеточных реакциях женских лимфоцитов против мужских лимфоцитов и мужских против женских. Учитывая современные представления об иммунологии репродукции, признавали, что мужские лимфоциты не могут быть сенсibilизированы к женским молекулам тканевой совместимости, а женские растворимые сывороточные факторы не имеют тропизма к клеточным реакциям мужских лимфоцитов к женским, и, соответственно, принимали реакции мужских лимфоцитов к женским контрольными для данной семейной пары. Соответствующие коэффициенты обозначали как эффективный коэффициент прироста (ЭКП) и эффективный коэффициент блокирования (ЭКБ). Общая формула эффективных коэффициентов выглядела следующим образом:

$$ЭКП(Б) = ((КП(Б)_Ж - КП(Б)_М) \times 100) / |КП(Б)_М|,$$

где $КП(Б)_Ж$ – коэффициент прироста или блокирования в клеточных реакциях «женщина против мужчины»; $КП(Б)_М$ – коэффициент прироста или блокирования в клеточных реакциях «мужчина против женщины»; $|КП(Б)_М|$ – модуль коэффициента прироста или блокирования в клеточных реакциях «мужчина против женщины».

В целом в контрольной группе, группе сравнения и основной группе оценивали 52 иммунологических показателя, полученных в процессе иммунных взаимодействий лимфоцитов супругов в краткосрочной СКЛ, в полной ростовой среде и с добавлением 10% женской аутосыворотки.

Статистическую обработку результатов исследования проводили при помощи пакета программ Statistica 10.0. Для выявления основных имму-

нологических факторов риска формирования репродуктивных потерь и врожденных пороков сердца использовали кластерный и факторный анализ. Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий количественных признаков осуществляли с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis), при отклонении нулевой гипотезы в ходе анализа проводили попарное сравнение групп. Данные представляли в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Результаты считали статистически значимыми при ошибке менее 5%.

Результаты

Проведенное исследование показало следующее. По иммунным показателям, отражающим взаимодействия по HLA в системе «мать–эмбрион», группа семей с ВПС имела отдельный кластер по отношению как к контрольной группе, так и к группе с репродуктивными потерями (ПНБ). Эти данные указывают на особые иммунные взаимодействия в системе «мать–эмбрион/плод» при формировании ВПС (рис. 4).

С помощью факторного анализа по иммунологическим показателям, отражающим иммунные взаимодействия по HLA в системе «мать–эмбрион», выделены основные переменные первого и второго факторов для привычного невынашивания беременности и врожденных пороков сердца. Принимая во внимание, что пер-

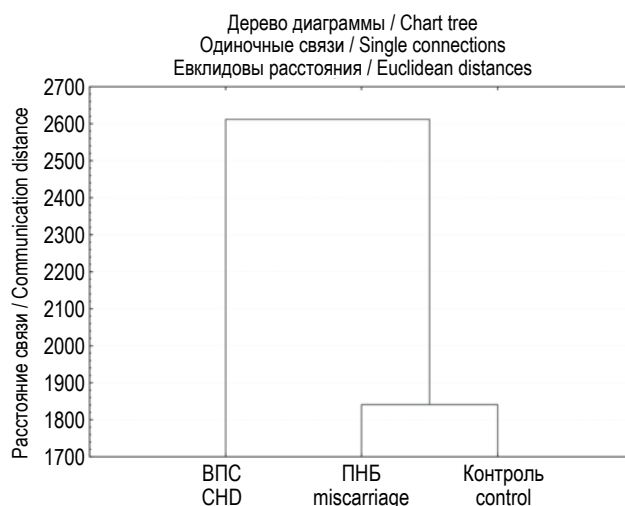


Рисунок 4. Кластерный анализ семейных пар контрольной группы (имеют более двух здоровых детей), группы сравнения (привычное невынашивание беременности – ПНБ) и основной группы (имеют детей с врожденными пороками сердца – ВПС)

Figure 4. Cluster analysis of the couples of the control group (have more than two healthy children), comparison groups (habitual abortion, HA) and the main group (have children with congenital heart disease, CHD)

вый и второй фактор отражали значимую связь с анализируемой патологией, то отрицательный знак перед выявленными переменными отражал отрицательную корреляцию с патологией.

Анализ результатов факторного анализа в группе ПНБ показал, что с неизвестной переменной первого фактора, положительно ассоциированной с невынашиванием беременности, отрицательно коррелировали коэффициенты прироста (КП) экспрессии HLA-DR на CD3⁺ лимфоцитах в СКЛ в полной среде с ЭТС, на CD3⁺ лимфоцитах в полной среде с ЭТС и в целом HLA-DR, а также КП экспрессии HLA-DR на женских лимфоцитах в СКЛ с добавлением женской аутосыворотки. Для первого фактора была также получена отрицательная корреляция с коэффициентом блокирования (КБ) женской аутосывороткой экспрессии HLA-DR на женских CD3⁺ лимфоцитах.

Для второго фактора была получена одна отрицательная корреляция с эффективным коэффициентом прироста (ЭКП) экспрессии HLA-DR на женских CD3⁺ лимфоцитах по отношению к соответствующей экспрессии HLA-DR на мужских CD3⁺ лимфоцитах в СКЛ в полной среде с добавлением ЭТС.

Полученные нами данные указывают, что главными иммунными компонентами, ассоциированными с репродуктивными потерями, являются вышеперечисленные КП, КБ и ЭКП, а отрицательное значение показателей отражает обратное действие этих переменных: чем они меньше, тем выше неизвестная переменная, ассоциированная с ПНБ.

Факторный анализ для основной группы ВПС выявил, что с первым фактором были отрицательно ассоциированы КП экспрессии HLA-DR на всех лимфоцитах женщин в СКЛ с ЭТС, КП экспрессии HLA-DR на CD3⁺ лимфоцитах женщин в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки и КП экспрессии HLA-DR на всех лимфоцитах женщин в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки, а также ЭКП экспрессии HLA-DR на женских лимфоцитах CD3⁺ и в целом на всех женских лимфоцитах в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки по отношению к соответствующим мужским СКЛ.

Со вторым фактором были положительно ассоциированы КП экспрессии HLA-DR на CD3⁺ лимфоцитах женщин в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки и КБ женской аутосыворотки экспрессии HLA-DR на женских CD3⁺ лимфоцитах, а также на всех женских лимфоцитах.

Более детально особенности материнско-отцовских иммунных взаимодействий по HLA изу-

чены при попарном сравнении показателей СКЛ контрольной группы, группы сравнения ПНБ и основной группы ВПС. Данные представлены в таблицах 1 и 2.

Как видно из таблицы 1, КП в СКЛ в полной среде с ЭТС различались между группами. В контрольной группе семей, имеющих двух и более детей, положительный КП экспрессии HLA-DR в СКЛ в полной среде с ЭТС регистрировался на женских CD3⁺ лимфоцитах, а отрицательный КП экспрессии HLA-DR в тех же условиях — на женских CD3⁺ лимфоцитах. Известно, что фенотип CD3⁺/HLA-DR⁺ присущ активным Т-лимфоцитам, а фенотип CD3⁺/HLA-DR⁺ — В-лимфоцитам. Краткосрочное взаимодействие аллогенных лимфоцитов в СКЛ в полной питательной среде с ЭТС приводит к угнетению экспрессии HLA-DR на активных Т-лимфоцитах. Возможно, феномен угнетения мембранной экспрессии связан с клеточными взаимодействиями различных субпопуляций женских Т-лимфоцитов при их контакте с аллогенными HLA. На В-лимфоцитах молекула HLA-DR является основной молекулой презентации растворимых антигенов, и увеличение ее экспрессии может отражать межклеточные кооперации женских лимфоцитов.

В то же время в группе ПНБ в СКЛ в полной среде с ЭТС имело место повышение экспрессии HLA-DR на активных женских Т-лимфоцитах, по отношению к спонтанной культуре ($p < 0,01$). Повышение экспрессии HLA-DR на В-лимфоцитах не имело достоверных отличий от контрольной группы.

Группа ВПС имела схожий с контрольной группой показатель КП экспрессии HLA-DR на Т-лимфоцитах и значительно более высокий, чем в контрольной группе, показатель КП экспрессии HLA-DR на В-лимфоцитах ($p < 0,05$).

Кроме того, по КП экспрессии HLA-DR в СКЛ в полной среде с ЭТС на женских активных Т-лимфоцитах и женских В-лимфоцитах группа ПНБ достоверно значимо отличалась от основной группы с ВПС ($p < 0,01$).

Достоверно значимое отличие между группой ВПС и контрольной группой получено по КП экспрессии HLA-DR в СКЛ с добавлением женской аутосыворотки на В-лимфоцитах (фенотип CD3⁺/HLA-DR⁺) ($p < 0,01$). При сравнении КП экспрессии HLA-DR в СКЛ с добавлением женской аутосыворотки на В-лимфоцитах (фенотип CD3⁺/HLA-DR⁺) положительное значение данного показателя выявлено в группах контроля и ВПС, причем в группе ВПС значение КП было на порядок выше ($p < 0,01$), а в группе сравнения данный КП был отрицательным ($p_{1-2, 2-3} < 0,01$).

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ (ПО ОТНОШЕНИЮ К КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ) ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В СКЛ СЕМЕЙНЫХ ПАР, В ГРУППАХ С РЕПРОДУКТИВНЫМИ ПОТЕРЯМИ (ПНБ) И С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА (ВПС), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. COMPARATIVE ANALYSIS (IN RELATION TO THE CONTROL GROUP) OF IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OBTAINED IN MLC OF MARRIED COUPLES, IN GROUPS WITH REPRODUCTIVE LOSSES AND CONGENITAL HEART DEFECTS (CHD), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Иммунные предикторы Immune predictors	Контроль Control	Сравнение, ПНБ Comparison, HA	Основная, ВПС Main, CHD	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₂₋₃
КП СКЛ ЭТС HLA-DR ⁺ CD3 ⁺ GF MLC FBS HLA-DR ⁺ CD3 ⁺	-16,6 (-30,9 – -2,3)	29,1 (-8,6-66,6)	-12,8 (-28,5-2,9)	p < 0,01		p < 0,01
КП СКЛ ЭТС HLA-DR ⁺ CD3 ⁻ GF MLC FBS HLA-DR ⁺ CD3 ⁻	23,4 (5,5-41,2)	2,8 (-11,1-16,6)	71,8 (6,5-137,2)		p < 0,05	p < 0,01
КП СКЛ ауто HLA-DR ⁺ CD3 ⁻ GF MLC auto HLA-DR ⁺ CD3 ⁻	14,2 (4,52-23,81)	-1,7 (-17,2-13,7)	114,3 (6,6-222,1)		p < 0,01	p < 0,01
КБ СКЛ ауто/ ЭТС HLA-DR ⁺ CD3 ⁺ CB MLC auto/FBS HLA-DR ⁺ CD3 ⁺	133,9 (77,8-189,9)	-133,5 (-248,9 – -18,1)	36,1 (-44,4-116,6)	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001
КБ СКЛ ауто/ ЭТС HLA-DR ⁺ CD3 ⁻ CB MLC auto/FBS HLA-DR ⁺ CD3 ⁻	-12,7 (-76,9-51,4)	-45,2 (-99,2-8,65)	1651,6 (-603,3-3906,7)		p < 0,001	p < 0,001
КБ СКЛ ауто/ ЭТС HLA-DR ⁺ CB MLC auto/FBS HLA-DR ⁺	16,7 (-53,9-87,4)	-59,9 (-118,9 – -1,1)	104,2 (4,6-203,7)	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001

Примечание. Представлены только достоверно значимые показатели. КП СКЛ ЭТС HLA-DR⁺CD3⁺ – коэффициенты прироста экспрессии HLA-DR на CD3⁺ лимфоцитах в СКЛ в полной среде с ЭТС; КП СКЛ ЭТС HLA-DR⁺CD3⁻ – коэффициенты прироста экспрессии HLA-DR на CD3⁻ лимфоцитах в СКЛ в полной среде с ЭТС; КП СКЛ ауто HLA-DR⁺CD3⁻ – коэффициенты прироста экспрессии HLA-DR на CD3⁻ лимфоцитах в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки; КБ СКЛ ауто/ЭТС HLA-DR⁺CD3⁺ – коэффициенты блокирования экспрессии HLA-DR женской аутосывороткой на женских CD3⁺ лимфоцитах в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки по отношению к СКЛ с ЭТС; КБ СКЛ ауто/ЭТС HLA-DR⁺CD3⁻ – коэффициенты блокирования экспрессии HLA-DR женской аутосывороткой на женских CD3⁻ лимфоцитах в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки по отношению к СКЛ с ЭТС; КБ СКЛ ауто/ЭТС HLA-DR⁺ – коэффициенты блокирования экспрессии HLA-DR женской аутосывороткой на женских лимфоцитах в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки по отношению к СКЛ с ЭТС.

Note. Represented only significant indicators. GF MLC FBS HLA-DR⁺CD3⁺, growth factors of HLA-DR expression on CD3⁺ lymphocytes in MLC in complete medium with FBS; GF MLC FBS HLA-DR⁺CD3⁻, growth factors of HLA-DR expression on CD3⁻ lymphocytes in MLC in complete medium with FBS; GF MLC auto HLA-DR⁺CD3⁻, growth factors of HLA-DR expression on CD3⁻ lymphocytes in MLC with the addition of 10% of the female auto-serum; CB MLC auto/FBS HLA-DR⁺CD3⁺, coefficients of blocking the expression of HLA-DR by female auto-serum on female CD3⁺ lymphocytes in MLC with the addition of 10% of female auto-serum to MLC with FBS; CB MLC auto/FBS HLA-DR⁺CD3⁻, coefficients of blocking the expression of HLA-DR by female auto-serum on female CD3⁻ lymphocytes in MLC with the addition of 10% of female auto-serum to MLC with FBS; CB MLC auto/FBS HLA-DR⁺, coefficients of blocking the expression of HLA-DR by female auto-serum serum on female lymphocytes in MLC with the addition of 10% of female auto-serum to MLC with FBS.

Важные отличия между группами выявлены при анализе блокирующей активности женской сыворотки на краткосрочную СКЛ, отраженной в блокирующем коэффициенте (КБ).

В контрольной группе присутствие женской аутосыворотки увеличивало КП в сравниваемых СКЛ на женских активных Т-лимфоцитах (фенотип $CD3^+/HLA-DR^+$). КБ для данной субпопуляции лимфоцитов был положительным. Напротив, в контрольной группе для В-лимфоцитов (фенотип $CD3^-/HLA-DR^+$) КБ был отрицательным. В целом, без деления на субпопуляции, экспрессия HLA-DR на женских лимфоцитах под воздействием женской аутосыворотки в СКЛ увеличивалась. КБ для всех HLA-DR был положительным.

В группе ПНБ как для активных женских Т-лимфоцитов, так и для В-лимфоцитов и в целом для HLA-DR КБ были отрицательными, что обусловлено подавлением женской аутосывороткой экспрессии HLA-DR на всех субпопуляциях женских лимфоцитов в СКЛ. Значения КБ были достоверно ниже в группе сравнения, чем в контроле, для активных женских Т-лимфоцитов (фенотип $CD3^+/HLA-DR^+$) и в целом для HLA-DR ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно).

Для группы ВПС КБ был положительным для всех анализируемых субпопуляций лимфоцитов. Это означало, что добавление в СКЛ женской аутосыворотки усиливало экспрессию HLA-DR на мембране лимфоцитов. Достоверно значимые различия между основной группой и группой контроля были достигнуты для всех КБ (табл. 3). Для активных женских Т-лимфоцитов (фенотип $CD3^+/HLA-DR^+$) КБ в основной группе был достоверно ниже, чем в контрольной ($p < 0,01$), а для женских В-лимфоцитов и всех лимфоцитов — достоверно выше ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно).

Все три показателя КБ были достоверно выше в основной группе, чем в группе сравнения (ПНБ) ($p < 0,001$). Эти результаты показывают принципиальные различия между иммунными нарушениями в системе «мать—эмбрион/плод», ассоциированными с репродуктивными потерями и с врожденными пороками развития сердца эмбриона/плода/новорожденного.

Как уже говорилось выше, разработанная и запатентованная система оценки аллогенных взаимодействий по HLA в краткосрочной смешанной культуре лимфоцитов супругов позволяет оценивать как особенности иммунного ответа (экспрессия HLA-DR) женских лимфоцитов на мужские, так и наоборот, и, принимая во внимание возможности дополнительного вну-

треннего контроля через несенсибилизированные женскими HLA мужские лимфоциты, ввели дополнительные эффективные коэффициенты прироста (ЭКП) или блокирования (ЭКБ), формула которых представлена в материалах и методах. Суть этих коэффициентов сводится к оценке прироста (положительный знак перед значением) или подавления (отрицательный знак перед значением) того или иного иммунного эффекта в женских СКЛ по отношению к соответствующим мужским СКЛ. Именно эти ЭКП и ЭКБ могут быть основой для рутинной оценки иммунных нарушений по HLA в системе «мать—эмбрион/плод» (табл. 2).

Из таблицы 2 видно, что для контрольной группы ЭКП экспрессии HLA-DR в СКЛ с ЭТС был отрицательным как для активных женских Т-лимфоцитов, так и для В-лимфоцитов и в целом для всех лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR. Эти данные указывают на то, что при выношенной (без патологии плода) беременности уровень КП экспрессии HLA-DR в различных субпопуляциях женских лимфоцитов в СКЛ с ЭТС всегда ниже, чем тот же самый КП на мужских лимфоцитах. По отношению к контрольной мужской СКЛ соответствующая женская СКЛ всегда ниже, возможно, из-за ограничивающих клеточных взаимодействий внутри женских лимфоцитов.

В группе ПНБ эти же показатели имели отрицательное значение, что указывает на общую тенденцию более низких КП экспрессии HLA-DR на лимфоцитах в женских СКЛ по отношению к мужским. В то же время такие показатели, как ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж. $HLA-DR^+CD3^-$ и ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж. $HLA-DR^+$, были достоверно выше в группе ПНБ, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Эти данные показывают, что у женщин с репродуктивными потерями имело место снижение межклеточного ограничения регуляции мембранной экспрессии молекул HLA-DR при аллогенных взаимодействиях.

В семейных парах, имеющих детей с ВПС, КП экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах (фенотип $CD3^-/HLA-DR^+$) в СКЛ с ЭТС был выше, чем соответствующий КП в мужской СКЛ. Таким образом, в основной группе с ВПС клеточного ограничения регуляции экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах в СКЛ с ЭТС нет. В то же время по субпопуляции активных Т-лимфоцитов (фенотип $CD3^+/HLA-DR^+$) имело место выраженное снижение ЭКП в СКЛ с ЭТС как по отношению к контрольной группе ($p < 0,01$), так и к группе сравнения ($p < 0,01$). Такие значимые изменения клеточных ЭКП в ос-

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ (ПО ОТНОШЕНИЮ К КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ) ЭФФЕКТИВНЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ ПРИРОСТА ЖЕНСКИХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К МУЖСКИМ В ГРУППАХ С РЕПРОДУКТИВНЫМИ ПОТЕРЯМИ (ПНБ) И С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА (ВПС), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. COMPARATIVE ANALYSIS (IN RELATION TO THE CONTROL GROUP) OF EFFECTIVE COEFFICIENTS OF GROWTH OF FEMALE IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN RELATION TO MALES IN GROUPS WITH REPRODUCTIVE LOSSES AND CONGENITAL HEART DISEASES (CHD), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Иммунные предикторы Immune predictors	Контроль Control	Сравнение, ПНБ Comparison, HA	Основная, ВПС Main, CHD	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}
ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж. HLA-DR⁺CD3⁺ EGF MLS FBS female/male HLA-DR ⁺ CD3 ⁺	-103,6 (-169,6 – -37,6)	-47,5 (-227,3-132,4)	-555,1 (-1175,8-65,7)		$p < 0,01$	$p < 0,01$
ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж. HLA-DR⁺CD3⁻ EGF MLC FBS female/male HLA-DR ⁺ CD3 ⁻	-275,6 (-500,4 – -50,8)	-34,1 (-142,6-74,5)	53,2 (-40,4-146,5)	$p < 0,05$	$p < 0,01$	
ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж. HLA-DR⁺ EGF MLC FBS female/male HLA-DR ⁺	-251,5 (-459,9 – -43,1)	-15,3 (-90,3-59,6)	-121,1 (-269,8-27,7)	$p < 0,05$		
ЭКБ аутоcыв. женщ./муж. HLA-DR⁺CD3⁺ ECB auto female/male HLA-DR ⁺ CD3 ⁺	-99,8 (-306,1-106,4)	-886,7 (-2255,3-481,9)	1988,7 (-2041,3-6018,7)	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
ЭКБ аутоcыв. женщ./муж. HLA-DR⁺CD3⁻ ECB auto female/male HLA-DR ⁺ CD3 ⁻	-81,2 (-283,4-121,1)	246,1 (-18,5-510,7)	175,3 (-55,5-406,2)	$p < 0,01$	$p < 0,05$	
ЭКБ аутоcыв. женщ./муж. HLA-DR⁺ ECB auto female/male HLA-DR ⁺	-120,6 (-281,6-40,4)	95,1 (-247,4-437,6)	981,7 (-411,5-2374,8)	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,01$

Примечание. Представлены только достоверно значимые показатели. ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж. HLA-DR⁺CD3⁺ – эффективный коэффициент прироста экспрессии HLA-DR на активных женских Т-лимфоцитах в женской СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской; ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж. HLA-DR⁺CD3⁻ – эффективный коэффициент прироста экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах в женской СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской; ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж. HLA-DR⁺ – эффективный коэффициент прироста экспрессии HLA-DR на женских лимфоцитах в женской СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской; ЭКБ аутоcыв. женщ./муж. HLA-DR⁺CD3⁺ – эффективный коэффициент блокирования женской аутоcывороткой экспрессии HLA-DR на активных женских Т-лимфоцитах в женской паре СКЛ с аутоcывороткой и СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской паре СКЛ; ЭКБ аутоcыв. женщ./муж. HLA-DR⁺CD3⁻ – эффективный коэффициент блокирования женской аутоcывороткой экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах в женской паре СКЛ с аутоcывороткой и СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской паре СКЛ; ЭКБ аутоcыв. женщ./муж. HLA-DR⁺ – эффективный коэффициент блокирования женской аутоcывороткой экспрессии HLA-DR на женских лимфоцитах в женской паре СКЛ с аутоcывороткой и СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской паре СКЛ.

Note. Represented only significant indicators. EGF MLS FBS female/male HLA-DR⁺CD3⁺, effective growth factor of HLA-DR expression in active female T lymphocytes in female MLC with FBS relative to the corresponding male; EGF MLC FBS female/male HLA-DR⁺CD3⁻, effective growth factor of HLA-DR expression in female B lymphocytes in female MLC with FBS relative to the corresponding male; EGF MLC FBS female/male HLA-DR⁺, effective growth factor of HLA-DR expression in female lymphocytes in female MLC with FBS relative to the corresponding male; ECB autos female/male HLA-DR⁺CD3⁺, effective coefficient of blocking the expression of HLA-DR by female auto-serum on active female T lymphocytes in female MLC with auto-serum and MLC with FBS in relation to the corresponding male MLC pair; ECB auto female/male HLA-DR⁺CD3⁻, effective coefficient of blocking the expression of HLA-DR by female auto-serum on female B lymphocytes in female MLC with autosygotic and MLC with FBS in relation to the corresponding male MLC pair; ECB auto female/male HLA-DR⁺, effective coefficient of blocking the expression of HLA-DR by female auto-serum on female lymphocytes in female MLC with auto-serum and MLC with FBS in relation to the corresponding male MLC pair.

новой группе, возможно, и определяют ее в отдельный кластер по характеру иммунных взаимодействий в системе «мать—эмбрион/плод».

Оценивая блокирующий эффект женской сыворотки с позиции соответствующих контрольных показателей в мужских СКЛ, были выявлены принципиальные различия между сравниваемыми группами.

Как видно из таблицы 2, ЭКБ экспрессии HLA-DR на всех субпопуляциях лимфоцитов были отрицательными. Это означает, что при нормально выношенных беременностях КБ в женских СКЛ был намного выше, чем в мужских СКЛ. То есть присутствие женской ауто-сыворотки подавляет экспрессию HLA-DR только на женских лимфоцитах. Соответственно, с учетом внутреннего контроля по мужским СКЛ и КБ в них, можно считать, что женская ауто-сыворотка оказывает блокирующий эффект на аллогенные иммунные реакции при наличии соответствующей аллогенной сенсibilизации, что реализуется при физиологической беременности.

Группа ПНБ достоверно отличалась от контрольной по всем трем показателям ЭКБ. Так, ЭКБ ауто-сыв. женщ./муж. HLA-DR⁺CD3⁺ и ЭКБ ауто-сыв. женщ./муж. HLA-DR⁺ были положительными и достоверно выше, чем в группе контроля ($p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно). Показатель ЭКБ ауто-сыв. женщ./муж. HLA-DR⁺CD3⁺ был отрицательным и достоверно ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,01$). Разбалансированность блокирующих эффектов женской ауто-сыворотки на клеточные реакции (с учетом контроля по мужским СКЛ) может быть основой для формирования репродуктивных потерь.

В группе ВПС все анализируемые ЭКБ женской ауто-сыворотки были положительными. По этим показателям достигнуты достоверно значимые различия между основной и контрольной группами (табл. 2). Кроме того, по ЭКБ ауто-сыв. женщ./муж. HLA-DR⁺CD3⁺ и ЭКБ ауто-сыв. женщ./муж. HLA-DR⁺ были получены достоверно значимые различия между основной группой и группой сравнения ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно). Таким образом, в группе семей, имеющих детей с ВПС, женская ауто-сыворотка не ограничивает аллогенные по HLA-DR клеточные реакции женских лимфоцитов на мужские лимфоциты с учетом контрольных мужских СКЛ. С учетом клеточных ЭКП можно говорить об особенностях иммунных нарушений в системе «мать—эмбрион/плод» при формировании ВПС, которые выражаются в отсутствии клеточного ограничения регуляции экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах и отсутствии блокирующего эффекта женской ауто-сыворотки на аллогенные реакции лимфоцитов женщины в отношении мужских HLA-DR.

Для выявления иммунологических предикторов репродуктивных потерь и ВПС был проведен линейный регрессионный анализ по анализируемым показателям (табл. 3 и 4). В таблицах 3 и 4 представлены только достоверно значимые β -коэффициенты (отражают относительное влияние предиктора на зависимую переменную) и В-коэффициенты (отражают прогностическую значимость предиктора).

Выявлено, что в группе репродуктивных потерь с ПНБ имелся единственный достоверно значимый предиктор. Им оказался КБ женской

ТАБЛИЦА 3. МНОЖЕСТВЕННЫЙ ЛИНЕЙНЫЙ РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРЕДИКТОРОВ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ (ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ – ПНБ)

TABLE 3. MULTIPLE LINEAR REGRESSION ANALYSIS OF PREDICTORS OF REPRODUCTIVE LOSSES (HABITUAL ABORTION, HA)

Контроль/ПНБ Control/HA	β -коэффициент β coefficient	Стандартная ошибка β -коэффициента Standard error β coefficient	В-коэффициент B coefficient	Стандартная ошибка В-коэффициента Standard error B coefficient	р-уровень значимости p value
Свободный член Free member			0,824	0,147	0,002
КБ СКЛ ауто/ЭТС HLA-DR ⁺ CD3 ⁺ CB MLC auto/FBS HLA-DR ⁺ CD3 ⁺	-1,005	0,367	-0,004	0,001	0,041

Примечание. Представлены только достоверно значимые показатели. КБ СКЛ ауто/ЭТС HLA-DR⁺CD3⁺ – коэффициенты блокирования экспрессии HLA-DR женской ауто-сывороткой на женских CD3⁺ лимфоцитах в СКЛ с добавлением 10% женской ауто-сыворотки по отношению к СКЛ с ЭТС.

Note. Only significant figures are presented. CB MLC auto/FBS HLA-DR⁺CD3⁺, coefficients of blocking of HLA-DR expression by female auto-serum on female CD3⁺ lymphocytes in MCL with the addition of 10% of female auto-serum to MCL with FBS.

ТАБЛИЦА 4. МНОЖЕСТВЕННЫЙ ЛИНЕЙНЫЙ РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРЕДИКТОРОВ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА (ВПС)

TABLE 4. MULTIPLE LINEAR REGRESSION ANALYSIS OF PREDICTORS OF CONGENITAL HEART DISEASE (CHD)

Контроль/ВПС Control/HA	β -коэффициент β coefficient	Стандартная ошибка β -коэффициента Standard error β coefficient	В-коэффициент B coefficient	Стандартная ошибка В-коэффициента Standard error B coefficient	р-уровень значимости p value
Свободный член Free member			0,718	0,264	0,030
ЭКП СКЛ ЭТС женщ/муж HLA-DR ⁺ CD3 ⁻ ECG MLC FBS female/male HLA-DR ⁺ CD3 ⁻	1,119	0,609	0,001	0,001	0,039

Примечание. Представлены только достоверно значимые показатели. ЭКП СКЛ ЭТС женщ/муж HLA-DR⁺CD3⁻ – эффективный коэффициент прироста экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах в женской СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской.

Note. Only significant figures are presented. ECG MLC FBS female/male HLA-DR⁺CD3⁻, effective growth factor of HLA-DR expression in female B lymphocytes in female MLC with FBS relative to the corresponding male.

аутосывороткой экспрессии HLA-DR в СКЛ на женских Т-активированных лимфоцитах. Этот показатель имел отрицательное значение, что указывает на то, что чем ниже КБ для данной субпопуляции лимфоцитов, тем вероятнее развитие ПНБ в данной семейной паре. КБ для женских Т-активированных лимфоцитов, как и ЭКП для данной субпопуляции лимфоцитов, был достоверно ниже в группе с ПНБ, чем в контрольной группе.

Эффект выраженного подавления супрессорными факторами женской аутосыворотки аллогенной реактивности Т-активированных лимфоцитов может быть связан не только с эффекторными Т-лимфоцитами, но и с регуляторными субпопуляциями, что может лежать в основе патогенеза репродуктивных потерь.

Линейная регрессия по анализируемым иммунологическим показателям в группе ВПС выявила также единственный предиктор. Им оказался ЭКП экспрессии HLA-DR в женской СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской СКЛ на женских В-лимфоцитах. Показатель был положительным, и это указывало, что чем выше данный ЭКП, тем больше вероятность формирования ВПС в данной семейной паре. Следует отметить, что выше было показано достоверно значимое увеличение экспрессии HLA-DR на В-лимфоцитах в основной группе по сравнению с контрольной и увеличение этой экспрессии женской аутосывороткой.

Следовательно, полученные нами результаты указывают на то, что иммунологическое звено патогенеза ВПС связано с активацией гумораль-

ного иммунитета и развитием экссудативного воспаления.

Обсуждение

Иммунные нарушения в системе «мать-эмбрион/плод» являются важным звеном патогенеза репродуктивных потерь. Ключевыми клетками, определяющими вынашивание беременности, являются Т3-хелперные лимфоциты (Treg cell). Активация Treg cell в ранние сроки беременности объясняется влиянием на них прогестерона через соответствующий рецептор [16]. Доказана высокая экспрессия рецептора к прогестерону на мембране маточных Treg cell [16]. Кроме того, активация данных клеток связана со способностью распознавать эмбриональные HLA, экспрессируемые на полуаллогенном зародыше и эмбрионе [17]. Таким образом, ограничение цитотоксических и киллерных эффекторных иммунных ответов по отношению к полуаллогенному зародышу связано с клеточной регуляцией через сенсibilизированные Treg cell. Несмотря на то, что в настоящем исследовании напрямую не была определена роль этих лимфоцитов в торможении клеточных реакций материнских лимфоцитов против аллогенных по HLA супружеских лимфоцитов, тем не менее продемонстрировано, что уровень КП экспрессии HLA-DR в различных субпопуляциях женских лимфоцитов в СКЛ с ЭТС всегда ниже, чем тот же самый КП на мужских лимфоцитах. Как уже говорилось выше, именно аллогенный по HLA иммунный ответ мужских несенсибилизированных лимфоцитов на женские учитывали

как контроль, где, по-видимому, нет сенсibilизированных Treg cell. Проведенные исследования показали, что ЭКП по клеточным реакциям для всех субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR в контрольной группе, имели всегда отрицательные значения и достигали минус 500%. При невынашивании ранних сроков беременности средние значения ЭКП клеточных реакций достоверно превышали показатели контрольной группы и находились как в отрицательных, так и в положительных интервалах. Эти данные демонстрировали нарушения клеточной регуляции при репродуктивных потерях, в частности ограничение иммунных реакций на аллогенные HLA, в том числе и через Treg cell.

Другой часто обсуждаемый вопрос в сфере иммунологии репродукции связан с ролью женских гуморальных факторов, ограничивающих отторжение плода [2, 3]. С 80-х годов прошлого столетия активно изучалась роль материнских антител к HLA в вынашивании и невынашивании беременности. Было неоднократно показано, что многорожавшие женщины имеют высокий титр этих антител. Однако рядом авторов выявлены положительные ассоциативные связи между уровнями материнских антител к HLA супруга и репродуктивными потерями [3]. С этих позиций остается открытым вопрос о роли антител к HLA в поддержании беременности.

Проведенное исследование показало, что в контрольной группе в женской сыворотке отсутствуют факторы, блокирующие аллогенные по HLA-DR иммунные реакции мужских лимфоцитов на женские лимфоциты. Это было продемонстрировано при сравнении мужских СКЛ с 10% женской аутосывороткой и СКЛ с ЭТС. В то же время при сравнении соответствующих СКЛ «женщина против мужчины» в контрольной группе для разных субпопуляций лимфоцитов обнаруживался как блокирующий, так и активирующий эффекты. В представленной модели маловероятно, что эффекты изменения экспрессии HLA-DR на различных субпопуляциях лимфоцитов в СКЛ связаны с антителами к ауто-HLA-DR. Не исключено, что подавление экспрессии HLA-DR на В-лимфоцитах женской аутосывороткой обусловлено наличием в ней аутоиммунных антител с собственным HLA-DR. Эффект женской аутосыворотки на экспрессию HLA-DR в женских субпопуляциях лимфоцитов, предположительно, связан с преимущественным праймингом Т2- и Т3-хелперных лимфоцитов и секретируемых ими интерлейкинов. Ранее было показано, что в первый триместр беременности в системном и локальном иммунитете домини-

руют медиаторные маркеры Т2- и Т3-хелперного иммунного ответа (IL-4, IL-3, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14, TGF- β), что позволяет выносить беременность на данном сроке [18]. Именно IL-10 подавляет экспрессию HLA-DR на всех субпопуляциях лимфоцитов, в том числе и на В-лимфоцитах, супрессорной функцией обладает и TGF- β [5]. Стимулировать экспрессию HLA-DR на активированных Т-лимфоцитах за счет аутокринного эффекта может IL-3 [5, 19]. Соответственно, у женщин, выносивших две и более беременности, этот клеточный сдвиг в регуляторных лимфоцитах с секрецией соответствующих интерлейкинов сохраняется. При репродуктивных потерях изменяется вектор клеточной регуляции и интерлейкиновый статус. Как видно из исследования, не обнаружено эффекта активации экспрессии HLA-DR на активированных Т-лимфоцитах, а подавление этой экспрессии на В-лимфоцитах носило выраженный характер. Отсутствие блокирующего эффекта и, напротив, присутствие активирующего действия гуморальных сывороточных женских факторов на активированные женские Т-лимфоциты стало важным интегральным значением для диагностики иммунных причин репродуктивных потерь, которое также было ранее продемонстрировано в краткосрочной СКЛ [12, 20]. Именно для этого иммунного показателя была выявлена достоверно значимая отрицательная ассоциативная связь с невынашиванием беременности.

Формирование спорадических врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний связывают с нарушенными иммунными взаимодействиями в системе «мать—эмбрион». Эмбриогенез сердца приходится на 3-7 неделю гестации, когда сохраняется контакт материнского иммунного микроокружения с тканями эмбриона, а выраженность аллогенных иммунных реакций может индуцировать дисэмбриогенез. Было продемонстрировано, что у женщин, родивших детей с ВПС, имело место нарушение клеточной регуляции В-лимфоцитов при аллоиммунных взаимодействиях. Это проявилось в том, что в основной группе ЭКП экспрессия HLA-DR на В-лимфоцитах в сравниваемых СКЛ была положительной, в то время как в контрольной группе имела отрицательное значение. Исследование активности женской аутосыворотки в группе с ВПС показало ее активирующее значение на все субпопуляции женских лимфоцитов, участвующих в аллогенных реакциях по HLA. Рассматривая эту ситуацию с позиции особенностей сдвига в регуляторных лимфоцитах, можно предположить, что у женщин, родивших детей с ВПС, до-

минируют не Т3-хелперные лимфоциты, способные вырабатывать IL-10 и TGF- β , а Т2-хелперные лимфоциты, синтезирующие IL-13, IL-4, IL-14 и IL-3. Именно эти цитокины могут увеличивать экспрессию HLA-DR на В-лимфоцитах и активированных Т-лимфоцитах. Одним из клинических эффектов этой стимуляции будет нарастание гуморальных факторов, вмешивающихся в эмбриогенез сердца и нарушающих его.

Заключение

В краткосрочной смешанной культуре лимфоцитов могут отражаться как клеточные, так и гуморальные регуляторные эффекты, индуцированные аллогенным взаимодействием лим-

фоцитов супругов. С этих позиций использование краткосрочной СКЛ с оценкой экспрессии HLA-DR на различных суопопуляциях лимфоцитов совместно с исследованием продуцируемых ими цитокинов может дать новые знания о патогенезе репродуктивных потерь и спорадических врожденных пороках сердца без хромосомных заболеваний. Кроме того, краткосрочная смешанная культура лимфоцитов супруга может быть эффективной заменой классической СКЛ, используемой для выявления иммунных причин репродуктивных потерь. Исследование ЭКП и ЭКБ позволит выявлять нарушения в клеточной и гуморальной регуляции иммунных взаимодействий матери и полуаллогенного по HLA эмбриона/плода.

Список литературы / References

1. Беленкова О.В., Мозес В.Г., Шабалдин А.В., Шабалдина Е.В. Характер аллогенных взаимодействий супругов в кратковременной смешанной культуре при иммунных формах репродуктивных потерь // Журнал теоретической и клинической медицины (Узбекистан), 2014. Т. 3, № 1. С. 219-222. [Belenkova O.V., Mozes V.G., Shabaldin A.V., Shabaldina E.V. The nature of allogenic interactions of spouses in a short-term mixed culture with immune forms of reproductive losses. *Zhurnal teoriticheskoy i klinicheskoy meditsiny (Uzbekistan) = Journal of Theoretical and Clinical Medicine (Uzbekistan)*, 2014, Vol. 3, no. 1, pp. 219-222. (In Russ.)]
2. Гагиева И.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И. Роль нарушений продукции цитокинов в генезе плацентарной недостаточности и ранних репродуктивных потерь // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 6. С. 539-550. [Gazieva I.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I. Role of cytokine production disorders in genesis of placental insufficiency and early reproductive losses. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 6, pp. 539-550. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-6-539-550.
3. Самбур М.Б. Способ оценки взаимодействия лимфоцитов *in vitro*, основанный на определении их розеткообразующей способности // Иммунология, 1991. № 2. С. 30-33. [Sambur M.B. A method for evaluating the interaction of lymphocytes *in vitro*, based on the determination of their rosette-forming ability. *Immunologiya = Immunology*, 1991, no. 2, pp. 30-33. (In Russ.)]
4. Сепиашвили Р.И. Функциональная система иммунного гомеостаза // Аллергология и иммунология, 2015. Т. 16, № 1. С. 91-100. [Sepiashvili R.I. The functional system of immune homeostasis. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2015, Vol. 16, no. 1, pp. 91-100. (In Russ.)]
5. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Кофиади И.А. Роль иммуногенетики в решении фундаментальных и прикладных задач персонализированной медицины // Медицина экстремальных ситуаций, 2016. Т. 3, № 57. С. 9-24. [Khaitov R.M., Alekseev L.P., Kofiadi I.A. Role of immunogenetics in addressing fundamental and applied tasks of personalized medicine. *Meditsina ekstremalnykh situatsiy = Medicine of Extreme Situations*, 2016, Vol. 3, no. 57, pp. 9-24. (In Russ.)]
6. Чистякова Г.Н., Шабалдин А.В., Беленкова О.В., Мозес В.Г., Матвеева В.Г., Шабалдина Е.В., Ремизова И.И., Гагиева И.А. Патент РФ № 2581925 «Способ определения аллогенного иммунного ответа в кратковременной смешанной культуре лимфоцитов неродственных доноров». [Chistyakova G.N., Shabaldin A.V., Belenkova O.V., Mozes V.G., Matveeva V.G., Shabaldina E.V., Remizova I.I., Gazieva I.A. Patent No. 2581925 "A method for determining the allogeneic immune response in a short-term mixed culture of lymphocytes from unrelated donors"].
7. Шабалдин А.В., Мозес В.Г., Беленкова О.В., Шабалдина Е.В. Патент РФ № 2585091 «Способ определения антител к аллогенным HLA-G». [Shabaldin A.V., Mozes V.G., Belenkova O.V., Shabaldina E.V. Patent No. 2585091 "Method for the determination of antibodies to allogeneic HLA-G"].
8. Ширшев С.В. Гормональные механизмы регуляции иммунной системы в период беременности // Успехи современной биологии, 2005. № 6. С. 555-566. [Shirshov S.V. Hormonal mechanisms of the immune system regulation in pregnancy. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2005, no. 6, pp. 555-566. (In Russ.)]
9. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 740 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 740 p.

10. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev. Immunol.*, 2013, no. 31, pp. 387-411.
11. García-Enguános A., Calle M.E., Valero J., Luna S., Dominguez-Rojas V. Risk factors in miscarriage and malformation: a review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2002, Vol. 102, no. 2, pp. 111-119.
12. Ganu R.S., Harris R.A., Collins K., Aagaard K.M. Early origins of adult disease: Approaches for investigating the programmable epigenome in humans, nonhuman primates, and rodents. *ILAR J.*, 2012, Vol. 53, no. 3-4, pp. 306-321.
13. Inada K., Shima T., Nakashima A. Characterization of regulatory T cells in decidua of miscarriage cases with abnormal or normal fetal chromosomal content. *J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 97, no. 1, pp. 104-111.
14. Liddy K.A., White M.Y., Cordwell S.J. Functional decorations: post-translational modifications and heart disease delineated by targeted proteomics. *Genome Med.*, 2013, Vol. 5, no. 2, p. 20.
15. Koichi I., Tadao T., Norio T. Possible mechanisms of immunotherapy for maintaining pregnancy in recurrent spontaneous aborters: analysis of anti-idiotypic antibodies directed against autologous T-cell receptors. *Hum. Reprod.*, 1999, Vol. 14, no. 3, pp. 650-655.
16. Miranda S., Litwin S., Barrientos G. Dendritic cells therapy confers a protective microenvironment in murine pregnancy. *Scand. J. Immunol.*, 2006, Vol. 64, no. 5, pp. 493-499.
17. Mjosberg J., Berg G., Jenmalm M.C., Ernerudh J. FOXP3⁺ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy deciduas. *Biol. Reprod.*, 2010, Vol. 82, no. 4, pp. 698-705.
18. Morin-Papunen L., Tiilikainen A., Hartikainen-Sorri A.L. Maternal HLA immunization during pregnancy: presence of anti HLA antibodies in half of multigravidous women. *Med. Biol.*, 1984, Vol. 62, no. 6, pp. 323-325.
19. Oyama K., El-Nachef D., Zhang Y., Sdek P., MacLellan W.R. Epigenetic regulation of cardiac myocyte differentiation. *Frontiers in Genetics*, no. 5, p. 375.
20. Robertson S.A., Prins J.R., Sharkey D.J., Moldenhauer L.M. Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 69, no. 4, pp. 315-303.

Авторы:

Шабалдин А.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Шмелевич С.А. — заведующая детским отделением ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

Чистякова Г.Н. — д.м.н., профессор, руководитель научного отдела иммунологии клинической микробиологии, врач клинической лабораторной диагностики высшей категории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Ремизова И.И. — к.б.н., старший научный сотрудник отделения иммунологии и микробиологии, биолог высшей категории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Лукоянычева Е.Б. — заведующая иммунологической лабораторией ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровская областная клиническая больница», г. Кемерово, Россия

Горшкова С.В. — лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Шабалдина Е.В. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой оториноларингологии и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Authors:

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shmulevich S.A., Head, Pediatric Department, Kemerovo L. Barbarash Cardiological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Chistyakova G.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Research Department of Immunology and Clinical Microbiology, Research Institute of Maternity and Infancy Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Remizova I.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology and Microbiology, Research Institute of Maternity and Infancy Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Lukoyanycheva E.B., Head, Laboratory of Immunology, Regional Hospital, Kemerovo, Russian Federation

Gorshkova S.V., Laboratory Assistant, Laboratory of Cell Technology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shabaldina E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Otolaryngology and Clinical Immunology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 10.04.2018

Отправлена на доработку 11.04.2018

Принята к печати 30.05.2018

Received 10.04.2018

Revision received 11.04.2018

Accepted 30.05.2018

СВЯЗЬ HLA-ГАПЛОТИПОВ С РАЗВИТИЕМ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ В УСЛОВИЯХ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Карзакова Л.М.¹, Мучукова О.М.¹, Борисова Л.В.², Кудряшов С.И.¹

¹ ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Чебоксары, Россия

² БУ «Республиканский эндокринологический диспансер» Министерства здравоохранения Чувашии, г. Чебоксары, Россия

Резюме. Одной из актуальных проблем современной медицины является поиск генетических маркеров хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). В этой связи целью настоящего исследования явилось изучение связи HLA-гаплотипов с ХОБЛ у лиц, заболевание которых развилось в процессе профессиональной деятельности в цехе кремнийорганического производства ПАО «Химпром» (г. Новочебоксарск, Россия). В исследование включены больные ХОБЛ в стадии ремиссии, принадлежащие чувашской этнической группе России – 36 женщин и 26 мужчин (средний возраст – 45,4±2,3 года). Стаж работы составил в среднем 15,2±2,4 года, продолжительность ХОБЛ – 12,3±2,4 года. Курящие составляли 22,0±5,8% от общего числа больных. Группой сравнения служила когорта здоровых работников кремнийорганического производства. Типирование HLA-антигенов класса I проводили в стандартном микролимфоцитотоксическом тесте с использованием гистотипирующих анти-HLA-сывороток к 8 антигенам HLA-A локуса (A1, A2, A3, A9, A10, A11, A19, A28) и 18 антигенам HLA-B локуса (B5, B7, B8, B12, B13, B14, B15, B16, B17, B18, B21, B22, B27, B35, B40, B41, B42, B53) (ЗАО «Межрегиональный центр иммуногенетики и гистотипирующих реагентов «Гисанс», Санкт-Петербург). HLA-генотипирование аллелей класса II проводили методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в ДНК, полученной из ядерных клеток периферической крови, с использованием наборов реагентов НПФ «ДНК-Технология» (Москва), по методике производителя реагентов. Типировали по 14 аллелям локуса DRB1, 8 аллелям DQA1 и 11 аллелям DQB1. Частоты двухлокусных гаплотипов рассчитывали с использованием компьютерной программы Arlequin v. 3.01. Силу ассоциации HLA с ХОБЛ определяли с помощью величины относительного риска (ОР) по формуле J. Haldane. Статистическую достоверность отличия ОР от 1 определяли по точному двустороннему критерию Фишера. В результате проведенного исследования установлена положительная ассоциация ХОБЛ с гаплотипами: HLA-A9-DQA1*0501, A10-DQA1*0103, A28-DQA1*0102, B7-DQA1*0103. Данные гаплотипы можно отнести к генетическим маркерам предрасположенности к развитию ХОБЛ. Отрицательная ассоциация с заболеванием установлена для гаплотипических сочетаний аллелей HLA-A2-B8, A19-DQB1*0502-04, B12-DQB1*0502-04, B27-DQA1*0103, DRB1*01-DQA1*0101, DRB1*07-DQA1*0201, DRB1*13-DQA1*0102. Данный ряд гаплотипов можно

Адрес для переписки:

Карзакова Луиза Михайловна
ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» Министерства науки и высшего образования РФ
428015, Россия, г. Чебоксары, Московский пр., 15.
Тел.: 8 (903) 358-82-89.
E-mail: luizak58@mail.ru

Address for correspondence:

Karzakova Louise M.
I. Ulyanov Chuvash State University
428015, Russian Federation, Cheboksary, Moskovsky ave, 15.
Phone: 7 (903) 358-82-89.
E-mail: luizak58@mail.ru

Образец цитирования:

Л.М. Карзакова, О.М. Мучукова, Л.В. Борисова, С.И. Кудряшов «Связь HLA-гаплотипов с развитием хронической обструктивной болезни легких в условиях кремнийорганического производства» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 293–302.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-293-302

© Карзакова Л.М. и соавт., 2019

For citation:

L.M. Karzakova, O.M. Muchukova, L.V. Borisova, S.I. Kudryashov "Association between HLA haplotypes and risk of chronic obstructive pulmonary disease under the conditions of the silicon manufacturing facility", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 293–302. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-293-302

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-293-302

отнести к разряду протективных генетических маркеров ХОБЛ в условиях кремнийорганического производства. Результаты проведенного исследования свидетельствуют об ассоциации ХОБЛ с рядом определенных HLA-гаплотипов.

Ключевые слова: HLA-гаплотипы, хроническая обструктивная болезнь легких

ASSOCIATION BETWEEN HLA HAPLOTYPES AND RISK OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE UNDER THE CONDITIONS OF THE SILICON MANUFACTURING FACILITY

Karzakova L.M.^a, Muchukova O.M.^a, Borisova L.V.^b, Kudryashov S.I.^a

^a I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

^b Republican Dispensary for Clinical Endocrinology, Cheboksary, Russian Federation

Abstract. A search for genetic markers of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the urgent problems in modern medicine. The aim of the present study was to investigate the relationships between HLA haplotypes and COPD incidence among individuals whose illness developed during their professional work at the organic-silicon production facility of the PJSC “Khimprom” plant (Novocheboksarsk, Russia). The study included patients with COPD in remission, belonging to the Chuvash ethnic group of Russian Federation, i.e., 36 women and 26 men (mean age 45.4 ± 2.3 years). Their labor experience at the plant averaged 15.2 ± 2.4 years, with COPD duration of 12.3 ± 2.4 years. Smokers made up $22.0 \pm 5.8\%$ of the total number of patients. A cohort of healthy workers from the same silicon facility served as a comparison group, being specified as a “COPD-resistant” cohort. Class I HLA antigens were typed in the standard microlymphocytotoxic test using histotyping with anti-HLA sera to 8 HLA-A antigens of the A1, A2, A3, A9, A10, A11, A19, A28 locus, and to 18 HLA-B antigens of B5, B7, B8, B12, B13, B14, B15, B16, B17, B18, B21, B22, B27, B35, B40, B41, B42, B53 locus (CJSC “Interregional Center of Immunogenetics and Histotyping Reagents “Gisans”, St. Petersburg). HLA genotyping of class II alleles was carried out by the multi-primer DNA PCR technique. DNA was obtained from peripheral blood leukocytes with reagent kits by “DNA-Technology” (Moscow), according to the reagent manufacturer’s method. The genotyping was performed for 14 alleles of DRB1 locus; 8 alleles of DQA1, and 11 alleles for the DQB1 locus. The frequencies of the paired-locus haplotypes were calculated using the computer program “Arlequin v. 3.01”. The association strength of HLA with COPD was determined by the relative risks (RR) according to the J.Haldane equation. Statistical significance of the differences between RR and 1 was determined by the two-sided exact Fisher test. As a result of this study, the positive association of COPD was established with the following haplotypes: HLA-A9-DQA1*0501, A10-DQA1*0103, A28-DQA1*0102, B7-DQA1*0103. These haplotypes may be suggested as genetic predisposal markers for the development of COPD. Negative associations with occurrence of the disease were revealed for the haplotypic combinations of HLA-A2-B8, A19-DQB1*0502-04, B12-DQB1*0502-04, B27-DQA1*0103, DRB1*01-DQA1*0101, DRB1*07-DQA1*0201, and DRB1*13-DQA1*0102 alleles. These haplotypes can be attributed to the category of protective genetic markers for COPD incidence among workers of organic-silicon manufacture. Further research is needed in our upcoming studies in order to identify the “marker” HLA haplotypes for COPD in other ethnic populations, as well as under the influence of other aggressive air pollutants. The results of this study indicate to potential association of COPD with a number of specific HLA-haplotypes.

Keywords: HLA haplotypes, chronic obstructive pulmonary disease

Введение

Изучение этиологических и патогенетических факторов хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) остается одной из острых проблем современной медицины в связи с растущей распространенностью данного заболевания во всем мире (4,8% населения земного шара имеет диагностированную ХОБЛ), инвалидизацией

больных в молодом возрасте и значимым влиянием на общую смертность населения во всем мире [16]. Согласно международному стратегическому документу по ХОБЛ – GOLD в редакции от 2017 г., «ХОБЛ является общей, поддающейся профилактике и лечению болезнью, которая характеризуется постоянными респираторными симптомами и ограничением воздушного потока, обусловленными поражением дыхатель-

ных путей и/или альвеолярными аномалиями вследствие воздействия повреждающих частиц или газов» [17]. В основе развития ХОБЛ лежит атипичное аутоиммунное воспаление респираторного тракта и паренхимы легких, эмфизема легких и нарушение бронхиальной проходимости, вызванные табакокурением, вдыханием воздушных поллютантов — продуктов сгорания топлива или профессионального производства [14, 15]. В последние годы много внимания уделялось изучению влияния табачного дыма на патогенез ХОБЛ [9, 12], в то время как исследование влияния профессиональных факторов на развитие данного заболевания оставалось долгими годами в тени. Мы обратили внимание на то, что профессиональная деятельность в условиях кремнийорганического производства вызывает у большинства работников различные респираторные синдромы, предрасполагая к развитию ХОБЛ. Кремнийсодержащие соединения — органохлорсиланы, используемые для производства кремнийорганических полимеров («силиконов»), обладают чрезвычайно агрессивным действием на слизистые оболочки глаз и дыхательных путей [6]. Однако значительная часть работников кремнийорганического производства, имея респираторные симптомы, не заболевает ХОБЛ. Данный факт может служить основанием для предположения о том, что ХОБЛ развивается лишь у предрасположенных к заболеванию лиц. Единственная хорошо изученная на сегодня генетическая патология, ведущая к развитию данного заболевания — это дефицит α_1 -антитрипсина [7]. На роль генов восприимчивости к ХОБЛ могут претендовать аллели HLA (Human Leukocyte Antigens). В 2011 г. были опубликованы Брыляевой Е.В. и соавт. результаты изучения ассоциации ХОБЛ с аллельными генами локусов HLA класса II [2]. Результаты проведенного нами исследования не позволили подтвердить установленные данными авторами HLA-ассоциации ХОБЛ [4]. Крупномасштабные метааналитические исследования, проведенные в разных иммуногенетических центрах мира, показали, что лишь половина результатов изучения ассоциаций болезней с аллелями HLA воспроизводится в повторных исследованиях, и исследования на уровне аллелей генов не позволяют установить истинные HLA-ассоциации болезней. Для этих целей более эффективным является изучение гаплотипических маркеров заболеваний [11], чем и продиктована **цель настоящего исследования** — изучение ассоциации ХОБЛ с HLA-гаплотипами.

Материалы и методы

Нами проведено изучение связи сцепленных аллельных генов HLA класса I и класса II

с ХОБЛ у лиц, заболевание которых развилось в процессе профессиональной деятельности в цехе кремнийорганического производства ПАО «Химпром» (г. Новочебоксарск, Россия). В исследование включены больные ХОБЛ в стадии ремиссии — 36 женщин ($58,06 \pm 6,27\%$) и 26 мужчин ($41,94 \pm 6,27\%$) в возрасте 34–66 лет (средний возраст — $45,4 \pm 2,3$ года). Стаж работы составил в среднем $15,2 \pm 2,4$ года, продолжительность ХОБЛ — $12,3 \pm 2,4$ года. Курящие составляли $22,0 \pm 5,8\%$ от общего числа больных. У 13 пациентов ($20,97 \pm 5,17\%$) отмечалось наличие ХОБЛ среди близких родственников. Группой сравнения служила когорта не болеющих ХОБЛ работников кремнийорганического производства. Данная группа позиционировалась как «устойчивая» к развитию ХОБЛ. В нее вошли 36 женщин ($54,55 \pm 6,13\%$) и 30 мужчин ($45,45 \pm 6,13\%$), среди которых было $21,0 \pm 6,6\%$ курящих. Средний возраст данной когорты обследованных лиц составил $43,5 \pm 2,1$ года, стаж работы — $17,2 \pm 4,3$ года. Сформированные группы были однородны по половому, возрастному составу, продолжительности работы на химическом производстве, стажу курения. С целью исключения этнических различий в обследуемые группы отбирались лишь коренные жители Чувашии, предки которых, как минимум в трех последних поколениях, принадлежали к чувашской этнической популяции.

Типирование HLA-антигенов класса I проводили в стандартном микролимфоцитотоксическом тесте [3] с использованием гистотипирующих анти-HLA-сывороток к 8 антигенам HLA-A локуса (A1, A2, A3, A9, A10, A11, A19, A28) и 18 антигенам HLA-B локуса (B5, B7, B8, B12, B13, B14, B15, B16, B17, B18, B21, B22, B27, B35, B40, B41, B42, B53) (ЗАО «Межрегиональный центр иммуногенетики и гистотипирующих реагентов «Гисанс», Санкт-Петербург).

HLA-генотипирование аллелей класса II проводили методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в ДНК, полученной из ядерных клеток периферической крови, с использованием наборов реагентов НПФ «ДНК-Технология» (Москва), по методике производителя реагентов. Типировали по 14 аллелям локуса DRB1, 8 аллелям DQA1 и 11 аллелям DQB1.

Статистическую обработку проводили с использованием компьютерных программ Statistica v. 10.0 и Arlequin v. 3.01. При этом определяли частоты гаплотипов (H) и величины неравновесного сцепления (D). Силу ассоциации HLA-антигенов с ХОБЛ определяли с помощью величины относительного риска (OR), которую высчитывали по модифицированной формуле J. Haldane для малых выборок [5]. Достоверность ассоциации (p), различия в частоте распростра-

нения гаплотипов в группах обследованных оценивали по точному двустороннему тесту Фишера без корректировки на количество аллелей.

Результаты

Анализ гаплотипов локусов А-В (класс I) позволил выявить у больных ХОБЛ один характерный гаплотип, у устойчивых к ХОБЛ работников — 5 гаплотипических сочетаний (табл. 1).

Выраженность ассоциации обнаруженных А-В гаплотипов с ХОБЛ определялась по вели-

чине ОР. В результате установлена статистически значимая отрицательная ассоциация HLA-A2-B8 с ХОБЛ (табл. 2).

В ходе изучения сцепленности аллелей локусов HLA класса I и класса II было выявлено 11 вариантов статистически значимых двухлокусных гаплотипов у больных ХОБЛ и 9 у устойчивых к ХОБЛ лиц (табл. 3). При этом оказалось, что 2 гаплотипических сочетания — HLA-A9-DQB1*0301 и B35-DQA1*0301 — присущи для обеих групп исследованных лиц. Специфичными для груп-

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТЫ ГАПЛОТИПОВ HLA-A-B И ВЕЛИЧИНЫ НЕРАВНОВЕСНОГО СЦЕПЛЕНИЯ У РАБОТНИКОВ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

TABLE 1. THE FREQUENCIES OF HLA-A-B HAPLOTYPES AND THE VALUES OF NONEQUILIBRIUM COUPLING IN WORKERS OF ORGANIC-SILICON PRODUCTION

HLA-гаплотип HLA haplotype	Больные ХОБЛ Patients with COPD (n = 62)	Устойчивые к ХОБЛ Resistant to COPD (n = 66)
A2-B40	476,0 270,0*	-
A3-B7	—	671,9 351,8***
A11-B7	—	448,6 219,0*
A2-B8	—	1059,9 374,4*
A2-B12	—	1059,9 374,4*
A9-B22	—	480,7 205,0*

Примечание. В верхней строке каждой ячейки таблицы — частота гаплотипа ($H \times 10000$), в нижней строке — величина неравновесного сцепления ($D \times 10000$); * — $p_{F2} < 0,05$; *** — $p_{F2} < 0,001$ — достоверность различия по двустороннему точному методу Фишера для четырехпольных таблиц.

Note. In the top line of each cell of the table — the frequency of the haplotype ($H \times 10000$), on the bottom line — the value of the nonequilibrium cohesion ($D \times 10000$); *, $p_{F2} < 0.05$; ***, $p_{F2} < 0.001$, reliability of the difference in the two-sided exact Fisher method for four-field tables.

ТАБЛИЦА 2. АССОЦИАЦИИ HLA-ГАПЛОТИПОВ ЛОКУСОВ А-В С ХОБЛ

TABLE 2. ASSOCIATION OF HLA HAPLOTYPES OF LOCI A-B WITH COPD

HLA-гаплотип HLA haplotype	Частота гаплотипа Haplotype frequency		ОР* RR*	1/ОР 1/RR	P _F
	Больные ХОБЛ Patients with COPD (n = 62)	Устойчивые к ХОБЛ Resistant to COPD (n = 66)			
A2-B40	4	2	1,560	0,64	NS**
A3-B7	2	6	0,430	2,32	NS
A11-B7	2	4	0,520	1,92	NS
A2-B8	0	8	0,059	16,90	< 0,01
A2-B12	2	8	0,260	3,84	NS
A9-B22	0	4	0,130	7,69	NS

Примечание. * — относительный риск; ** — различие не достоверно ($p_F > 0,05$).

Note. *, relative risk; **, the difference is not reliable ($p_F > 0.05$).

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТЫ HLA-ГАПЛОТИПОВ ЛОКУСОВ КЛАССА I, КЛАССА II И ВЕЛИЧИНЫ НЕРАВНОВЕСНОГО СЦЕПЛЕНИЯ У РАБОТНИКОВ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

TABLE 3. THE FREQUENCIES OF HLA HAPLOTYPES OF LOCI OF CLASS I, CLASS II AND THE VALUE OF NONEQUILIBRIUM COHESION IN WORKERS OF ORGANIC-SILICON PRODUCTION

HLA-гаплотип HLA haplotype	Больные ХОБЛ Patients with COPD (n = 48)	Устойчивые к ХОБЛ Resistant to COPD (n = 38)
A3-DQA1*0301	1340 865*	–
A9-DQA1*0501	2362 1078*	–
A9-DQB1*0301	2094 1131*	1065 767*
A10-DQA1*0103	621 500*	–
A11-DQA1*0103	–	541 496*
A19-DQA1*0102	–	823 654*
A19-DQB1*0502-04	–	823 681*
A28-DQA1*0102	–	646 511*
B5-DQA1*0103	426 379*	–
B7-DQA1*0103	646 575**	–
B7-DQB1*0601	420 379**	–
B8-DQA1*0103	541 481*	–
B12-DQB1*0502-04	–	823 681*
B22-DQA1*0102	–	823 654*
B27-DQA1*0103	–	541 512**
B35-DQA1*0301	1102 712*	823 707*
B35-DQB1*0302	426 389*	–
B53-DQB1*0302	426 408**	–

Примечание. В верхней строке каждой ячейки таблицы – частота гаплотипа (H × 10000), в нижней строке – величина неравновесного сцепления (D × 10000); * – $p_{F2} < 0,05$; ** – $p_{F2} < 0,01$ – достоверность различия по двустороннему точному методу Фишера для четырехпольных таблиц.

Note. in the top line of each cell of the table – the frequency of the haplotype (H × 10000), on the bottom line – the value of the nonequilibrium cohesion (D × 10000); *, $p_{F2} < 0.05$; **, $p_{F2} < 0.01$, reliability of the difference in the two-sided exact Fisher method for four-field tables.

ТАБЛИЦА 4. АССОЦИАЦИИ HLA-ГАПЛОТИПОВ ЛОКУСОВ КЛАССА I И КЛАССА II С ХОБЛ

TABLE 4. ASSOCIATION OF HLA HAPLOTYPES OF LOCI OF CLASS I AND CLASS II WITH COPD

HLA-гаплотип HLA haplotype	Частота гаплотипа Haplotype frequency		ОР* RR*	1/ОР 1/RR	P _f
	Больные ХОБЛ Patients with COPD (n = 48)	Устойчивые к ХОБЛ Resistant to COPD (n = 38)			
A3-DQA1*0301	12	4	2,72	0,37	NS**
A9-DQA1*0501	20	4	5,83	0,17	0,017
A9-DQB1*0301	18	8	2,75	0,36	NS
A10-DQA1*0103	6	0	9,98	0,10	0,040
A11-DQA1*0103	2	4	0,42	2,38	NS
A19-DQA1*0102	4	6	0,73	1,37	NS
A19-DQB1*0502-04	0	6	0,07	14,30	0,009
A28-DQA1*0102	6	0	9,00	0,11	0,040
B5-DQA1*0103	4	0	7,59	0,13	NS
B7-DQA1*0103	6	0	9,62	0,10	0,040
B7-DQB1*0601	4	0	6,31	0,16	NS
B8-DQA1*0103	2	4	0,39	2,56	NS
B12-DQB1*0502-04	0	6	0,05	20,00	0,009
B22-DQA1*0102	2	6	0,31	3,22	NS
B27-DQA1*0103	0	4	0,10	9,90	0,043
B35-DQA1*0301	10	6	1,79	0,56	NS
B35-DQB1*0302	4	0	7,22	0,14	NS
B53-DQB1*0302	4	0	7,78	0,13	NS

Примечание. * – относительный риск, ** – различие не достоверно ($p_f > 0,05$).

Note. *, relative risk; **, the difference is not reliable ($p_f > 0.05$).

пы больных были гаплотипы A3-DQA1*0301, A9-DQA1*0501, A10-DQA1*0103, B5-DQA1*0103, B7-DQA1*0103, B7-DQB1*0601, B8-DQA1*0103, B35-DQB1*0302 и B53-DQB1*0302, а для устойчивых к ХОБЛ лиц – A11-DQA1*0103, A19-DQA1*0102, A19-DQB1*0502-04, A28-DQA1*0102, B12-DQB1*0502-04, B22-DQA1*0102 и B27-DQA1*0103.

При оценке величины ОР для обнаруженных гаплотипических сочетаний достоверными оказались ассоциации с ХОБЛ 7 гаплотипов (табл. 4). При этом значения ОР для 4 гаплотипических сочетаний (A9-DQA1*0501, A10-DQA1*0103, A28-DQA1*0102, B7-DQA1*0103) оказались выше 1. Другие 3 гаплотипа (A19-DQB1*0502-04, B12-DQB1*0502-04, B27-DQA1*0103) имели значения ОР меньше 1.

В результате исследования наличия статистически значимой сцепленности аллелей локусов HLA класса II – DRB1 и DQA1 (табл. 5) выявлены характерные гаплотипы для больных ХОБЛ (DRB1*11-DQA1*0501 и DRB1*15-DQA1*0102) и для устойчивых к заболеванию лиц (DRB1*01-DQA1*0101, DRB1*07-DQA1*0201, DRB1*13-DQA1*0102, DRB1*14-DQA1*0101, DRB1*15-DQA1*0103 и DRB1*17).

Из аллельных сочетаний локусов DRB1 и DQB1 для больных ХОБЛ было присуще присутствие гаплотипа HLA-DRB1*15-DQB1*0601. Для группы устойчивых к ХОБЛ работников кремнийорганического производства был специфичным гаплотип DRB1*14-DQB1*0502-04.

Что касается сочетаний HLA-аллелей локусов DQA1 и DQB1, не было выявлено ни одного

ТАБЛИЦА 5. ЧАСТОТЫ ГАПЛОТИПОВ HLA-DRB1, DQA1, DQB1 И ВЕЛИЧИНЫ НЕРАВНОВЕСНОГО СЦЕПЛЕНИЯ У РАБОТНИКОВ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

TABLE 5. THE FREQUENCIES OF HAPLOTYPES HLA-DRB1, DQA1, DQB1 AND THE VALUES OF NONEQUILIBRIUM COUPLING IN WORKERS OF ORGANIC-SILICON PRODUCTION

HLA-гаплотип HLA haplotype	Больные ХОБЛ Patients with COPD (n = 48)	Устойчивые к ХОБЛ Resistant to COPD (n = 38)
DRB1*01-DQA1*0101	—	1315 1728***
DRB1*04-DQA1*0301	1185 1835**	957 1115**
DRB1*07-DQA1*0201	—	1216 1416***
DRB1*08-DQA1*0401	206 211*	512 541**
DRB1*09-DQA1*0301	1891 2929***	707 823*
DRB1*11-DQA1*0501	1769 3876**	—
DRB1*13-DQA1*0102	—	654 823*
DRB1*13-DQA1*0103	775 871***	496 541*
DRB1*14-DQA1*0101	—	848 1115*
DRB1*15-DQA1*0102	984 1316**	—
DRB1*15-DQA1*0103	—	512 541**
DRB1*16-DQA1*0102	511 646*	1125 1416**
DRB1*17-DQA1*0501	—	1254 1728**
DRB1*08-DQB1*0401-02	206 211*	512 541**
DRB1*09-DQB1*0303	1804 2362***	496 541*
DRB1*11-DQB1*0301	1744 3230***	681 823*
DRB1*13-DQB1*0602-08	711 871**	732 823**
DRB1*14-DQB1*0502-04	—	922 1115**
DRB1*15-DQB1*0601	544 646*	—
DRB1*15-DQB1*0602-08	1034 1324**	481 541*
DRB1*16-DQB1*0502-04	604 646***	922 1115**

Примечание. В верхней строке каждой ячейки таблицы – частота гаплотипа (H × 10000), в нижней строке – величина неравновесного сцепления (D × 10000); * – $p_{F2} < 0,05$; ** – $p_{F2} < 0,01$; *** – $p_{F2} < 0,001$ – достоверность различия по двустороннему точному методу Фишера для четырехпольных таблиц.

Note. In the top line of each cell of the table – the frequency of the haplotype (H × 10000), on the bottom line – the value of the nonequilibrium cohesion (D × 10000); *, $p_{F2} < 0.05$; **, $p_{F2} < 0.01$; ***, $p_{F2} < 0.001$, reliability of the difference in the two-sided exact Fisher method for four-field tables.

ТАБЛИЦА 6. СТАТИСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ АССОЦИАЦИИ ГАПЛОТИПОВ HLA-DRB1, DQA1, DQB1 С ХОБЛ

TABLE 6. STATISTICALLY SIGNIFICANT ASSOCIATIONS OF HAPLOTYPES HLA-DRB1, DQA1, DQB1 WITH COPD

HLA-гаплотип HLA haplotype	ОР* RR*	1/ОР 1/RR	P _f
DRB1*01-DQA1*0101	0,031	32,20	0,0018
DRB1*07-DQA1*0201	0,076	13,10	0,0035
DRB1*13-DQA1*0102	0,110	9,09	0,0390

Примечание. * – относительный риск.

Note. *, relative risk.

статистически достоверного гаплотипического сочетания ни в группе больных ХОБЛ, ни в группе устойчивых к развитию заболевания лиц.

Изучение ассоциации с ХОБЛ обнаруженных двухлокусных гаплотипов, включающих аллели HLA-DRB1, DQA1, DQB1, выявило статистически значимую отрицательную ассоциацию заболевания с тремя гаплотипами – HLA-DRB1*01-DQA1*0101, DRB1*07-DQA1*0201 и DRB1*13-DQA1*0102 (табл. 6).

Обсуждение

Проведенные нами ранее исследования [4] по выявлению ассоциации полиморфных аллелей генов HLA с ХОБЛ не подтвердили известные литературные данные о HLA-ассоциациях данного заболевания [2]. В связи с этим было предпринято настоящее исследование, нацеленное на изучение распределения HLA-гаплотипов в двух группах работников кремнийорганического производства, испытывающих раздражающее влияние агрессивных соединений кремния (органохлорсиланов) на слизистую оболочку респираторного тракта – в группе больных ХОБЛ и в группе устойчивых к развитию ХОБЛ лиц. Известно, что изучение HLA-гаплотипов позволяет выявлять более тонкие межпопуляционные и межгрупповые различия и более эффективно при изучении HLA-ассоциаций болезней, нежели исследование на уровне аллельных генов [8]. Это объясняется тем, что количество гаплотипических сочетаний аллельных генов намного больше, чем аллельных вариантов одного гена.

В результате проведенного нами исследования выявлен целый ряд гаплотипов с положительным неравновесным сцеплением, часть из которых имела положительную ассоциацию ($OP > 1$) с ХОБЛ – это HLA-A9-DQA1*0501, A10-DQA1*0103, A28-DQA1*0102, B7-DQA1*0103. Данные гаплотипы можно отнести к генетическим маркерам предрасположенности к развитию ХОБЛ. 3 из 4-х протективных гаплотипов имели практически одинаковые величины ОР, близкие к значению 9. Следовательно, их наличие у работников кремнийорганического производства

повышает риск развития ХОБЛ в 9 раз. Особенностью обсуждаемых гаплотипов является то, что они содержат в своем составе по одному аллелю каждого из двух основных классов HLA. Кодированные HLA пептиды (антигены) класса I и класса II не равнозначны по биологическим эффектам. Если пептиды класса II участвуют преимущественно в представлении чужеродных (чаще всего инфекционных патогенов) лимфоцитам, то пептиды класса I способствуют узнаванию эффекторными клетками иммунной системы инвазивных клеток. Видимо, в формировании предрасположенности к заболеванию требуется участие характерных сочетаний аллелей генов обоих классов HLA, определяющих вариации иммунного ответа на различные антигены.

Отрицательная ассоциация с заболеванием установлена для гаплотипических сочетаний аллелей HLA-A2-B8, A19-DQB1*0502-04, B12-DQB1*0502-04, B27-DQA1*0103, DRB1*01-DQA1*0101, DRB1*07-DQA1*0201, DRB1*13-DQA1*0102, величина ОР для которых ниже 1. Данный ряд гаплотипов можно отнести к разряду протективных генетических маркеров ХОБЛ в условиях кремнийорганического производства. По мнению W. Bodmer и J. Bodmer (1978), проявление неравновесного сцепления в популяции обусловлено действием естественного отбора и обеспечивает наиболее благоприятные взаимоотношения с окружающей средой [10]. Видимо, присутствие в геноме у представителей чувашской популяции выявленных протективных гаплотипов обеспечивает резистентность к агрессивным поллютантам кремнийорганического производства, а также, возможно, и к другим факторам (курение, выхлопные газы автотранспорта, химические поллютанты и др.), способным вызывать развитие ХОБЛ. При оценке протективного эффекта в данном случае целесообразно пользоваться реципрокными значениями ОР, соответствующими 1/ОР, которые демонстрируют наибольший протективный эффект у гаплотипов DRB1*01-DQA1*0101 и B12-DQB1*0502-04: наличие в генотипе работников кремнийорганического производства данных га-

плотипов уменьшает риск развития ХОБЛ в 32,2 и 20 раз соответственно.

Установленные генетические маркеры предрасположенности и устойчивости к ХОБЛ можно использовать в прогностических целях и для формирования групп генетического риска при проведении профилактических медицинских осмотров и разработки программ профилактики развития такого социально значимого заболевания, как ХОБЛ.

Данные многих авторов свидетельствуют о зависимости HLA-ассоциаций болезней от этнической принадлежности исследуемых групп больных [1, 13]. В продолжение начатых нами исследований необходимо проведение дальнейших исследований по выявлению «маркерных» HLA-гаплотипов при ХОБЛ в других этнических популяциях, а также в условиях воздействия других агрессивных воздушных поллютантов.

Список литературы / References

1. Алексеев Л.П., Дедов И.И., Зилов А.В., Болдырева М.Н., Демидова И.Ю., Трофимов Д.Ю., Хаитов Р.М. Межпопуляционный подход в установлении ассоциированной с HLA генетической предрасположенности к инсулинзависимому сахарному диабету // Сахарный диабет, 1998. № 1. С. 19-21. [Alekseev L.P., Dedov I.I., Zilov A.V., Boldyreva M.N., Demidova I.Yu., Trofimov D.Yu., Khaitov R.M. An interpopulation approach to establishing of HLA-associated genetic predisposition to insulin-dependent diabetes mellitus. *Sakharniy diabet = Diabetes Mellitus*, 1998, no. 1. pp. 19-21. (In Russ.)]
2. Брыляева Е.В., Крюков Н.Н., Жестков А.В. Иммуногенетические исследования хронической обструктивной болезни легких // Практическая медицина, 2011. Т. 51, № 3. С. 55-57. [Brylyaeva E.V., Kryukov N.N., Zhestkov A.V. Immunogenetic studies of chronic obstructive pulmonary disease. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2011, Vol. 51, no. 3, pp. 55-57. (In Russ.)]
3. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика. М.: Медицина, 1983. 208 с. [Zaretskaya Yu.M. Clinical immunogenetics. Moscow: Medicine, 1983. 208 p.]
4. Карзакова Л.М., Мучукова О.М., Борисова Л.В., Кудряшов С.И. Исследование HLA-ассоциаций хронической обструктивной болезни легких в условиях кремнийорганического производства // Клиническая лабораторная диагностика, 2017. Т. 1, № 62. С. 44-49. [Karzakova L.M., Muchukova O.M., Borisova L.V., Kudriashov S.I. The study of HLA associations of chronic obstructive disease of lungs in conditions of organic-silicon manufacture. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, Vol. 1, no. 62, pp. 44-49. (In Russ.)]
5. Певницкий Л.А. Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями // Вестник АМН СССР, 1988. № 7. С. 48-51. [Pevnitsky L.A. Statistical evaluation of HLA antigens associations with diseases. *Vestnik Akademii meditsinskikh nauk SSSR = Bulletin of the Academy of Medical Sciences of the USSR*, 1988, no. 7, pp. 48-51. (In Russ.)]
6. Сусликов В.Л., Шевницына О.Ю., Козлов В.А. Изучение влияния химических веществ, используемых в производстве кремнийорганических соединений, на состояние работающих // Российский медицинский журнал, 2003. № 6. С. 30-31. [Suslikov V.L., Shevnitsyna O.Yu., Kozlov V.A. Adverse effects produced by chemical substances at the organic-silicon production facilities on the health conditions of workers. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*, 2003, no. 6, pp. 30-31. (In Russ.)]
7. Bashir A., Shah N.N., Hazari Y.M., Habib M., Bashir S., Hilal N., Banday M., Asrafuzzaman S., Fazili K.M. Novel variants of SERPIN1A gene: Interplay between alpha1-antitrypsin deficiency and chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.*, 2016, Vol. 117, pp. 139-149.
8. Begovich A.B., Moonsamy P.V., Mack S.J., Barcellos L.F., Steiner L.L., Grams S., Suraj-Baker V., Hollenbach J., Trachtenberg E., Louie L., Zimmerman P., Hill A.V., Stoneking M., Sasazuki T., Konenkov V.I., Sartakova M.L., Titanji V.P., Rickards O., Klitz W. Genetic variability and linkage disequilibrium within the HLA-DP region: analysis of 15 different populations. *Tissue Antigens*, 2001, Vol. 57, no. 5, pp. 424-439.
9. Bird Y., Staines-Orozco H. Pulmonary effects of active smoking and secondhand smoke exposure among adolescent students in Juárez, Mexico. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2016, Vol. 11, pp. 1459-1467.
10. Bodmer W.F., Bodmer J.G. Evolution and function of the HLA system. *Brit. Med. Bull.* 1978, Vol. 34, no. 3, p. 309.
11. Dorak M.T. Statistical analysis in HLA and disease association studies. Available at: <http://www.dorak.info/hla/stat.html>. Last updated 27 July 2009, last visited at 9 March 2018.
12. Hawari F.I., Obeidat N.A., Ghonimat I.M., Ayub H.S., Dawahreh S.S. The effect of habitual waterpipe tobacco smoking on pulmonary function and exercise capacity in young healthy males: A pilot study. *Respir. Med.*, 2017, Vol. 122, pp. 71-75.
13. Ikegami H., Kawabata Y., Noso S., Fujisawa T., Ogihara T. Genetics of type 1 diabetes in Asian and Caucasian populations. *Diab. Res. Clin. Pract.*, 2007, Vol. 77, Suppl. 1, pp. 116-121.
14. McLean S., Barbour V., Wild S., Simpson C., Sheikh A. Models for estimating projections for disease prevalence and burden: a systematic review focusing on chronic obstructive pulmonary disease. *J. Health Serv. Res. Policy*, 2015, Vol. 20, no. 4, pp. 246-253.

15. Słomiński J.M., Kedziora K. Is COPD an autoimmune disease caused by smoking? *Przegl. Lek.*, 2006, Vol. 63, no. 10, pp. 1138-1139.
16. Soriano J.B., Ancochea J., Miravittles M., García-Río F., Duran-Tauleria E., Muñoz L., Jiménez-Ruiz C.A., Masa J.F., Viejo J.L., Villasante C., Fernández-Fau L., Sánchez G., Sobradillo-Peña V. Recent trends in COPD prevalence in Spain: a repeated cross-sectional survey 1997-2007. *Eur. Respir. J.*, 2010, Vol. 36, no. 4, pp. 758-765.
17. Vogelmeier C.F., Criner G.J., Martinez F.J., Anzueto A., Barnes P.J., Bourbeau J., Celli B.R., Chen R., Decramer M., Fabbri L.M., Frith P., Halpin D.M., López Varela M.V., Nishimura M., Roche N., Rodriguez-Roisin R., Sin D.D., Singh D., Stockley R., Vestbo J., Wedzicha J.A., Agustí A. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. GOLD Executive Summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2017, Vol. 195, no. 5, pp. 557-582.

Авторы:

Карзакова Л.М. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Чебоксары, Россия

Мучукова О.М. — аспирант кафедры внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Чебоксары, Россия

Борисова Л.В. — к.м.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией БУ «Республиканский эндокринологический диспансер» Министерства здравоохранения Чувашии, г. Чебоксары, Россия

Кудряшов С.И. — ассистент кафедры внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Чебоксары, Россия

Authors:

Karzakova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Internal Diseases with a Course of Clinical Immunology, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

Muchukova O.M., Postgraduate Student, Department of Internal Diseases with a Course of Clinical Immunology, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

Borisova L.V., PhD (Medicine), Head, Clinical and Diagnostic Laboratory, Republican Dispensary for Clinical Endocrinology, Cheboksary, Russian Federation

Kudryashov S.I., Assistant Professor, Department of Internal Diseases with a Course of Clinical Immunology, Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

Поступила 27.02.2018
Принята к печати 19.09.2018

Received 27.02.2018
Accepted 19.09.2018

МЕТОД ИММУНОСИГНАТУРЫ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Филиппова Ю.Ю., Нохрин Д.Ю., Бурмистрова А.Л.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. Большой и разнообразный репертуар антител кодирует историю прошлого иммунологического опыта, создавая глобальную сеть системы регуляции организма. В этой статье мы предлагаем использовать пептидный микрочип (метод «иммуносигнатуры») для оценки глобальных индивидуальных паттернов антител и биоинформационный анализ данных для дифференциальной диагностики расстройств аутистического спектра. Пептидный микрочип состоит из 124 000 случайным образом синтезированных антигенных миметиков, ковалентно связанных с поверхностью стеклянного слайда. Капля плазмы тестируется на наличие антител определенной реактивности, путем измерения связывания их с каждым антигенным миметиком микрочипа с помощью флуоресцентного окрашивания вторичными IgG-антителами, и такая реакция учитывается при лазерной активации. Файлы оцифрованных данных интенсивности флуоресценции, которая презентовала реактивность антител плазмы, связавшихся с антигенными миметиками, использовали для биоинформационного анализа. Обработка данных была проведена пакетами проекта Bioconductor для программно-статистической среды R. На этапе предобработки полученных данных, для выравнивания распределений показателей реактивности антител, применяли квантильную нормализацию. Данные по образцам и другую необходимую информацию объединяли в один файл-контейнер класса ExpressionSet. Для сравнения контрольной и опытной групп использовали однофакторный дисперсионный анализ в модификации Уэлча (для неравных дисперсий). Полученные оценки разности средних значений и статистической значимости Р использовали далее для построения вулканной диаграммы, для ранжирования и отбора наиболее перспективных показателей реактивности антител. Для дифференциальной диагностики аутизма и оценки диагностической значимости метода иммуносигнатуры была построена тепловая карта. При построении тепловой карты использовали стандартизованные значения логарифмов реактивности антител и результаты иерархического кластерного анализа, проведенного методом Уорда, с использованием в качестве меры сходства корреляции Пирсона. В результате биоинформационного анализа данных было выбрано 73 антитела, реактивность которых имела статистически значимые различия в группах детей с аутизмом и типично развивающихся детей. Эти антитела были использованы для дифференциальной диагностики, ценность которой определяли при построении тепловой карты. Обнаружено, что группа детей с расстройствами аутистического спектра по показателям реактивности антител обладает выраженной гетерогенностью и состоит как минимум из двух подгрупп. Кроме того, 60 антител у детей с аутизмом демонстрировали преимущественно среднюю и низкую реактивность, т.е. эти антитела имели слабую силу связывания с антигенными миметиками, и только 13 антител показывали высокую реактивность. В целом специфичность диагностики расстройств аутистического спектра с помощью метода иммуносигнатуры составила 96,0% (95% ДИ от 82,8 до 99,6%), чувствительность — 78,3% (95% ДИ от 64,9 до 88,2%) и диагностическая эффективность — 82,7%.

Адрес для переписки:

Филиппова Юлия Юрьевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»
454001, Россия, г. Челябинск, ул. Братьев
Кашириных, 129.
Тел.: 8 (351) 799-71-76.
Факс: 8 (351) 742-09-25.
E-mail: julse@rambler.ru

Address for correspondence:

Filippova Yulia Yu.
Chelyabinsk State University
454001, Russian Federation, Chelyabinsk,
Bros. Kashirin str., 129.
Phone: 7 (351) 799-71-76.
Fax: 7 (351) 742-09-25.
E-mail: julse@rambler.ru

Образец цитирования:

Ю.Ю. Филиппова, Д.Ю. Нохрин, А.Л. Бурмистрова
«Метод иммуносигнатуры в дифференциальной
диагностике расстройств аутистического спектра:
пилотное исследование» // Медицинская иммунология,
2019. Т. 21, № 2. С. 303–312.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-303-312

© Филиппова Ю.Ю. и соавт., 2019

For citation:

Yu. Yu. Filippova, D. Yu. Nokhrin, A. L. Burmistrova
“Immunosignature approach to differential diagnosis of
autism spectrum disorders: a pilot study”, Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2,
pp. 303–312. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-303-312

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-303-312

Наше пилотное исследование позволяет предложить метод иммуносигнатуры для дифференциальной диагностики аутизма и, возможно, расширить наше понимание нарушений при расстройствах аутистического спектра.

Ключевые слова: иммуносигнатура, реактивность антител, дифференциальная диагностика, расстройства аутистического спектра, дети, биоинформатика, иммунная сеть

IMMUNOSIGNATURE APPROACH TO DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS: A PILOT STUDY

Filippova Yu.Yu., Nokhrin D.Yu., Burmistrova A.L.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. A large and diverse repertoire of antibodies encodes the history of past immunological experience, creating a global network of the body's regulation system. In this article, we propose to use a peptide microarray ("immunosignature") for evaluating global individual antibody patterns and bioinformatic data analysis for differential diagnosis of autism spectrum disorders. The peptide microarray consists of 124 000 antigen mimetics with random sequences covalently bound to the surface of the glass slide. A drop of plasma is tested for the presence of antibodies of distinct specificity, by measuring their binding to each antigen mimetic in the microarray detectable by fluorescent staining with secondary IgG antibodies, and this reaction is registered by laser activation assay. For bioinformatic analysis, we used the files of digitalized fluorescence intensity data, which presented the reactivity of plasma antibodies bound to antigen mimetics. Data processing was carried out by packages of the Bioconductor project for the R software environment to perform statistical evaluation. At the stage of primary data processing, the quantile normalization was used in order to equalize the distributions of antibodies' reactivity. The sample data and other necessary information were combined into the discrete ExpressionSet container files. To compare the control and experimental groups, the Welch's one-way ANOVA (for unequal variances) was used. The obtained estimates of the mean value differences and statistical significance of P levels were used further for constructing a volcano diagram, in order of ranking and selecting the most promising antibody reactivity parameters.

For differential diagnosis of autism, and evaluation of diagnostic significance of the immunosignature method, a heatmap was constructed. The standardized values of the logarithms of antibody reactivity, and the results of the hierarchical cluster analysis performed by the Ward method using Pearson correlation, as a measure of similarity were used in constructing the heatmap. As a result of the bioinformatic analysis of the data, 73 antibodies were selected whose reactivity had statistically significant differences in groups of children with autism and normally developing children. These antibodies were used for differential diagnosis, the value of which was determined in the heatmap construction. It was found that the group of children with autism spectrum disorders by the antibody reactivity exhibits marked heterogeneity, and consists of at least two subgroups. In addition, 60 antibodies in children with autism showed predominantly medium and low reactivity, i.e. these antibodies had a weak binding power with antigenic mimetics, and only 13 antibodies showed high reactivity. In general, diagnostic specificity of the autism spectrum disorders using immunosignature approach was 96.0% (95% CI 82.8 to 99.6%), sensitivity was 78.3% (95% CI 64.9 to 88.2%), and diagnostic efficiency was 82.7%. Our pilot study allows us to propose a method of immunosignature for differential diagnosis of autism and, possibly, to expand our understanding of autism spectrum disorders.

Keywords: immunosignature, antibody reactivity, differential diagnosis, autism spectrum disorders, children, bioinformatics immune network

Введение

Все живые системы демонстрируют комплексность своей организации, и человек не исключение. Одним из главных регуляторов целостности таких систем выступает иммунная система. Это не случайно, т.к. ее архитектура представлена молекулами, клетками и органами, интегрирующими

большой объем информации — от индивидуальной генетической до извлеченной из жизненного опыта, через сенсинг и процессинг чужеродных антигенов (АГ), в ассоциации с внутренними сигналами (в том числе антителами (АТ)), сообщающими о состоянии организма, что позволяет выстроить адаптационное поведение индивидуума.

Большой и разнообразный репертуар АТ (к чужеродным и аутоАГ) обладает высокой информационной емкостью [22]. В конце XX — начале XXI века возникли горячие дискуссии о происхождении и роли в жизни человека (млекопитающих) АТ к АГ своего организма. Были получены убедительные данные о том, что аутоАТ не являются привилегией аутоиммунных заболеваний и присутствуют у здоровых людей разного возраста в течение жизни, начиная с эмбрионального периода, создавая глобальную сеть системы регуляции организма [17]. Их изучение внесло некоторую ясность по ряду вопросов, в том числе о наличии в организме пренатальных и постнатальных аутоАТ.

Пренатальные аутоАТ появляются рано в онтогенезе, относятся в основном к полиреактивным, каждое аутоАТ связывается со своим специфическим сетом аутоАГ, образуя подгруппы, из которых складываются аутоиммунные паттерны всего организма. Считают, что к ним относятся и антиидиотипические АТ класса IgM, реже IgG и IgA [6, 14]. Именно такие аутоАТ формируют уже в онтогенезе сетовое взаимодействие со многими аутоАГ при низкой аффинности к ним, создавая внутренний образ организма с помощью иммунной системы — иммунологический гомункулус [6], что позволяет иммунной системе контролировать гомеостаз организма.

Постнатальные АТ — их репертуар разнообразен и представлен: 1) моновалентными специфическими АТ (в основном класса IgG), отражающими историю встречи с чужеродным АГ и подготовку иммунной системы к эффективному будущему ответу на патогены, несущие тот же АГ; 2) аутоАТ, контролирующими внутренний гомеостаз, в том числе процессы интеграции, прежде всего иммунной и нервной систем при здоровье, а также при создании нового уровня динамической устойчивости организма во время/после болезни. Изменение условий, в частности действие стрессоров (физических, инфекционных, психо-социальных) является фактором инициации продукции возрастающего количества аутоАТ к сигнальным молекулам, регуляторным пептидам, цитокинам, молекулам адгезии, хемотаксиса, растворимым рецепторам, а также АТ к чужеродным АГ. Весь набор АТ включен в глобальную сеть системы регуляции.

Для изучения индивидуальных профилей пре- и постнатальных аутоАТ относительно недавно была использована новая технология — антигенный микрочип, способный одновременно измерять реактивность сотен антител [14, 15, 20, 21, 22, 26]. Антигенный микрочип состоит из различных АГ, ковалентно связанных с поверхностью стеклянного слайда. Капля сыворотки тестируется на наличие аутоАТ определенной реактивности, путем измерения связывания их с каждым АГ микрочипа с помо-

щью флуоресцентного окрашивания вторичными АТ (IgG, IgA, IgM), и такая реакция учитывается при лазерной активации. На основании данных, полученных при анализе антигенных микрочипов, были сделаны следующие выводы: 1) связывание аутоАТ с АГ на слайде не может дать сведения о стимулах, индуцирующих продукцию этих АТ, не может быть маркером аффинности или специфичности определенных АТ или группы АТ, а, вероятно, отражает поликлональную смесь АТ к различным структурным эпитопам, представленным в каждом АГ; 2) метод антигенных микрочипов позволил продемонстрировать, что индивидуальный профиль АТ отражает организацию персонального иммунного состояния, что может быть использовано для оценки межиндивидуальных различий, в том числе в зависимости от возраста, а также различий, определяемых состояниями здоровье/болезнь и (или) резистентность/чувствительность к определенной патологии [14, 20, 21, 22].

Результаты выводов авторов продемонстрировали необходимость поиска новых подходов, позволяющих идентифицировать не только аутоАТ к новым аутоАГ, но и глобальные паттерны АТ, с параллельным использованием биоинформационного анализа данных.

Одним из решений таких задач является новый метод пептидных микрочипов, названный «иммуносигнатура», в основе которого лежит принцип оценки глобальных индивидуальных паттернов АТ, способных связываться с большим набором (124 000) синтезированных пептидов со случайными аминокислотными последовательностями, которые, как предполагают, копируют миметики природных АГ, а также аутоАГ и неоАГ собственного организма, возникающие в том числе в ходе активации эпигенетических механизмов, в результате различных процессов деструкции и/или ослабления старых регуляторных механизмов, создающих новые мишени взаимодействия с АТ [29].

Метод иммуносигнатуры был использован для дифференциальной диагностики опухолей различной этиологии [28], болезни Альцгеймера [24, 25], синдрома хронической усталости [27], что позволило нам применить его для диагностики расстройств аутистического спектра (РАС), которые включают гетерогенные изменения, связанные с различными нарушениями/отклонениями нейроразвития. РАС описывается рядом характерных симптомов/дефицитов, формирующих основные коровые домены: трудности социальной коммуникации, ошибочные социальные взаимодействия, ограниченные и/или повторяющиеся поведение и интересы [3, 7, 18]. В то же время исследователи сообщают о недостаточности симптомов в каждом домене, что приводит к формированию нескольких фенотипических

профилей, которые могут свидетельствовать не только о заболевании/дисфункции, но и об индивидуальных особенностях нейроразвития и/или пре- и постнатальной адаптации [2, 3, 18].

Таким образом, несмотря на раннюю диагностику РАС (в возрасте 2–4 лет), гетерогенность симптомов в коровых доменах РАС вызывает необходимость идентификации подгрупп, которая может помочь в диагностике, детекции причинных факторов и механизмов и, в результате, в планировании лечения/психосоциальной реабилитации детей [1].

Цель исследования — использовать и оценить эффективность метода иммуносигнатуры для дифференциальной диагностики расстройств аутистического спектра.

Материалы и методы

Участники

В исследование включены 24 ребенка с РАС: 21 мальчик и 3 девочки (в возрасте от 3 до 11 лет) и 25 типично развивающихся детей (ТРД) (в возрасте от 4 до 14 лет). Дети с РАС находились на реабилитации в социально-реабилитационном центре «Здоровье», г. Челябинск. Отбор детей проводился врачом-психиатром центра. Для оценки клинико-динамических характеристик состояния были использованы шкалы CARS (Childhood Autism Rating Scale) и CARS-HF (High Functional). В исследование не были включены дети в периоды болезни и ранней ремиссии, после острых респираторно-вирусных заболеваний. У всех родителей получено информированное согласие на участие в исследовании. Работа одобрена этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 1 от 16.05.2016).

Анализ пептидных микрочипов

Венозная кровь была собрана в пробирки Vacuette, содержащие K_3 -ЭДТА. Пробирки центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученную плазму смешивали с глицерином 1:1, для предотвращения повреждения льдом антител, и замораживали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до использования для исследований. У ТРД забор крови осуществляли однократно, у детей с аутизмом — в дублях (с интервалом в 3–6 месяцев).

Реактивность антител плазмы крови детей измеряли с помощью пептидных микрочипов, описанных Leguttki & Johnston (2013), предоставленных Институтом биодизайна Университета штата Аризона, США. Микрочип состоит из твердой фазы с 124 000 случайным образом синтезированных пептидов — антигенными миметиками, ковалентно связанными с предметными стеклами. Антигенные миметики были синтезированы Alta Biosciences (Бирмингем, Великобритания) и нанесены на стек-

ла с использованием бесконтактного пьеза-принтера в компании Applied Microarrays (Аризона, США).

Образцы плазмы крови разводили (1:625) в 3% растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере (БСА/ФСБ). 20 мкл разведенного образца наносили на фильтровальную бумагу 903ТМ и высушивали в течение 2 часов при н.у. Из высушенной фильтровальной бумаги вырезали диски диаметром 6 мм, содержащие исследуемые образцы плазмы крови. Полученные диски помещали на пептидный микрочип, инкубировали на орбитальном шейкере 300 об/мин, 90 мин при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Микрочипы отмывали, добавляли вторичные антитела к человеческому IgG с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647 (Life Technologies, Калифорния, США) и инкубировали на орбитальном шейкере 300 об/мин, 60 мин при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Чипы сканировали с помощью сканера InnoScan 900AL (Innopsys, Франция). Положение, размер и интенсивность флуоресценции (ИФ), которые презентовали реактивность АТ плазмы связавшихся с АГ миметиками, оцифровывались и оценивались с помощью программного обеспечения Marix (Innopsys, Франция). Полученные файлы использовались для биоинформационного анализа.

Биоинформационный анализ данных

Обработка данных была проведена пакетами проекта Bioconductor [9] для программно-статистической среды R (v. 3.3.2, [23]), а также средствами электронной таблицы Microsoft Office Excel 2007 (v. 3.3.6.1, Microsoft Corp.) Работа в среде R осуществлялась из пакета RStudio (v. 1.1.383, RStudio Inc.). На этапе предобработки полученных данных, для выравнивания распределений показателей реактивности АТ, использовали квантильную нормализацию из пакета preprocessCore (v. 1.42.0 [4]). После удаления из матрицы данных информации по фоновой флуоресценции пустых ячеек микрочипов и объединения результатов повторных измерений дублирующихся антигенных миметиков путем вычисления медианы была получена итоговая таблица. Она содержала 122 926 строк, представленных уникальными антигенными миметиками, и 71 колонку с кодами образцов, из которых 25 относились к группе сравнения (ТРД — контроль) и 46 — к основной группе детей с РАС. В ячейках этой таблицы содержались нормализованные значения реактивности АТ, которые использовались далее для сравнения двух групп. Итоговую таблицу, данные по образцам и другую необходимую информацию объединяли в один файл-контейнер класса ExpressionSet. Его сборку и дальнейшие с ним операции проводили с использованием средств пакета “Biobase” (v. 2.40.0 [13]).

Для устранения асимметрии распределения показателей реактивности АТ к данным итоговой таблицы в составе файла-контейнера применя-

ли логарифмическое преобразование по основанию два. Сравнение контрольной и опытной групп детей по средним значениям логарифмов реактивности АТ для каждого из 122 926 антигенных миметиков было проведено в пакете “genefilter” (v. 1.62.0 [10]). Для сравнения использовали однофакторный дисперсионный анализ в модификации Уэлча (для неравных дисперсий). Полученные оценки разности средних значений и статистической значимости Р использовали далее для построения вулканной диаграммы, для ранжирования и отбора наиболее перспективных показателей реактивности АТ. Для дифференциальной диагностики РАС и оценки диагностической значимости метода иммуносигнатуры была построена тепловая карта. Построение вулканного графика и тепловой карты было проведено базовыми средствами среды R (пакет “stats”). При построении тепловой карты использовали стандартизованные значения логарифмов реактивности АТ и результаты иерархического кластерного анализа, проведенного методом Уорда, с использованием в качестве меры сходства корреляции Пирсона. Для полученных значений чувствительности и специфичности диагностики РАС рассчитывали 95%-ный байесовский доверительный интервал (95% ДИ) Джеффриса для частот [5].

Результаты

Данные, получаемые в ходе экспериментов на микрочипах, отличаются рядом особенностей, и прежде всего большим объемом, в связи с этим биоинформационная обработка данных являлась одной из важных частей исследования и включала несколько этапов.

Этап 1. Преобработка

На первом этапе была проведена оценка структуры и качества полученных первичных данных.

На рисунке 1А представлены коробчатые диаграммы показателей реактивности АТ 71 образцов плазмы крови ТРД и детей с РАС, построенные по всем имеющимся данным (уникальные антигенные миметики, повторности антигенных миметиков, пустые ячейки). Видно, что образцы плазмы детей, независимо от наличия/отсутствия заболевания, сильно различались как по медиане, так и по межквартильному размаху. На фоне такой изменчивости обнаружение межгрупповых различий являлось проблематичным. Из опыта микрочиповых исследований экспрессии генов известно, что значительная доля такой изменчивости обусловлена небиологическими различиями образцов (небольшими физическими различиями между чипами, особенностями работы сканера, вариацией лабораторных условий и др.) и может быть устранена различными

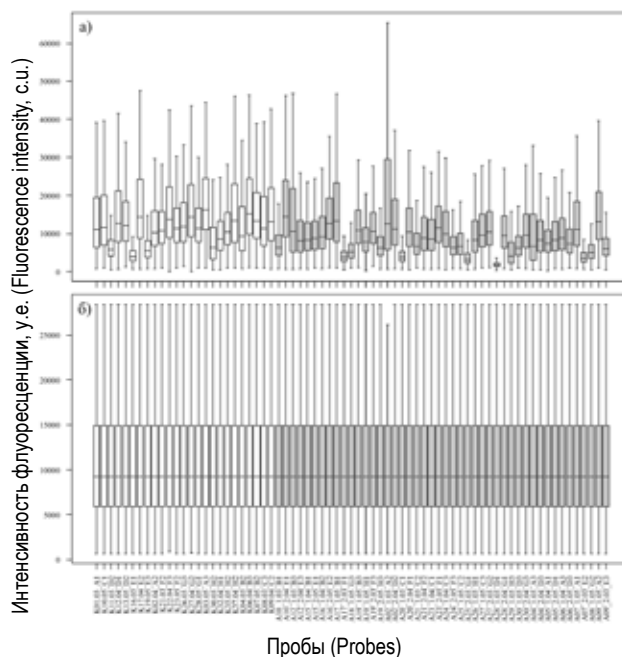


Рисунок 1. Коробчатые диаграммы распределения показателей реактивности антител образцов плазмы крови исследуемых групп детей

Примечание. А) исходное; Б) после квантильной нормализации. Цвета: белый – группа типично развивающихся детей (ТРД), серый – группа детей с расстройствами аутистического спектра (РАС).

Figure 1. Box diagrams of distribution of the antibodies reactivity of blood plasma samples of the children's groups studied

Note. A) the origina; B) after the quantile normalization. Colors: white – a group of typically developing children (TD), gray – a group of children with autism spectrum disorders (ASD).

способами нормализации данных. Нами была проведена квантильная нормализация, которая в настоящее время является наиболее популярным алгоритмом [8, 19]. Из рисунка 1Б видно, что она позволила сделать эмпирические распределения показателей реактивности АТ образцов плазмы крови детей одинаковыми.

После нормализации матрица данных была очищена от не содержащих антигенных миметиков пустых ячеек. Информация по ИФ пустых ячеек микрочипов была важна для повышения эффективности нормализации, поскольку выступала нижним пределом – фоном, который не зависит от биологических различий образцов и вариабельность которого целиком обусловлена неконтролируемой технической изменчивостью. Однако, поскольку в дальнейшем анализе пустые ячейки не использовались, 181 такая строка была удалена из таблицы данных

Далее были обработаны данные по дублирующимся антигенным миметикам. Повторы вносятся производителями микрочипов для возможности внутреннего контроля их качества. В нашем случае таких дублирующих антиген-

ных миметиков было семь с числом повторов от 10 до 276. Для каждого из 71 образцов были рассчитаны медианы показателя реактивности АТ для этих повторностей, и в итоговой таблице данных для каждого из семи антигенных миметиков была оставлена только одна строка, содержащая медианные значения реактивности. В итоге, в результате предобработки данных, была получена таблица из 122 926 строк, представленных уникальными антигенными миметиками, и 71 колонки с кодами образцов.

Этап 2. Сборка файла-контейнера класса ExpressionSet

Параллельное измерение реактивности (ИФ) сотен тысяч разных антител представляет собой сложную задачу. Вычислительно эта проблема аналогична той, которая встречается при параллельных измерениях экспрессии сотен или тысяч генов с помощью генных микрочипов, для которых были разработаны многие передовые методы биоинформационного анализа [14].

Нами был использован специальный класс сложных файлов-контейнеров — ExpressionSet [11], который состоял из трех блоков: 1) анализируемых данных (assayData), представленных полученной в ходе препроцессинга таблицей из 122926 71 ячеек; 2) метаданных, включавших 3 части (описание образцов (phenoData), данные об особенностях чипа и технологии, используемой в эксперименте (featureData), примечание (annotation)); 3) описания эксперимента (experimentData).

После сборки файла-контейнера содержащиеся в нем данные стали доступны для статистической обработки пакетами программ проекта Bioconductor.

Этап 3. Статистический анализ данных

На следующем этапе нами был произведен поиск и отбор показателей реактивности АТ, которые имели статистически значимые различия между исследуемыми группами и могли бы быть использованы для дифференциальной диагностики детей с РАС.

Выбор наиболее важных показателей проводился путем сравнения средних значений показателей реактивности АТ в исследуемых выборках с применением статистических критериев из пакета “genefilter” платформы Bioconductor. Так как эти критерии относятся к параметрическим, а распределения показателей реактивности АТ не являются нормальными, данные предварительно преобразовывали с помощью логарифмирования по степени два.

На рисунке 2 приведены гистограммы распределений показателей реактивности АТ образца K16.03_E1, который относился к группе ТРД и характеризовался одним из самых низких исходных

значений реактивности (на рис. 1А — шестой слева). Видно, что исходное положительно асимметричное распределение (рис. 2А) в результате квантильной нормализации было приведено к другому масштабу с сохранением асимметрии (рис. 2Б), а после логарифмирования приняло почти идеальную симметричную колоколообразную форму, свойственную нормальному распределению.

После логарифмического преобразования данных было проведено сравнение средних значений показателей реактивности АТ в группах ТРД и детей с РАС с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в модификации Уэлча (для неравных дисперсий). В результате анализа нами была получена таблица, содержащая для каждого показателя: 1) значение F-критерия, 2) соответствующее ему р-значение, 3) величину разности средних значений в исследуемых группах. Таблица позволила отсортировать показатели в порядке уменьшения значимости различий и/или величины различий с получением наиболее важных из них.

Для визуализации различий по исследуемым показателям между группами ТРД и детей с РАС была построена вулканная диаграмма (volcano plot, рис. 3, см. 3-ю стр. обложки). В ней по оси абсцисс откладывали разность логарифмов средних значений реактивности в сравниваемых выборках ТРД (контроль — К) и детей с РАС (аутизм — А), а по оси ординат — отрицательное значение десятичного логарифма р-значения, полученного в результате сравнения этих средних значений. Чем дальше от центра диаграммы расположены метки показателей влево или вправо, тем сильнее отличаются групповые средние, а чем выше расположены метки, тем более статистически значимы эти различия, при этом наиболее важные показатели оказываются в верхних углах графика.

Для наглядности на рисунке 3 отчерчены углы, соответствующие значимости различий $p < 0,01$ ($-\lg(0,01) = 2$) и с абсолютной величиной различий средних $|dm| > 0,2$. Видно, что по наиболее важным для дифференциальной диагностики показателям реактивности АТ чаще наблюдались положительные значения разности (К-А) (синие метки на графике) и заметно реже — отрицательные (красные метки) (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки). Это свидетельствует о том, что в группе детей с РАС преимущественно наблюдалось низкая реактивность диагностически значимых АТ по сравнению с аналогичными значениями в группе ТРД, а число АТ с значимо высокой реактивностью было малым. Все найденные показатели могут рассматриваться в качестве специфических маркеров РАС.

Тем не менее выбор конкретного числа показателей, которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики, не является однознач-

ным. Ввиду большого числа проведенных тестов, полученные р-значения нуждаются в поправках на множественность сравнений, например Бонферрони, Холма и др. Однако, во-первых, использование таких поправок в случае тысяч сравнений делает результаты отбора показателей по скорректированным р-значениям слишком консервативными. Во-вторых, в некоторых ситуациях даже с поправками число статистически значимых различий составляет сотни и тысячи показателей, что заставляет исследователей искусственно снижать их количество до меньших значений, часто «круглых»: 50, 100, 200.

В-третьих, не ясно, как относиться к результатам, когда применение поправок не оставляет статистически значимых показателей, тем не менее предоставляя исследователю некоторое число наиболее перспективных из них. Поэтому интерпретацию результатов статистического сравнения в биоинформатике принято проводить с привлечением средств кластерного графического анализа данных.

Этап 4. Интерпретация результатов анализа

Для визуального отбора наиболее важных показателей реактивности, которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики детей с РАС, и оценки их диагностической значимости нами был применен дополнительный метод графического представления данных микрочиповых исследований — тепловая карта (heatmap, рис. 4, см. 3-ю стр. обложки).

Для построения тепловой карты, изображенной на рисунке 4, нами были отобраны 73 антигенных миметика, отличавшиеся от остальных наименьшими р-значениями и образующими на графике отсортированных в порядке увеличения р-значений небольшую ступень.

При построении тепловой карты необходимо было учесть, что значения ИФ (реактивности) для отобранных нами 73 показателей сильно варьировали от сотен тысяч до сотен условных единиц, во много раз превышая величину межгрупповых различий. Поэтому перед построением карты данные были стандартизованы: из значения логарифма показателя реактивности каждого из 71 образцов вычиталось среднее по данному показателю значение, а разность делилась на стандартное отклонение. В результате межгрупповые различия были выражены в единицах стандартного отклонения, и данные по разной реактивности АТ были приведены к единому масштабу.

Тепловая карта представляет собой таблицу из ячеек, отражающих индивидуальные значения показателей реактивности 73 АТ (ось Х, подписи соответствуют аминокислотным последовательностям антигенных миметиков, с которыми взаимодействуют АТ плазмы крови) для каждого ребенка (ось У, К — ТРД, А — дети с РАС). Синий цвет ячейки указывает на низкую реактивность АТ, сла-

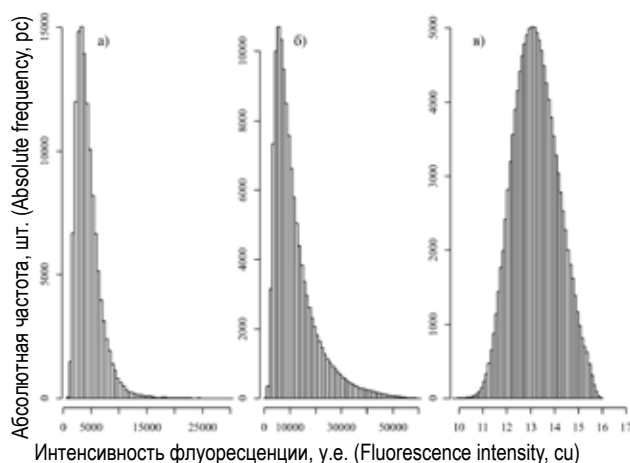


Рисунок 2. Гистограммы распределения показателей реактивности антител образца K16.03_E1

Примечание. А) исходные данные; Б) данные после квантильной нормализации; В) данные после нормализации и логарифмирования по основанию два.

Figure 2. Histograms of distribution of the antibodies reactivity of sample K16.03_E1

Note. A) the original data; B) data after quantile normalization; C) data after normalization and logarithm on the basis of two.

бо связанных с АГ, желтый и красный цвета ячеек указывают на среднюю и высокую реактивность АТ соответственно, т.е. демонстрируют среднюю и высокую силу связывания с антигенными миметиками (рис. 4, см. 3-ю стр. обложки).

На левом поле тепловой карты представлена дендрограмма сходства объектов исследования, которая делит группы обследованных детей на два больших кластера: кластер, в который преимущественно вошли ТРД (верхняя часть тепловой карты, участок дендрограммы и коды детей отмечены синим цветом) и кластер детей с РАС (нижняя часть тепловой карты, коды выделены красным цветом). На верхнем поле тепловой карты представлена кластеризация показателей реактивности 73 АТ, отобранных для дифференциальной диагностики групп. Видно, что показатели также образуют два кластера, состоящих из 60 и 13 значений, выделенных синим и красным цветом соответственно. Для наглядности поле тепловой карты расчерчено черными линиями по границам кластеров, образуя 4 квадрата: А, В, С, D (рис. 4, см. 3-ю стр. обложки).

Как видно из рисунка 4, для 60 АТ у детей с РАС наблюдалась преимущественно средняя и низкая реактивность (нижний левый квадрат В, область синего и желтого спектра), т.е. эти АТ имели слабую силу связывания с антигенными миметиками, и только 13 АТ показывали высокую реактивность (нижний правый квадрат D, область преимущественно красного цвета). Для группы ТРД, наоборот, было характерно бо-

лее сильное связывание (реактивность) по сравнению с группой детей с РАС для 60 АТ (верхняя левая область карты с преобладанием красного цвета, квадрат А), и только 13 АТ обнаруживали низкую реактивность.

Также из дендрограммы для детей с РАС видно, что эта группа не является однородной и, вероятно, представлена двумя подгруппами, сходными по реактивности 13 специфичных для РАС АТ, но различающимися по соотношению реактивности АТ, характерных для ТРД.

В целом группировка объектов на тепловой карте показывает, что в группу детей с РАС попал только один ребенок из группы ТРД, остальные 24 были классифицированы верно, то есть специфичность диагностики составила 24 из 25 или 96,0% (95% ДИ от 82,8 до 99,6%). В кластер группы типично развивающихся детей ошибочно попало 10 образцов детей с РАС из 46, то есть доля верно классифицированных детей с РАС или чувствительность методики составила 36 из 46 или 78,3% (95% ДИ от 64,9 до 88,2%). Таким образом, общая диагностическая эффективность метода иммуносигнатуры для дифференциальной диагностики аутизма составила 87,2%.

Обсуждение

РАС определяются как гетерогенная группа нарушений нейроразвития, с большой долей вероятности закладывающихся в эмбриональном периоде, которые проявляются трудностями в социальных взаимодействиях, вербальных и невербальных коммуникациях, стереотипными или повторяющимися моделями поведения [31].

К сожалению, на сегодня подходы к диагностике и методы терапии основных симптомов РАС остаются ограниченными, что определяется недостаточным пониманием этиологии и патогенеза развития этих расстройств. Среди многих теорий, представленных для объяснения причин и следствий развития РАС, дисфункция иммунной системы все чаще презентуется в качестве потенциального механизма в патогенезе аутизма [12, 16, 30], в связи с этим для дифференциальной диагностики РАС нами был предложен метод иммуносигнатуры, основанный на поиске глобальных индивидуальных паттернов АТ, характерных для состояний здоровье/болезнь.

В результате биоинформационного анализа данных было выбрано 73 АТ, показатели реактивности которых имели статистически значимые различия в группах детей с РАС и ТРД и были использованы для дифференциальной диагностики, ценность которой определяли при построении тепловой карты. Обнаружено, что группа детей с РАС по показателям реактивности АТ обладает выраженной гетерогенностью и состоит

как минимум из двух подгрупп, что согласуется с данными ряда авторов [2, 3, 18].

Кроме того, у детей с РАС иммунореактивность АТ в отношении 60 антигенных миметиков значимо ниже, чем у ТРД. Известно, что уровни АТ у детей достигают уровни взрослых в зависимости от изотипов только к 10 годам [12]. Следовательно, полученные данные могут отражать как замедленное/измененное развитие продукции АТ, так и недостаточность комплексного взаимодействия между клетками — участниками гуморального иммунного ответа: дендритными клетками, Т-лимфоцитами, АТ-продуцирующими В-лимфоцитами, а также эффекты растворимых факторов — цитокинов и хемокинов, участвующих в антителообразовании. Работы ряда авторов указывают на субоптимальную гуморальную функцию В-лимфоцитов, отвечающих за продукцию АТ у детей с РАС [12, 16]. Следует подчеркнуть, что факторы иммунной системы — цитокины, хемокины, АТ — на ранних стадиях нейроразвития поступают к плоду и участвуют в формировании пластичности центральной нервной системы и ее функций, так же как ряд нейропептидов проявляет широкий ассортимент эффекторов в отношении развивающейся иммунной системы (ее супрессия или активация). Изменения в каждой из этих комплексных информационных систем способны потенцировать ответы друг друга и других органов и в конечном итоге поведение организма [2, 3, 12].

Наше пилотное исследование позволяет предложить метод иммуносигнатуры для дифференциальной диагностики РАС с диагностической значимостью 87,2% и, возможно, расширить наше понимание нарушений при аутизме. Дальнейшая траектория исследований будет направлена на увеличение количества обследуемых детей и оценку применения метода иммуносигнатуры в контексте социальных отношений у детей с РАС.

Благодарности

Работа выполнена в рамках договора о сотрудничестве между Челябинским государственным университетом и Алтайским государственным университетом. Авторы выражают глубокую благодарность С.А. Джонстону, директору института биодизайна университета штата Аризона за предоставление пептидных микрочипов, и директору Российско-американского противоракового центра А.И. Шаповалу за помощь в проведении лабораторной части исследования.

Список литературы / References

1. Bakroon A., Lakshminarayanan V. Visual function in autism spectrum disorders: a critical review. *Clin. Exp. Optom.*, 2016, Vol. 99, pp. 297-308.
2. Baron-Cohen S., Belmonte M.K. Autism: a window onto the development of the social and the analytic brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2005, Vol. 28, pp. 109-126.
3. Baron-Cohen S. Editorial Perspective: Neurodiversity – a revolutionary concept for autism and psychiatry. *J. Child. Psychol. Psychiatry*, 2017, Vol. 58, no. 6, pp. 744-747.
4. Bolstad B. preprocessCore: A collection of pre-processing functions. R package version 1.42.0. 2018, <https://github.com/bmbolstad/preprocessCore>.
5. Brown L.D., Cai T.T., DasGupta A. Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science*, 2001, Vol. 16, no. 2, pp. 101-117.
6. Cohen I.R. Real and artificial immune systems: computing the state of the body. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 7, pp. 569-574.
7. DiCicco-Bloom E., Lord C., Zwaigenbaum L., Courchesne E., Dager S.R., Schmitz C., Schultz R.T., Crawley J., Young L.J. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J. Neurosci.*, 2006, Vol. 26, no. 26, pp. 6897-6096.
8. Drăghici S. Statistics and data analysis for microarrays using R and Bioconductor. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2012. 1026 p.
9. Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A.J., Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang J.Y., Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.*, 2004, Vol. 10, no. 5, R80.
10. Gentleman R., Carey V., Huber W., Hahne F. genefilter: methods for filtering genes from high-throughput experiments. R package version 1.62.0. 2018, <https://github.com/Bioconductor/genefilter>.
11. Hahne F., Huber W., Gentleman R., Seth Falcon S. Bioconductor case studies. Springer Science & Business Media, 2010. 284 p.
12. Heuer L., Ashwood P., Schauer J., Goines P., Krakowiak P., Hertz-Picciotto I., Hansen R., Croen L.A., Pessah I.N., van de Water J. Reduced levels of immunoglobulin in children with autism correlates with behavioral symptoms. *Autism Research*, 2008, Vol. 1, no. 5, pp. 275-283.
13. Huber W., Carey V.J., Gentleman R., Anders S., Carlson M., Carvalho B.S., Bravo H.C., Davis S., Gatto L., Girke T., Gottardo R., Hahne F., Hansen K.D., Irizarry R.A., Lawrence M., Love M.I., MacDonald J., Obenchain V., Ole's A.K., Pag's H., Reyes A., Shannon P., Smyth G.K., Tenenbaum D., Waldron L., Morgan M. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Met.*, 2015, Vol. 12, no. 2, pp. 115-121.
14. Madi A., Hecht I., Bransburg-Zabary S., Merbl Y., Pick A., Zucker-Toledano M., Quintana F.J., Tauber A.I., Cohen I.R., Ben-Jacob E. Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 34, pp. 14484-14489.
15. Madi A., Bransburg-Zabary S., Kenett D.Y., Ben-Jacob E., Cohen I.R. The natural autoantibody repertoire in newborns and adults: a current overview. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012, Vol. 750, pp. 198-212.
16. Meltzer A., van de Water J. The role of the immune system in autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology*, 2016, Vol. 42, no. 1, pp. 284-298.
17. Mouthon L., Lacroix-Desmazes S., Nobrega A., Barreau C., Coutinho A., Kazatchkine M.D. The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life. *Scand. J. Immunol.*, 1996, Vol. 44, no. 3, pp. 243-251.
18. Ousley O., Cermak T. Autism spectrum disorder: defining dimensions and subgroups. *Curr. Dev. Disord. Rep.*, 2014, Vol. 1, no. 1, pp. 20-28.
19. Qiu X., Wu H., Hu R. The impact of quantile and rank normalization procedures on the testing power of gene differential expression analysis. *BMC Bioinformatics*, 2013, Vol. 14, no. 124, pp. 1-10.
20. Quintana F.J., Cohen I.R. The natural autoantibody repertoire and autoimmune disease. *Biomed. Pharmacother.*, 2004, Vol. 58, no. 5, pp. 276-281.
21. Quintana F.J., Hagedorn P.H., Elizur G., Merbl Y., Domany E., Cohen I.R. Functional immunomics: Microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, Vol. 101, pp. 14615-14621.
22. Quintana F.J., Merbl Y., Sahar E., Domany E., Cohen I.R. Antigen-chip technology for accessing global information about the state of the body. *Lupus*, 2006, Vol. 15, no. 7, pp. 428-430.
23. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013.
24. Restrepo L., Stafford P., Magee D.M., Johnston S.A. Application of immunosignatures to the assessment of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 2011, Vol. 70, no. 2, pp. 286-295.
25. Restrepo L., Stafford P., Johnston S.A. Feasibility of an early Alzheimer's disease immunosignature diagnostic test. *J. Neuroimmunol.*, 2013, Vol. 254, no. 1-2, pp. 154-60.
26. Robinson W.H. Antigen arrays for antibody profiling. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, Vol. 10, pp. 67-72.

27. Singh S., Stafford P., Schlauch K.A., Tillett R.R., Gollery M., Johnston S.A., Khaiboullina S.F., de Meirleir K.L., Rawat S., Mijatovic T., Subramanian K., Palotás A., Lombardi V.C. Humoral immunity profiling of subjects with myalgic encephalomyelitis using a random peptide microarray differentiates cases from controls with high specificity and sensitivity. *Mol. Neurobiol.*, 2018, Vol. 55, no. 1, pp. 633-641.
28. Stafford P., Cichacz Z., Woodbury N.W., Johnston S.A. Immunosignature system for diagnosis of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, no. 30, pp. E3072-E3080.
29. Sykes K.F., Legutki J.B., Stafford P. Immunosignaturing: a critical review. *Trends Biotechnol.*, 2013, Vol. 31, no. 1, pp. 45-51.
30. Wills S., Cabanlit M., Bennett J., Ashwood P., Amaral D., van de Water J. Autoantibodies in autism spectrum disorders (ASD). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2007, Vol. 1107, pp. 79-91.
31. Zaman S., Yazdani U., Deng Y., Li W., Gadad B.S., Hynan L., Karp D., Roatch N., Schutte C., Nathan Marti C., Hewitson L., German D.C. A search for blood biomarkers for autism: peptoids. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 14, no. 6, 19164. doi: 10.1038/srep19164.

Авторы:

Филиппова Ю.Ю. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Нохрин Д.Ю. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Бурмистрова А.Л. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии, декан биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Filippova Yu. Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Nokhrin D. Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Burmistrova A. L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Dean, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 30.06.2018
Принята к печати 19.09.2018

Received 30.06.2018
Accepted 19.09.2018

КРАСИТЕЛИ В ЛЕКАРСТВАХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ

Аляхнович Н.С., Новиков Д.К.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск,
Республика Беларусь

Резюме. Имеются данные о различных эффектах пищевых красителей иммунопатогенного характера. Их употребление в составе пищевых продуктов и лекарственных средств индуцирует гиперчувствительность, что расценивается как побочное действие лекарств или непереносимость пищевых веществ. Оценка влияния красителей пищи и лекарств на систему иммунитета проводилась у 68 пациентов с хроническими аллергическими заболеваниями вне обострения и 23 здоровых лиц. Провокационная пероральная проба поставлена с 2 мг титана диоксида (TiO_2) в порошке или 2 мг тартразина в составе пшеничной муки, обработанной при температуре приготовления пищи, или в желатиновой капсуле, содержащей в составе 0,2 мг титана диоксида. Забирались ротовая жидкость и/или венозная кровь натощак и через 40 минут после пробы. Исследовалась пероксидазная активность ротовой жидкости и экспрессия маркеров CD203c и IgE на базофилах крови. Цельную кровь 20 пациентов с аллергопатологией инкубировали 3 и 24 часа с 0,001% и 0,01% смесью растворов тартразина, кармуазина, понсо, сансета, TiO_2 с определением уровня интерлейкина 17 (IL-17) в надосадочной жидкости. Пероксидазная активность ротовой жидкости увеличивалась на 30% и более в 30% случаев проб с тартразином и пшеничной мукой у пациентов с аллергией (в 12,5% случаев у здоровых лиц), в 44% – с TiO_2 у пациентов с аллергией (в 22% случаев у здоровых лиц), в 63% – с тартразином и TiO_2 в составе белой желатиновой капсулы у пациентов с аллергией (у здоровых не отмечалось, $p = 0,047$). В 44% увеличивалось и в 50% случаях снижалось число $\text{IgE}^+\text{CD203c}^+$ базофилов после пробы с TiO_2 в группе пациентов с аллергией, по сравнению с 22% повышения и 22% снижения у здоровых ($p = 0,007$). Более низкая концентрация смеси красителей (0,001%) индуцировала секрецию IL-17 в надосадочной жидкости у всех 20 пациентов с аллергическими заболеваниями, предельно допустимая концентрация (0,01%) раствора реже – у 40% обследованных ($p = 0,0002$). Секретция IL-17 под действием обеих концентраций была выше, чем в контрольных пробах ($p < 0,05$). Таким образом, красители пищи и лекарств проявляют иммуномодулирующую активность как у пациентов с аллергическими заболеваниями (чаще), так и у здоровых лиц. Обнаружена взаимосвязь положительной пероральной пробы с пищевыми красителями тартразином и титана диоксидом, повышением пероксидазной активности ротовой жидкости и повышением количества $\text{IgE}^+\text{CD203c}^+$ базофилов, $\text{IgE}^{\text{bright}}$ базофилов и секрецией IL-17 под влиянием этих красителей.

Ключевые слова: тартразин, титана диоксид, иммуномодуляторы, пероксидазная активность, активация базофилов, интерлейкин-17

DYES IN FOOD AND DRUGS ARE POTENTIAL IMMUNOMODULATORS

Aliakhnovich N.S., Novikov D.K.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Abstract. There are some data about various immunopathology effects of food dyes. Their use in food and medicines may induce hypersensitivity, which is regarded as a side effect of drugs, or intolerance to food

Адрес для переписки:

Аляхнович Наталья Сергеевна
УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»
210023, Республика Беларусь, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27.
Тел.: 8 (212) 57-53-80.
E-mail: alyahnovich@bk.ru

Address for correspondence:

Aliakhnovich Natalia S.
Vitebsk State Medical University
210023, Republic of Belarus, Vitebsk, Frunze ave., 27.
Phone: 7 (212) 57-53-80.
E-mail: alyahnovich@bk.ru

Образец цитирования:

Н.С. Аляхнович, Д.К. Новиков «Красители в лекарствах и пищевых продуктах – потенциальные иммуномодуляторы» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 313–322.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-313-322

© Аляхнович Н.С., Новиков Д.К., 2019

For citation:

N.S. Aliakhnovich, D.K. Novikov “Dyes in food and drugs are potential immunomodulators”, *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 313–322. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-313-322

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-313-322

substances. Evaluation of the effect caused by colorants for food and drugs upon immunity was conducted in 68 patients with chronic allergic diseases beyond exacerbation, and 23 healthy individuals. The provocative peroral testing was performed with 2 mg of titanium dioxide (TiO_2) in the form of powder, or 2 mg of tartrazine in wheat flour processed at a cooking temperature, or in a gelatin capsule containing 0.2 mg of titanium dioxide. Oral fluid and/or venous blood were collected in fasting state, and 40 minutes after the test. Peroxidase activity of oral fluid, and expression of CD203c, as well as IgE marker on blood basophils were studied. Blood samples of twenty patients with allergopathology was incubated for 3 and 24 hours with 0.001% and 0.01% mixture of Tartrazine, Carmoazine, Ponso, Sunset, TiO_2 solutions followed by determination of IL-17 levels in supernates. Peroxidase activity of oral fluid increased by 30% or more in 30% of cases after Tartrazine and wheat flour provocation in the patients with allergies (12.5% in healthy persons); by 44% after TiO_2 in allergic patients (22% of cases in healthy individuals); by 63% after tartrazine and TiO_2 embedded in white gelatin capsule in patients with allergies (no reaction in healthy persons, $p = 0.047$). The number of $\text{IgE}^+\text{CD203c}^+$ basophils was increased in 44% cases and decreased in 50% cases after provocation with TiO_2 in the group of allergic patients as compared with 22% increase and 22% decrease in healthy subjects ($p = 0.007$). Lower concentration of the dye mixture (0.001%) caused induction of IL-17 secretion in the supernate in all 20 patients with allergic diseases. The maximal permissible concentration (0.01%) of the dye solution induced this effect less often, i.e., in 40% of the cases ($p = 0.0002$). Secretion of IL-17 under the influence of either dye concentration was higher than in the control samples ($p < 0.05$). Thus, the dyes added to food and drugs may exert immunomodulatory activity in patients with allergic diseases more often than in healthy individuals. Significant correlations are revealed between positive provocation test induced by food dyes tartrazine and titanium dioxide, increased oral fluid peroxidase activity, elevated number of $\text{IgE}^+\text{CD203c}^+$ basophils and IgE bright basophils, and increased IL-17 secretion under the influence of these dyes.

Keywords: tartrazin, titanium dioxide, immunomodulators, peroxidase activity, basophil activation, interleukin 17

Введение

На сегодняшний день в производстве пищевых продуктов, лекарственных средств и косметики используется более 2500 различных добавок [19]. Для придания цвета этим продуктам широко применяются синтетические красители, обозначаемые символами E100-182 в Европейском союзе.

В отношении биобезопасности пищевых красителей часто используются устаревшие данные, а результаты новейших исследований считают недостаточными для пересмотра существующих правил [22]. Так, касательно группы азокрасителей с функциональной ненасыщенной группой $\text{N} = \text{N}$ и ароматическими кольцами имеются наблюдения их токсического, мутагенного и канцерогенного действия [21, 32]. Тартразин описывается как вещество, связывающееся с ДНК, токсикант для лимфоцитов, промотер липидной пероксидации, блокатор супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы у мышей в дозе 500 мг/кг [21], а в других исследованиях, — как безопасный краситель, при использовании в допустимых дозах [24]. Азокраситель сансет желтый проявляет генотоксичные свойства в экспериментальных моделях с влиянием на обучение и память, оказывает иммуномодулирующий эффект [21].

Употребление пищевых красителей и других добавок в составе лекарственных средств и пищевых продуктов может индуцировать иммунопатологические реакции, в том числе гиперчувствительность, что часто расценивается как побочное действие лекарств или непереносимость пищевых веществ. С ростом распространенности аллергических и иммунологических заболеваний

актуально изучение механизмов развития алиментарной аллергии на пищевые красители [9, 17]. Большинство красителей стойко связываются с пищевыми продуктами и лекарствами, что создает новые аллергенные комплексы [17].

Описаны аллергические реакции на пищевые красители, поступающие перорально, в виде крапивниц и отеков Квинке, ринитов, бронхоспазмов, желудочно-кишечных расстройств и диарей [9, 17]. Пищевые добавки и красители, поступившие *per os*, могут вызывать нарушение работы желчного пузыря по данным ультразвукового исследования [7].

Красители тартразин, титана диоксид и другие изменяют фагоцитарную активность лейкоцитов человека (угнетение и стимуляция фагоцитоза, переваривания, метаболизма) [15], усиливают экспрессию CD25 на лимфоцитах и модулируют секрецию лейкоцитами цитокинов — $\text{TNF}\alpha$ и IL-6 [13].

К азокрасителям (тартразину, индигокармину, понсо, кармуазину, солнечному желтому) у детей с бронхиальной астмой и атопическим дерматитом обнаружены IgE -антитела в крови, коррелирующие с сенсibilизацией гранулоцитов [16], а также IgA , IgE , IgG -антитела в слюне [14].

Применение пищевых добавок контролируется Европейским управлением по безопасности пищи (EFSA) и Администрацией по пище и лекарствам США (FDA) [21]. На территории Республики Беларусь, Российской Федерации и Республики Казахстан требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств устанавливает Технический регламент таможенного союза 029/2012 [18]. В вышеуказанных документах при-

ведены «предельно допустимые дозы» добавок в отдельных продуктах, основанные на оценке токсичности максимально-разовых значений при кратковременном действии примесей на животных. Предельная допустимая концентрация исторически определяется санитарно-гигиеническими нормативами, базирующимися на экспериментальных испытаниях на животных и обоснованных морфоструктурными изменениями в органах и тканях [12]. В то время как требования к степени аллергенности и иммуногенности факторов окружающей среды и веществ, поступающих перорально, на несколько порядков выше, чем их предельно допустимые концентрации. Более того, при комбинированном воздействии нескольких факторов и веществ (добавки, входящие в состав лекарств и пищи) значительно увеличивается конечный эффект влияния на реактивность организма [10]. Необходимо принимать во внимание суммарное поступление пищевых добавок разными путями и длительность их воздействия в течение всей жизни человека.

Некоторые красители, запрещенные в одних странах, продолжают использоваться в других. Так, широко применяющийся в Европе кармуазин, запрещен в США, потому что описан как агент модифицирующих вторичную структуру белков (таких как сывороточный альбумин), одновременно с изменением ДНК в моделях на быках [21].

Заслуживает отдельного внимания исследование свойств красителя титана диоксида (TiO_2), обозначаемого E171. Он входит в состав большинства белых таблеток, капсул лекарств и широко используется в пищевой (кондитерские изделия, сладости, присыпки белого цвета, жевательные резинки, напитки, молочные продукты, сыры, приправы), косметической промышленности (тени для век, солнцезащитные крема, зубная паста), а также в строительстве (краски, цемент), бумажном производстве и в других отраслях, в качестве светорассеивающего белого пигмента и фотокатализатора [4, 36]. Учитывая, что TiO_2 не растворяется в воде и в разбавленных минеральных кислотах, его долгое время считали нетоксичным инертным веществом, неспособным всасываться или накапливаться в тканях [11].

Воздействие TiO_2 на организм человека приближено к реальности в моделях его поступления в желудочно-кишечный тракт. Доказано образование агломератов (диаметр > 1000 нм) наночастиц TiO_2 с белками и получение стабильных суспензий при смешивании его с панкреатином и экстрактом желчи [20], а также при добавлении TiO_2 к панкреатическому соку, плазме и сыворотке крови добровольцев [2]. Вероятно, его хорошая способность образовывать комплексы с белками биологических жидкостей обуславливает патогенные эффекты TiO_2 на организм человека [2].

Интерес к TiO_2 усилился в связи с доказательством того, что 17–36% его частиц в пищевых про-

дуктах входят в диапазон наноразмерных (менее 100 нм в диаметре) [31, 36], а среднее количество ежедневно потребляемого TiO_2 в США и странах Европы колеблется от 0,5 до 1,1 мг/кг/массы тела для взрослых и до 1,4 мг/кг/массы тела (максимально 3,2 мг/кг/массы тела) у детей. При любых пищевых привычках наибольшее количество TiO_2 приходится на детское население от 3 до 9 лет и на подростков [31]. Следует отметить, что, кроме пищевых продуктов, TiO_2 входит в состав таблеток и капсул в количестве до 3,6 мг/г, увеличивая ежедневное общее поступление его пероральным путем [3, 31].

Поступая перорально в составе пищевых продуктов и лекарств, TiO_2 влияет на микробиоту кишечника (показан антибактериальный эффект на *E. coli in vitro* [37]), проходит через кишечную слизь [27] и достигает эпителия. Всасывание осуществляется парацеллюлярно, с помощью эндоцитоза, через М-клетки и Пейеровы бляшки, а также при повреждении кишечного эпителия [27, 29]. Описано накопление TiO_2 во внутренних органах, таких как печень, почки, селезенка, легкие и головной мозг в небольших количествах [25]. В нескольких исследованиях показано влияние TiO_2 на развитие патологических процессов, в том числе опухолей [30], воспалительных заболеваний бронхов, бронхиальной астмы [28], а также болезни Крона при поступлении TiO_2 перорально [26, 35].

Для оценки механизмов воздействия TiO_2 , поступающего различными путями, необходимы дополнительные исследования. Помимо ограничений Национального института охраны труда (NIOSH) США, на сегодняшний день нет профессиональных или экологических ограничений поступления TiO_2 в организм человека. В последнем пересмотре EFSA (2016 г.) говорится об отсутствии достаточного количества надежных данных для установления безопасной суточной дозы потребления E171 [23]. Современное понимание биобезопасности TiO_2 основано на экспериментальных исследованиях на животных или клеточных культурах, что требует экстраполяции полученных данных на человека [33].

Накопившиеся данные свидетельствуют о многочисленных эффектах пищевых красителей иммунопатогенного характера. Анализ состояния проблемы указывает на актуальность исследований по изучению аллергенных и иммуномодулирующих свойств красителей, входящих в состав лекарственных средств и продуктов питания.

Целью настоящего исследования являлась оценка влияния красителей пищи и лекарств на систему иммунитета пациентов с хроническими аллергическими заболеваниями вне обострения и здоровых лиц.

Материалы и методы

На базе аллергологического отделения Витебской областной клинической больницы проведе-

ны пероральные провокационные пробы (ППП) с несколькими образцами красителей: 2 мг тартразина в составе 2 г пшеничной муки, обработанные при температуре приготовления пищи (модель пищевого продукта); 2 мг тартразина в белой желатиновой капсуле, содержащей 0,2 мг TiO_2 (модель капсулированного лекарственного средства), а также 2 мг TiO_2 в виде порошка и в составе желатиновой капсулы. Процедура ППП проводилась натощак через 10 минут после ополаскивания рта физиологическим раствором. Испытуемый за 12 часов до ППП не употреблял алкоголь, антигистаминные, глюкокортикостероидные лекарственные средства, не принимал продукты с пищевыми красителями. Ротовая жидкость и/или венозная кровь для исследования забирались исходно и через 40 минут после ППП [5, 6, 41].

Реакция слизистой оболочки ротовой полости на пищевые красители оценивалась по изменению пероксидазной активности ротовой жидкости (ПАРЖ) после ППП. Собранные образцы ротовой жидкости разводили физиологическим раствором, добавляли тетраметилбензидин, останавливали реакцию стоп-реагентом через 10 минут и подсчитывали оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 450 нм [6].

Методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител против IgE, меченых FITC, и CD203c, меченных PE (ThermoFisher Scientific, США), оценивали экспрессию маркеров активации CD203c на базофилах периферической крови и общее количество базофилов, несущих IgE, после ППП с тартразином и TiO_2 . Для этого к 100 мкл гепаринизированной цельной крови добавляли 2,5 мкл раствора тест-системы IgE-203c, аккуратно перемешивали на вортексе и инкубировали 15 минут при комнатной температуре, затем добавляли лизирующий эритроциты раствор и инкубировали при температуре 37 °C еще 10 минут. После добавления 500 мкл буферного раствора проводили фенотипирование [5].

Анализировали влияние красителей на выделение интерлейкина-17 (IL-17) лейкоцитами крови *in vitro*. Для этого цельную кровь пациентов инкубировали при 37 °C с 0,001 и 0,01% смесями взятых в равных частях растворов тартразина, кармуазина, понсо, сансета, титана диоксида в течение 3 и 24 часов. Концентрация смесей выбрана с учетом допустимого суточного поступления пищевых красителей. В надосадочной жидкости с использованием иммуноферментных тест-систем (Invitrogen, BioSource Europe S.A., Бельгия) оценивали уровень IL-17, в сравнении с контрольными пробами [1].

Обследовано 68 пациентов с клиническим диагнозом аллергических заболеваний (бронхиальной астмой, аллергическим ринитом, поллинозом) легкой и средней степеней тяжести вне обострения. Средний возраст составил 36 [33; 39] лет, из них 52 женщины (76%), 16 мужчин (24%).

Этой группе пациентов поставлено 30 ППП с обработанным при температуре приготовления пищи тартразином и пшеничной мукой, 26 проб с тартразином в белой желатиновой капсуле, содержащей TiO_2 , и 16 проб с TiO_2 в виде порошка и в составе желатиновой капсулы с оценкой ПАРЖ, в сравнении с исходной натощак. После 18 пероральных проб с пищевыми красителями (15 — с TiO_2 , 3 — с тартразином и TiO_2 в составе белой желатиновой капсулы) подсчитывали количество IgE и CD203c несущих базофилов в крови, в сравнении с исходным до провокации. Проведено по 10 проб с 3- и 24-часовой инкубацией цельной крови с растворами смеси пищевых красителей с последующим определением в ИФА концентрации IL-17 в надосадочной жидкости, в сравнении с аналогичными пробами с физиологическим раствором.

В группу сравнения включены 23 практически здоровых человека без аллергических заболеваний. Средний возраст составил 31 [24; 37] год, из них 17 женщин (74%), 6 мужчин (26%). Им проведено 8 аналогичных ППП с тартразином и пшеничной мукой, 3 пробы с тартразином и TiO_2 в составе белой желатиновой капсулы, 9 проб с TiO_2 в виде порошка с определением ПАРЖ, в сравнении с исходной натощак. После 9 ППП с TiO_2 определяли экспрессию маркеров IgE и CD203c на базофилах крови, в сравнении с исходной до провокации.

Результаты

Из 68 пациентов с аллергической бронхиальной астмой, аллергическим ринитом и/или поллинозом 51 человек (75%) отмечал также непереносимость некоторых пищевых продуктов с клиникой крапивницы, кожного зуда, бронхоспазма, 17 человек (25%) отрицали связь между приемом пищи и обострениями аллергической симптоматики. По результатам анкетирования 40 человек (59%) указали на пищевые красители как на причинно-значимые аллергены, вызывающие обострения аллергических заболеваний.

У части обследованных лиц после ППП с пищевыми красителями наблюдалось увеличение ПАРЖ, по сравнению с исходной натощак, что, вероятно, связано с выбросом фермента миелопероксидазы из активированных клеток врожденного иммунитета — гранулоцитов полости рта [8]. С помощью ROC-анализа установлен значимый порог прироста ПАРЖ после ППП более 16,6% (чувствительность 42%, специфичность 100%, диагностическая точность (AUC) 0,712, $p = 0,0001$) [6]. С целью увеличения чувствительности теста результаты пробы классифицировались как сомнительные при приросте ПАРЖ на 17–29% включительно, умеренно положительные — на 30–49%, выраженные положительные — на 50–99% и резко выраженные положительные — более 100%.

У обследованных пациентов с хроническими аллергическими заболеваниями пробы с тартра-

зином и пшеничной мукой вызывали прирост ПАРЖ более 16,6% в 33% случаев. Преобладали выраженные реакции с приростом 50-99% (17% от общего числа проб) и резко выраженные результаты ППП с приростом ПАРЖ более 100% (10% от общего числа проб). В 3% случаев отмечались умеренно положительные реакции (прирост 30-50%), в 3% — сомнительный ответ со слабым приростом ПАРЖ (рис. 1).

После пробы с порошком TiO_2 прирост ПАРЖ более 16,6% зарегистрирован в 56% проведенных проб, причем значимый прирост более 30% наблюдался у 44% обследованных (рис. 2).

Ответ на пероральную провокацию смесью тартразина и титана диоксида в белой желатиновой капсуле зарегистрирован в 71% проб, при этом у 63% обследованных пациентов с аллергическими заболеваниями прирост ПАРЖ был выше 30% (рис. 3).

Ответ на тартразин в белой желатиновой капсуле, содержащей TiO_2 , коррелировал с результатом провокационных проб с TiO_2 в порошке (Spearman corr: $R = 79,1\%$). Прирост ПАРЖ после ППП с TiO_2 чаще выявлялся у лиц, имеющих в анамнезе реакции гиперчувствительности на неспецифические раздражители (резкие запахи, сигаретный дым, средства бытовой химии) (Spearman corr: $R = 94,7\%$). Показана связь между отягощенным анамнезом на пищевые красители и наследственностью по аллергопатологии (Spearman corr: $R = 60\%$).

Значимым для выявления аллергопатологии являлось исходное абсолютное количество $\text{IgE}^+\text{CD203c}^+$ базофилов крови более 10 на 30 000 клеток крови и прирост или снижение исходного количества на 30% и более [5].

Количество $\text{IgE}^+\text{CD203c}^+$ базофилов у 18 пациентов с аллергическими заболеваниями после ППП с пищевыми красителями значимо (более, чем на 30%) изменялось у 94% обследованных: увеличивалось у 8 человек (44%), снижалось у 9 человек (50%), по сравнению с исходным до пробы, у одного человека (6%) прирост был небольшим (+11%). Изменение числа высокоэкспрессирующих иммуноглобулин Е базофилов ($\text{IgE}^{\text{bright}}$ базофилы) до и после ППП более чем на 30% наблюдалось у 8 пациентов (44%) (у 3 повысилось, у 5 снизилось).

Далее мы оценили связь изменения ПАРЖ и экспрессии IgE и CD203c на базофилах у пациентов, выполнивших ППП с TiO_2 в порошке или тартразином и TiO_2 в составе белой желатиновой капсулы. В эту группу включены 14 человек с аллергическими заболеваниями (8 женщин, 6 мужчин), их средний возраст составил 38 [30; 46] лет. У 7 из них после ППП с пищевыми красителями наблюдался значимый прирост ПАРЖ ($p = 0,004$), в сравнении с 7 пациентами с отрицательным результатом провокационного теста.

У пациентов с достоверным приростом ПАРЖ после перорального теста с красителями количество $\text{IgE}^+\text{CD203c}^+$ базофилов (M-U: $p = 0,039$)

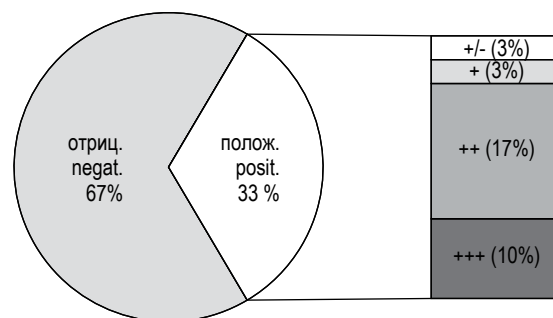


Рисунок 1. Результаты пероральных проб с тартразином и пшеничной мукой и число положительных проб разной степени выраженности (в % от общего числа проб)

Примечание. +/- – сомнительные, + – умеренно положительные, ++ – выраженные, +++ – резко выраженные пробы.

Figure 1. Oral provocation with tartrazine and wheat flour results and the number of positive samples of the various severity (in % of the total samples)

Note. +/-, doubtful; +, moderately positive; ++, expressed; +++, high expressed samples.

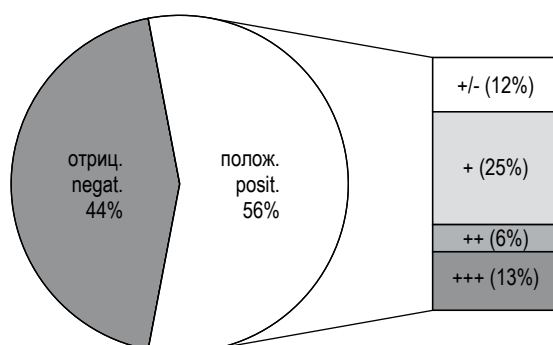


Рисунок 2. Результаты пероральных проб с титана диоксидом и число положительных проб разной степени выраженности

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Oral provocation with titanium dioxide results and the number of positive samples of the various severity

Note. As for Figure 1.

и $\text{IgE}^{\text{bright}}$ базофилов (M-U: $p = 0,035$) было исходно выше, чем у больных с отрицательным результатом ППП (рис. 4).

После ППП с красителями у пациентов со значимым приростом ПАРЖ количество высокоэкспрессирующих IgE базофилов было выше, чем у лиц с отрицательным пероральным тестом (M-U: $p = 0,035$) (рис. 5).

Обнаружена сильная корреляция между приростом ПАРЖ после пероральной пробы с тартразином и количеством $\text{IgE}^+\text{CD203c}^+$ базофилов (Spearman corr: $R = 82,9\%$), а также приростом

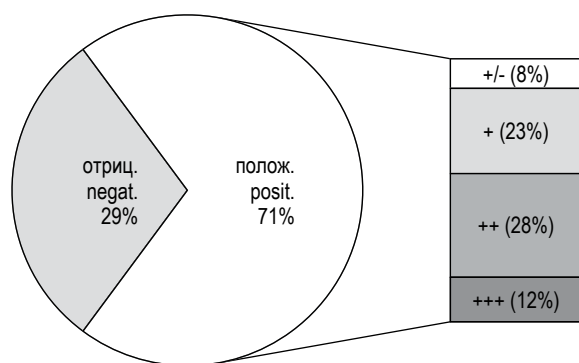


Рисунок 3. Результаты пероральных проб с тартразином и титана диоксидом в белой желатиновой капсуле и число положительных проб разной степени выраженности

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Oral provocation with tartrazine and titanium dioxide in a white gelatin capsule results and the number of positive samples of the various severity

Note. As for Figure 1.

пероксидазной активности после пероральной пробы с TiO_2 и исходным относительным количеством базофилов, высокоэкспрессирующих IgE (Spearman corr: $R = 68,5\%$).

После инкубации цельной крови со смесью тартразина, кармуазина, понсо, сансета, титана диоксида уровень IL-17 в надосадочной жидкости увеличивался или не изменялся. Количество IL-17 в пробах с физиологическим раствором через 3 и 24 часа инкубации было сопоставимо между собой. Время инкубации не влияло на степень секреции IL-17 в пробах со смесью красителей.

Более низкая концентрация смеси красителей (0,001%) во всех пробах индуцировала секрецию IL-17 клетками цельной крови, предельно допустимая концентрация (0,01%) раствора реже — у 40% обследованных ($p = 0,0002$).

Количество IL-17 в пробах с цельной кровью и 0,001% раствором смеси пищевых красителей, по сравнению с физиологическим раствором, достоверно увеличилось как после 3 часов инкубации (Wilcoxon Matched Pairs Test: $p = 0,005$) (рис. 6), так и после 24 часов инкубации (T-test for Dependent Samples: $p = 0,006$).

У 4 человек из 6 с отягощенным анамнезом по пищевым добавкам, ответивших приростом ПАРЖ более 16,6% и значительным увеличением количества $\text{IgE}^+\text{CD203c}^+$ базофилов и $\text{IgE}^{\text{bright}}$ базофилов после ППП с тартразином и титана диоксидом (от +88% до +200% по $\text{IgE}^+\text{CD203c}^+$ базофилов и от +20% до +108% прироста по $\text{IgE}^{\text{bright}}$ базофилам), также выявлено повышение IL-17 в надосадочной жидкости после инкубации цельной крови со смесью красителей в течение 3 и 24 часов.

В группе сравнения (практически здоровые) ППП с тартразином и пшеничной мукой оказалась умеренно положительной в 1 случае (12,5% из 8 выполненных), в 3-х случаях (37,5%) зарегистрировано небольшое увеличение ПАРЖ (17-29%). На провокацию с титана диоксидом приростом ПАРЖ +78% и +87% отреагировали 2 человека (22 % из 9 выполненных в контрольной группе), еще две пробы зарегистрированы как сомнительные (ПАРЖ 17-29%). 3 пробы с тартразином в белой желатиновой капсуле, содержащей TiO_2 , не вызывали прироста ПАРЖ у здоровых обследованных.

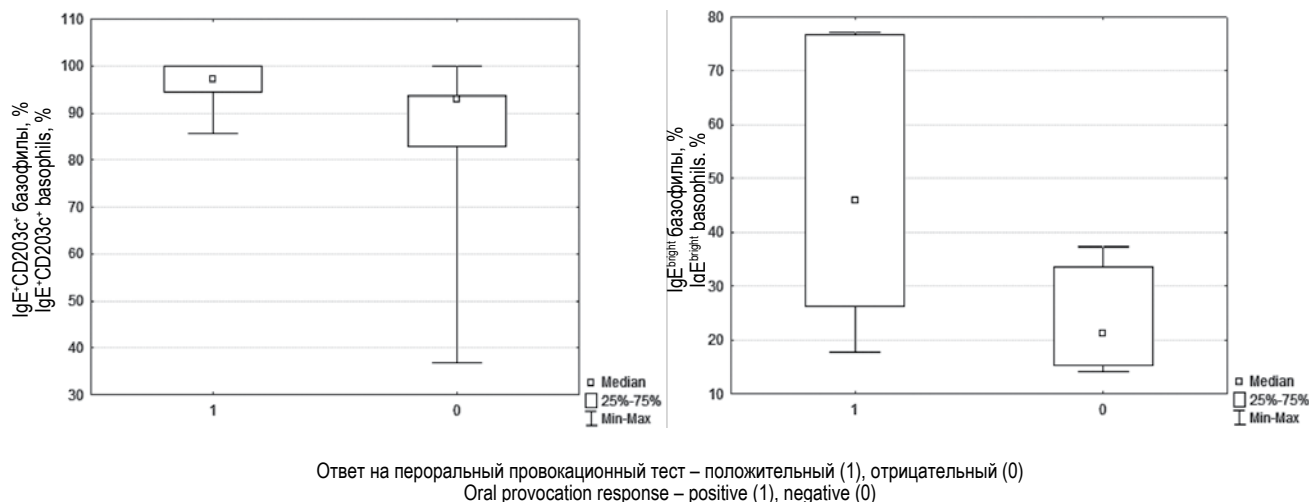


Рисунок 4. Исходно большее количество $\text{IgE}^+\text{CD203c}^+$ базофилов (слева) и $\text{IgE}^{\text{bright}}$ базофилов (справа) у больных со значимым приростом пероксидазной активности ротовой жидкости после пероральной провокации с пищевыми красителями (1), по сравнению с пациентами с отрицательной пробой (0)

Figure 4. Initially higher levels of $\text{IgE}^+\text{CD203c}^+$ basophils (left) and $\text{IgE}^{\text{bright}}$ basophils (right) in patients with a significant increase in oral peroxidase activity after the oral provocation with food dyes (1), compared to the patients with negative samples (0)

Количество $IgE^{+}CD203c^{+}$ базофилов у обследованных контрольной группы после ППП с красителями значимо (более чем на 30%) увеличивалось у 2 человек (22% из 9 обследованных) и снижалось у 2 человек (22%), по сравнению с исходным значением до пробы, у 5 человек (56%) значимых колебаний не отмечалось. Достоверное изменение числа IgE^{bright} базофилов (более 30%) наблюдалось у 5 человек (56%) (у 1 — повысились, у 4 — снизились).

Оба вида исследований (ротовой жидкости и фенотипа клеток крови) до и после провокационного теста с пищевыми красителями проведены у 5 человек группы сравнения (3 женщины, 2 мужчины), средний возраст 37 [17; 56] лет. У 3 из них ППП с красителями была положительной, у 2 — отрицательной. Прирост ПАРЖ у них достоверно различался (T-test, $p = 0,02$). В группеотивших значимым приростом ПАРЖ на ППП с тартразином и TiO_2 количество $IgE^{+}CD203c^{+}$ базофилов после пероральной пробы повышалось более чем на 30% в 2 случаях, снижалось — в 1, число IgE^{bright} базофилов существенно понижалось в 1 случае, у лиц с отрицательным пероральным тестом оба показателя снижались.

Таким образом, в группе здоровых лиц в 12,5% случаев выявлено увеличение ПАРЖ на тартразин в составе пшеничной муки и в 22% случаев на TiO_2 . На тартразин в желатиновой капсуле, содержащей TiO_2 реакций не выявлено, в отличие от лиц с аллергопатологией ($p = 0,047$). Увеличение или снижение экспрессии IgE^{+} и $CD203c^{+}$ на базофилах крови у здоровых лиц после ППП с красителями наблюдалось значительно реже (в 44% случаев), чем у лиц с аллергопатологией вне обострения (в 94% случаев) ($p = 0,007$).

Обсуждение

Ранее мы показали связь между контактом с причинно-значимым аллергеном слизистой оболочки ротовой полости у чувствительных пациентов и повышением пероксидазной активности ротовой жидкости [6, 8, 11]. Нами разработана безопасная, простая в выполнении провокационная проба с минимальным количеством аллергена в двух вариациях — пероральной и полоскательной (орально-буккальный способ), которая оценивалась как положительная при увеличении пероксидазной активности ротовой жидкости более 30% от исходной [8, 11]. Подобный ответ на провокацию обнаруживался в случае сенсibilизации к пищевым, бытовым, лекарственным аллергенам, химическим веществам, стоматологическим материалам, солям металлов, а также при неспецифической гиперчувствительности к ирритантам и поллютантам [8, 11]. Метод рекомендовал себя как чувствительный и высокоспецифичный для выявления аллергических и псевдоаллергических реакций на аллергены и неспецифические агенты [6].

В этом исследовании показана корреляция между приростом пероксидазной активности ро-

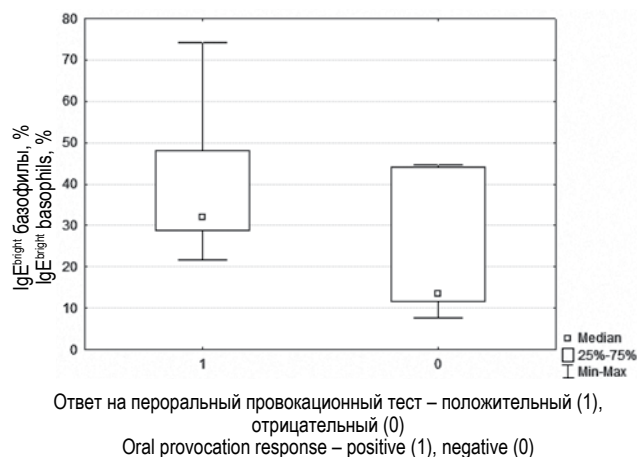


Рисунок 5. Количество IgE^{bright} базофилов после провокационной пробы с пищевыми красителями у пациентов со значимым приростом пероксидазной активности ротовой жидкости (1) и с отрицательной реакцией (0)

Figure 5. The amount of IgE^{bright} basophils after a provocative test with food dyes in patients with a significant increase in oral peroxidase activity (1) and with a negative reaction (0)

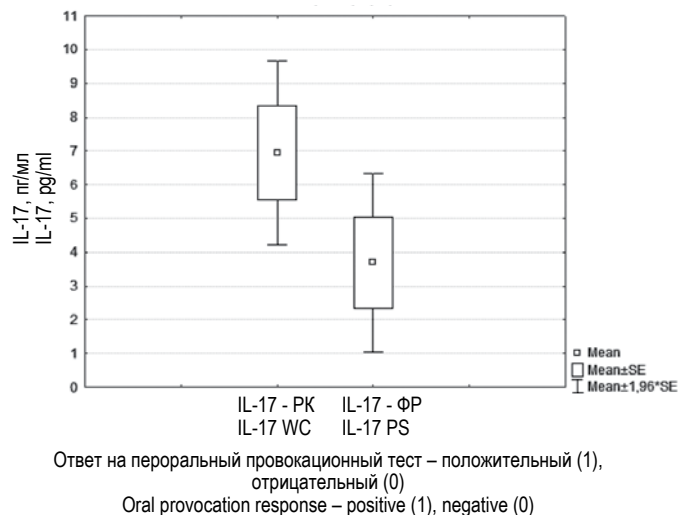


Рисунок 6. Увеличение количества IL-17 в пробах с 0,001% раствором смеси пищевых красителей, по сравнению с контролем через 3 часа инкубации
Примечание. РК — рабочая концентрация (0,001%) смеси красителей, ФР — физиологический раствор.

Figure 6. The IL-17 increasing in the samples with 0.001% solution of the food dyes mixture, compared to the control after 3 hours of incubation

Note. RK is the working concentration (0.001%) of the dyes' mixture, and FR is saline.

товой жидкости после пероральной пробы с пищевыми красителями тартразином и/или TiO_2 и изменением количества $IgE^{+}CD203c^{+}$ базофилов и базофилов, высокоэкспрессирующих IgE (IgE^{bright}). Обнаруженная связь указывает на участие как базофилов, экспрессирующих активационные молекулы, так и нейтрофилов, выде-

ляющих миелопероксидазу в ротовую жидкость, в реакциях на пищевые красители.

Кроме того, иммунотропность исследуемых красителей подтверждена в реакции стимуляции лимфоцитов [1]. Смесь красителей тартразина, кармуазина, понсо, сансета, титана диоксида в допустимой концентрации индуцирует секрецию IL-17 у пациентов с аллергопатологией.

В группе пациентов с аллергическими реакциями на красители пищи и лекарств в анамнезе обнаружено одновременно значимое увеличение пероксидазной активности ротовой жидкости и количества IgE⁺CD203c⁺ и IgE^{bright} базофилов после провокационной пробы с тартразином и/или титана диоксидом, а также выявлено повышение IL-17 в надосадочной жидкости после инкубации цельной крови со смесью красителей в течение 3 и 24 часов. Это указывает на связь положительной провокационной пробы с красителями тартразином и титана диоксидом с вовлечением нейтрофилов ротовой полости и активацией базофилов крови с секрецией IL-17 лимфоцитами крови.

Интересным фактом является обнаружение реакции нейтрофилов слизистой оболочки ротовой полости и изменения фенотипа клеток крови после провокации с тартразином и/или TiO₂ в группе здоровых лиц. Положительный ответ на провокационную пробу с красителями у них регистрировался реже, чем у обследованных с аллергопатологией. Ранее также показана большая встречаемость гиперчувствительности к красителям у пациентов с аллергическими болезнями по сравнению со здоровыми людьми [5, 6, 13]. Однако существенная частота положительных реакций на красители у здоровых лиц указывает на возможные контакты с ними при употреблении пищи, лекарств, косметики и последующее развитие гиперчувствительности к ним. Так, TiO₂ способен индуцировать первичный иммунный ответ в культуре мононуклеаров с выделением цитокинов IL-1β, IL-6 и TNFα [34].

Следовательно, красители пищи и лекарств оказывают иммуномодулирующие эффекты *in vivo* и *in vitro* как у пациентов с аллергопатологией (чаще), так и у здоровых лиц, активируя нейтрофилы, базофилы и секрецию IL-17 — основного

цитокина, вырабатываемого Т-хелперами 17 типа и участвующего в регуляции иммунного ответа.

Выводы

1. Обнаружена высокая иммуномодулирующая активность красителей тартразина и титана диоксида, входящего в состав лекарственных средств и пищи, как у людей с хроническими аллергическими заболеваниями вне обострения, так и у здоровых лиц.

2. Красители титана диоксид в порошке (в 44% случаев) и тартразин в составе пшеничной муки (в 30% случаев) и желатиновой капсулы (в 63% случаев) при поступлении перорально вызывают повышение пероксидазной активности ротовой жидкости более 30% у обследованных пациентов с аллергопатологией; у здоровых людей — титана диоксид в порошке в 22%, тартразин в составе пшеничной муки в 12,5%, а также оказывают иммуномодулирующие эффекты на экспрессию маркера активации CD203c и рецепторов к IgE на базофилах крови в 94% случаев у пациентов с аллергическими заболеваниями и в 44% в группе сравнения ($p = 0,0007$).

3. У пациентов с аллергическими заболеваниями вне обострения, ответивших приростом пероксидазной активности ротовой жидкости на провокацию красителями, наблюдалось исходно большее количество активированных CD203c⁺ ($p = 0,035$) и IgE^{bright} базофилов ($p = 0,035$) и отмечалось увеличение числа IgE^{bright} базофилов крови после пероральной провокационной пробы ($p = 0,035$).

4. Раствор смеси равных количеств красителей тартразина, кармуазина, понсо, сансета, титана диоксида в концентрации 0,001% вызывал секрецию интерлейкина-17 клетками цельной крови после 3 и 24 часов инкубации *in vitro* у всех обследованных с бронхиальной астмой и аллергическим ринитом вне обострения.

5. Обнаружена взаимосвязь повышения уровня пероксидазной активности ротовой жидкости, увеличения количества IgE⁺CD203c⁺ и IgE^{bright} базофилов крови и секреции интерлейкина-17 при положительной пероральной пробе на пищевые красители тартразин и титана диоксид.

Список литературы / References

1. Аляхнович Н.С. Влияние пищевых красителей на секрецию цитокинов клетками крови больных аллергическими заболеваниями // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2016. № 3. С. 31-40. [Aliakhnovich N.S. Food dyes effect on the blood cells cytokine secretion in allergic patients. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2016, no. 3, pp. 31-40. (In Russ.)]
2. Аляхнович Н.С., Новиков Д.К. Взаимодействие диоксида титана с биологическими средами организма // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2016. № 1. С. 37-42. [Aliakhnovich N.S., Novikov D.K. Titanium dioxide interaction with the organism biological fluids. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2016, no. 1, pp. 37-42. (In Russ.)]
3. Аляхнович Н.С., Новиков Д.К. Пищевой краситель и фармацевтик диоксид титана как патоген // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2015. № 1. С. 71-77. [Food dye and pharmaceuticals titanium dioxide as a pathogen. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2015, no. 1, pp. 71-77. (In Russ.)]

4. Аляхнович Н.С., Новиков Д.К. Распространенность, применение и патологические эффекты диоксида титана // Вестник Витебского государственного медицинского университета, 2016. Т. 15, № 2. С. 7-16. [Aliakhnovich N.S., Novikov D.K. Prevalence, application and pathological effects of titanium dioxide. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Vitebsk State Medical University*, 2016, Vol. 15, no. 2, pp. 7-16. (In Russ.)]
5. Аляхнович Н.С., Янченко В.В. Влияние провокационной пробы с аллергеном на IgE⁺CD203c⁺ базофилы крови // Вестник Витебского государственного медицинского университета, 2016. Т. 15, № 3. С. 60-67. [Aliakhnovich N.S., Yanchanka U.V. The effect of provocative test with the allergen on the IgE⁺CD203c⁺ blood basophils. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Vitebsk State Medical University*, 2016, Vol. 15, no. 3, pp. 60-67. (In Russ.)]
6. Аляхнович Н.С., Янченко В.В., Новиков Д.К. Метод диагностики аллергии на пищевые красители по увеличению пероксидазной активности в слюне // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2015. № 3. С. 108-114. [Aliakhnovich N.S., Yanchanka U.V., Novikov D.K. The method of food dye allergy diagnosing by increasing saliva peroxidase activity. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2015, no. 3, pp. 108-114. (In Russ.)]
7. Забелло С.Г. Связь сенсибилизации к пищевым добавкам с патологией билиарной системы // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2000. № 1. С. 87-90. [Zabello S.G. Connection the sensibilization to food additives with biliary sistem pathology. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2000, no. 1, pp. 87-90. (In Russ.)]
8. Карпук И.Ю., Новиков Д.К. Увеличение уровня миелопероксидазы в ротовой жидкости после орально-буккальной провокации с компонентами стоматологических материалов у пациентов с их непереносимостью // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 4. С. 647-654. [Karpuk I.Yu., Novikov D.K. Increase of the level of mieloperoxidase in the moulder liquid after oral-buccal provocation with components of dental materials in patients with their inequality. *Rossiyskiy Immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 4, pp. 647-654. (In Russ.)]
9. Лусс Л.В. Пищевые аллергены и пищевые добавки: роль в формировании пищевой аллергии и пищевой непереносимости // Эффективная фармакотерапия. Аллергология. Иммунология, 2014. № 2 (33). С. 12-18. [Luss L.V. Food allergens and food additives: the role in the development of food allergy and food intolerance. *Effektivnaya farmakoterapiya. Allergologiya. Immunologiya = Effective Pharmacotherapy. Allergology and Immunology*, 2014, no. 2 (33), pp. 12-18. (In Russ.)]
10. Новиков Д.К. Клиническая аллергология. Справочное пособие. Минск: Вышэйшая школа, 1991. 511 с. [Novikov D.K. Clinical allergology. Reference manual]. Minsk: Higher School, 1991. 511 p.
11. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Карпук И.Ю., Лазаренко Л.Л., Смирнова О.В., Аляхнович Н.С. Транс-буккальный метод диагностики аллергии по увеличению пероксидазной активности в слюне // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2015. № 4. С. 35-43. [Novikov D.K., Novikov P.D., Karpuk I.Yu., Lazarenko L.L., Smirnova O.V., Alyahnovich N.S. An intrabuccal method of diagnosing allergy by increasing peroxidase activity in the saliva. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2015, no. 4, pp. 35-43. (In Russ.)]
12. Постановление Минздрава РБ от 12.12.2012 № 195 Об утверждении Санитарных норм и правил «Требования к пищевым добавкам, ароматизаторам и технологическим вспомогательным средствам» [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: : <http://pravo.newsby.org/belarus/postanov1/pst276/index.htm>. Дата обращения: 09.07.2018. [Decree of the Ministry of Health of the Republic of Belarus of 12.12.2012 No. 195 On the approval of the Sanitary Norms and Regulations «Requirements for food additives, flavors and technological aids.» [Electronic resource]. Access mode: <http://pravo.newsby.org/belarus/postanov1/pst276/index.htm>, accessed on 09.07.2018].
13. Титова Н.Д. Иммуномодулирующие эффекты пищевых красителей: стимуляция лимфоцитов и индукция секреции цитокинов // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2011. № 2. С. 81-90. [Titova N.D. Immunomodulatory effects of food dyes: stimulation of lymphocyte and induction of cytokine secretion. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2011, no. 2, pp. 81-90. (In Russ.)]
14. Титова Н.Д. Клиническое значение sIgA-антител в слюне к пищевым добавкам у детей с аллергическими заболеваниями // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2011. № 2. С. 63-69. [Titova N.D. The clinical significance of sIgA-antibodies in saliva to food additives in children with allergic diseases. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2011, no. 2, pp. 63-69. (In Russ.)]
15. Титова Н.Д. Модуляция фагоцитоза под влиянием пищевых красителей / Н.Д. Титова // Российский иммунологический журнал, 2011. Т. 5 (14), № 2. С. 156-162. [Titova N.D. Modulation of phagocytosis under the influence of food dyes. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*. 2011, Vol. 5 (14), no. 2, pp. 156-162. (In Russ.)]
16. Титова Н.Д., Новиков П.Д. Определение спектра антител и сенсибилизации гранулоцитов к пищевым красителям у больных бронхиальной астмой // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2013. № 2. С. 47-54. [Titova N.D., Novikov P.D. Determination of the spectrum of antibodies and sensitization of granulocytes to food dyes in patients with bronchial asthma. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2013, no. 2, pp. 47-54. (In Russ.)]
17. Титова Н.Д. Пищевые добавки как алиментарные аллергены // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2008. № 2. С. 41-46. [Titova N.D. Food addition as alimentary allergens. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2008, no. 2, pp. 41-46. (In Russ.)]

18. Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств: ТС 029/2012: принят 20.07.2012 / Евразийская экономическая комиссия, 2012. № 58. 308 с. [Safety requirements for food additives, flavors and technological aids: TC 029/2012: adopted on 20.07.2012. *Evrasiyskaya ekonomicheskaya komissiya = Eurasian Economic Commission*, 2012, no. 58. 308 p. (In Russ.)]
19. Brannen A.L., Haggerty R.J. Food additives. Ed. Brannen A.L., Davidson P. M., Salminen S., Thorngate III J.H. Marcel Dekker, 2001, pp. 1-9.
20. Brun E., Barreau F., Veronesi G., Fayard B., Sorieul S., Chanéac C., Carapito C., Rabilloud T., Mabondzo A., Herlin-Boime N., Carrière M. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, *in vivo* and *in vitro* gut epithelia. *Part Fibre Toxicol.*, 2014, Vol. 11, no. 13, pp. 1-16.
21. Carrocho M., Barreiro M.F., Morales P., Ferreira I. C.F.R. Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, Vol. 13, iss. 4, pp. 377-399.
22. EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food). Statement on Allura Red AC and other sulphonated mono azo dyes authorised as food and feed additives. *EFSA J.*, 2013, Vol. 11, no. 6, pp. 3234-3259.
23. EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food). Scientific opinion on the re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive. *EFSA J.*, 2016, Vol. 14, no. 9, pp. 4545-4628.
24. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the appropriateness of the food azo-colours Tartrazine (E 102), Sunset Yellow FCF (E 110), Carmoisine (E 122), Amaranth (E 123), Ponceau 4R (E 124), Allura Red AC (E 129), Brilliant Black BN (E 151), Brown FK (E 154), Brown HT (E 155) and Litholrubine BK (E 180) for inclusion in the list of food ingredients set up in Annex IIIa of Directive 2000/13/EC. *EFSA J.*, 2010, Vol. 8, no. 10, pp. 1778-1803.
25. Elgrabli D., Beaudouin R., Jbilou N., Floriani M., Pery A., Rogerieux F., Lacroix G. Biodistribution and clearance of TiO₂ nanoparticles in rats after intravenous injection. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 4, e0124490. doi:10.1371/journal.pone.0124490.
26. Hongbo S., Magaye R., Castranova V., Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.*, 2013, no. 10, pp. 15-48.
27. Jones K., Morton J., Smith I., Jurkschat K., Harding A-H., Evans G. Human *in vivo* and *in vitro* studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Lett.*, 2015, Vol. 233, no. 2, pp. 95-101.
28. Lee K.P., Trochimowicz H.J., Reinhardt C.F. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1985, no. 10, pp. 179-192.
29. MacNicol A., Kelly M., Aksoy H., Kramer E., Bouwmeester H., Chaudhry Q. A study of the uptake and biodistribution of nano-titanium dioxide using *in vitro* and *in vivo* models of oral intake. *J. Nanopart. Res.*, 2015, Vol. 17, no. 2, p. 66.
30. Participants IRSIE. The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. *Inhal. Toxicol.*, 2000, no. 10, pp. 1-17.
31. Ropers M.-H., Terrisse H., Mercier-Bonin M., Humbert B. titanium dioxide as food additive, application of titanium dioxide. Magdalena Janus, IntechOpen, 2017. 20 p.
32. Sasaki Y.F., Kawaguchi S., Kamaya A., Ohshita M., Kabasawa K., Iwama K., Taniguchi K., Tsuda S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.*, 2002, Vol. 519, no. 1-2, pp. 103-119.
33. Tedja R., Lim M., Amal R., Marquis C. Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. *ACS Nano*, 2012, no. 10, pp. 4083-4093.
34. Thomas P., Ighaut G., Wollenberg A., Cadosch D., Summer B. Allergy or Tolerance: Reduced inflammatory cytokine response and concomitant IL-10 production of lymphocytes and monocytes in symptom-free titanium dental implant patients. *BioMed Res. Int.*, 2013, Vol. 2013, 539834. doi: 10.1155/2013/539834.
35. Warheit D.B., Webb T.R., Reed K.L., Frerichs S., Sayes C.M. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology*, 2007, no. 10, pp. 90-104.
36. Weir A., Westerhoff P., Fabricius L., Goetz N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ. Sci. Technol.*, 2012, no. 10, pp. 2242-2250.
37. Zhukova L.V., Kiwi J., Nikandrov V.V. TiO₂ nanoparticles suppress *Escherichia coli* cell division in the absence of UV irradiation in acidic conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, no. 97, pp. 240-247.

Авторы:

Аляхнович Н.С. — к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Новиков Д.К. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Authors:

Aliakhnovich N.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology with a course of Postgraduate Training Faculty, Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Novikov D.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Immunology and Allergology with a course of Postgraduate Training Faculty, Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Поступила 10.07.2018

Отправлена на доработку 19.09.2018

Принята к печати 10.10.2018

Received 10.07.2018

Revision received 19.09.2018

Accepted 10.10.2018

СИСТЕМНАЯ ЭНЗИМОТЕРАПИЯ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Чурюкина Э.В., Сизякина Л.П.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. В работе представлены результаты исследования эффективности и безопасности использования системной энзимотерапии препаратом Вобэнзим в комплексном лечении больных гормонозависимой бронхиальной астмой тяжелого течения. Установлено, что включение в комплексную базисную терапию тяжелой гормонозависимой бронхиальной астмы системной энзимотерапии Вобэнзима сопровождается улучшением параметров функционального состояния бронхов, уменьшением циркулирующих иммунных комплексов, устойчивому нарастанию уровня кортизола. Полученные данные убеждают в безопасности включения препарата системной энзимотерапии в комплексное лечение больных тяжелой гормонозависимой бронхиальной астмой, повышении эффективности базисной терапии, улучшении контроля над течением заболевания, позволяют выработать показания к назначению Вобэнзима больным тяжелой бронхиальной астмой.

Ключевые слова: бронхиальная астма, системная энзимотерапия, вобэнзим, гормонозависимость

SYSTEMIC ENZYME THERAPY IN COMPLEX TREATMENT OF PATIENTS WITH SEVERE BRONCHIAL ASTHMA

Churyukina E.V., Sizyakina L.P.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The present paper presents the results of the study concerning effectiveness and safety of systemic enzyme Wobenzym therapy in complex treatment of patients with severe hormone-dependent bronchial asthma. Inclusion of systemic Wobenzym therapy in the complex basic treatment of severe hormone-dependent bronchial asthma was found to be accompanied by improving functional parameters state of bronchi, reduction of circulating immune complexes, stable increase in cortisol levels. The results presume safety of systemic enzyme-based therapy applied for combined treatment in the patients with severe hormone-dependent bronchial asthma, improved effectiveness of basic therapy with better management of the disease, thus suggesting indications for Wobenzym administration in the patients with severe bronchial asthma.

Keywords: bronchial asthma, systemic enzyme therapy, Wobenzym, hormone-dependence

Адрес для переписки:

Чурюкина Элла Витальевна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29.
Тел.: 8 (918) 553-18-77.
E-mail: echuryukina@mail.ru

Address for correspondence:

Churyukina Ella V.
Rostov State Medical University
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don, Nakhichevan lane, 29.
Phone: 7 (918) 553-18-77.
Fax: 7 (863) 201-43-90.
E-mail: echuryukina@mail.ru

Образец цитирования:

Э.В. Чурюкина, Л.П. Сизякина «Системная энзимотерапия в комплексном лечении больных тяжелой бронхиальной астмой» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 323-332.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-323-332
© Чурюкина Э.В., Сизякина Л.П., 2019

For citation:

E.V. Churyukina, L.P. Sizyakina "Systemic enzyme therapy in complex treatment of patients with severe bronchial asthma", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 323-332.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-323-332

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-323-332

Введение

Препараты системной энзимотерапии (СЭТ) представляют собой целенаправленно составленную смесь пероральных ферментов растительного и животного происхождения и обладают, наряду с местным, широким спектром общих воздействий на организм [12, 17]. Метод системной энзимотерапии основан на кооперативном терапевтическом воздействии целенаправленно составленных смесей гидролитических ферментов растительного и природного происхождения. В отличие от традиционной общей ферментной терапии действие системных ферментов не ограничивается тонким кишечником, а предполагает протеолитическую активность в крови и лимфе и тем самым влияние на целый ряд жизненно важных процессов [11, 15, 16, 20, 25]. В биохимических процессах энзимы, выступая в роли катализаторов, являются триггерами химических реакций [22], которые без их участия не развивались бы вообще или протекали бы медленно.

Учитывая, что бронхиальная астма — это иммунозависимое заболевание [7, 8, 10, 14], патогенетической основой которого является хроническое воспаление [3, 4, 7, 14], весьма интересным является изучение действия энзимов на течение данного патологического процесса и их влияния на иммунную систему больных с тяжелым течением БА.

Наличие противовоспалительного, фибринолитического, противоотечного, иммуномодулирующего свойств, а также доказанного влияния на систему гомеостаза [11, 15, 16, 22, 25, 26] препарата системной энзимотерапии «Вобэнзим» определило его использование в данной работе с целью повышения эффективности комплексного лечения больных гормонозависимой бронхиальной астмой тяжелого течения.

Цель исследования — оценить эффективность и безопасность использования системной энзимотерапии вобэнзимом в комплексном лечении больных гормонозависимой бронхиальной астмой тяжелого течения.

Материалы и методы

Работу выполняли на базе кафедры клинической иммунологии и аллергологии Ростовского государственного медицинского университета (РостГМУ), научно-практического комплекса НУПК «Клиническая иммунология» РостГМУ, аллергологического отделения ГУЗ «Областная больница № 2» (г. Ростов-на-Дону).

В исследовании приняли участие 55 пациентов, страдающих тяжелой гормонозависимой бронхиальной астмой, в возрасте от 18 до 55 лет. Все пациенты получали стандартную терапию: базисную (ИГКС в высоких дозах и β_2 -агонисты длительного действия (ДДБА), пероральные стероиды в дозе 15–20 мг/сут в пересчете на пред-

низолон) [6] и симптоматическую (β_2 -агонисты короткого действия, метилксантины, отхаркивающие). Больные были разделены на две группы: контрольная группа — 35 пациентов, получавшие только стандартную терапию, и группа, с оптимизацией стандартного лечения препаратом системной энзимотерапии — вобэнзимом по схеме: 5 драже внутрь не менее чем за 30 минут до еды, не разжевывая, запивая водой (200 мл) три раза в день [13, 15, 16, 19] — 20 больных. Пациенты обеих групп имели сопутствующие заболевания ЖКТ (гастрит, гастродуоденит, колит).

Результаты оценивали по динамике клинико-функционального, аллергологического, иммунологического обследования.

Всем пациентам проводилась спирометрия, с исследованием объема форсированного выдоха (ОФВ1), жизненной емкости легких (ЖЕЛ), форсированных экспираторных потоков на уровне крупных, средних, мелких бронхов (МОС₂₅, МОС₅₀, МОС₇₅) в виде процента от должных величин; с использованием аппарата SPIROSFT-3000 (Fukuda Denshi Co., Ltd., Япония). Для мониторинга течения астмы в течение всего периода наблюдения больные ежедневно заполняли дневники индивидуального наблюдения, а также регистрировали показатели пикфлоуметрии (максимальная скорость выдоха утренняя и вечерняя (PEFy/v)) (Mini-Wright peak flow meter, Clement Clarke International, Эдинбург, Великобритания, Ferraris medical is a FERRARIS Group Company). Пикфлоуметрия проводилась дважды в сутки (утром и вечером) [18, 19]. Степень выраженности симптомов оценивалась пациентами по 5-балльной шкале (Gina 2002) (0 — отсутствие симптомов; 1 — легкая степень проявления; 2,3 — умеренная; 4, 5 — выраженная). Исследуемым больным бронхиальной астмой проводилась бронхоскопия (ФТБС) санационная и диагностическая со взятием бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ). Бронхоальвеолярный лаваж проводили во время бронхоскопии под местной анестезией фиброскопом с соблюдением следующих условий: температура вводимого физиологического раствора 37 °С, pH7–7,3, силиконизированные пробирки, хранение полученной жидкости БАЛ в ледяной бане (не более 1 часа) [2]. Жидкость БАЛ направлялась в цитологическую лабораторию. ФТБС проводили в исходном состоянии и через 6, 12 месяцев с использованием бронхоскопа OLYMPUSBFTYPE (Япония). На проведение трехкратной бронхоскопии имелось информированное согласие больных.

У всех исследуемых больных оценивали гормональный статус (определяли уровень кортизола в сыворотке крови). Исследование проводили микропланшетным фотометром для иммуноферментного анализа Stattax 2100 в исходном состоянии, через 14 суток и через 6 месяцев.

Для получения назальных смывов применяли следующую методику: стерильным зондом проводили забор содержимого верхних отделов среднего носового хода и полученный материал смывали в пробирку стерильным физиологическим раствором объемом 0,5 мл (модифицированный метод получения «назофарингиальных смывов», рекомендованный приказом Минздрава РФ от 21 марта 2003 г. № 117) [2].

Аллергологическое обследование включало в себя сбор общеклинического и аллергологического анамнеза, определение уровня IgE общего в сыворотке крови.

В работе был использован комплекс иммунологических методов, характеризующих состояние основных звеньев иммунной системы. Оценка иммунного статуса проводилась согласно методическим рекомендациям [9] и включала определение путем иммунофенотипирования мембранных антигенов лимфоцитов периферической крови ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, $CD19^+$, $CD25^+$, $CD95^+$ с использованием моноклональных антител (АО «Сорбент», НИИ иммунологии МЗ РФ по методу А.В. Филатова и соавт., 1990) на цитометре Coulter XL; содержание иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови определяли по Манчини, (1965); уровень циркулирующих иммунных комплексов определяли по Гриневич Ю.А., (1981), интенсивность кислородзависимого метаболизма в НСТ-тесте (Пинегин Б.В., 1989). Оценивалось количество Th_1 , Th_2 методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к внутриклеточным цитокинам ($IFN\gamma$, IL-4) и одновременным фенотипированием клеток [5, 18]. Содержание цитокинов в сыворотке периферической крови и назальных смывах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа реактивами CytImmune Sciences (США) (IL-2, IL-4) и наборами ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург) ($IFN\gamma$).

Содержание общего IgE определяли иммуноферментным методом с использованием «IgE-ИФА-Бест-стрип» производства АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Математическую обработку полученных данных проводили на ПК Microsoft Windows XP professional, используя программу Microsoft Excel, Open. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [1].

Результаты

На фоне проводимого курса системной энзимотерапии вобэнзимом у 4 (20%) больных на 3-4 день терапии отмечалось кратковременное (2-3 дня) ухудшение состояния, заключающееся в учащении приступов удушья, кашля. Возможно, это было связано с так называемым «феноменом запоздания проявления лечебного эффекта или временного обострения клинических прояв-

лений в ранние сроки терапии» вобэнзимом [12, 21, 23]. Остальные наблюдавшиеся больные хорошо переносили лечение препаратом, осложнений со стороны клинического течения заболевания, отмечено не было. Побочные эффекты в виде кратковременных диспептических явлений, урчания в животе отмечалось у двух больных (10%). У одной больной (5%) с сопутствующим хроническим колитом, страдающей запорами отмечалась нормализация стула после трех недель приема вобэнзима. После проведенного курса энзимотерапии отмечалось значительное улучшение самочувствия больных, течения заболевания. Катамнестическое наблюдение позволило выявить, что у 3 больных (15%) наблюдаемых в опытной группе с периода включения в исследование не отмечалось обострений в течение 12 месяцев. У 15 (75%) больных за годовой период наблюдения обострения отмечались, но более редкие (до 2-3 раз в год), легко купировались, не требовали стационарного лечения (больные были госпитализированы в плановом порядке для повторного комплексного обследования в конце периода наблюдения). У 2 больных (10%) отмечались госпитализации в связи с обострением в течение 12 месяцев наблюдения, однако они были выписаны на 15-е сутки пребывания в стационаре, что существенно сократило срок лечения.

Анализ результатов проведенной терапии во всех группах показал: у пациентов первой (контрольной) группы через 12 месяцев наблюдения отмечалась тенденция к улучшению контроля тяжелой БА, хотя существенных изменений в течении заболевания в целом не обнаружено (табл. 1). В то время как курсы системной энзимотерапии в комплексном лечении больных тяжелой гормонозависимой БА, создавая условия для лучшего контроля заболевания, способствуют позитивной динамике течения болезни (табл. 1).

Применение стандартной базисной терапии у больных контрольной группы тяжелой гормонозависимой БА не изменило частоту и тяжесть интеркуррентных инфекций (у 100% обследуемых больных), что требовало проведения антибактериальной, противовирусной, противогрибковой терапии. В то время как курсы системной энзимотерапии дали положительные клинические результаты, которые выражались в достоверном снижении количества эпизодов ОРВИ в год ($10,36 \pm 1,73$ — до лечения, $7,61 \pm 0,88$ — на фоне лечения вобэнзимом), смягчении клинических проявлений острой вирусной инфекции, сокращении продолжительности бронхообструктивного синдрома на фоне ОРВИ ($10,05 \pm 1,65$ — до лечения, $8,22 \pm 1,66$ — на фоне лечения вобэнзимом), уменьшении частоты осложнений ($18,5 \pm 3,2\%$ — до лечения, $15,87 \pm 2,22\%$ — на фоне лечения вобэнзимом), уменьшении очагов хронической инфекции (100% — до лечения, 71,4% — на фоне

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕЧЕНИЯ ТЯЖЕЛОЙ ГОРМОНОЗАВИСИМОЙ БА У ПАЦИЕНТОВ ДВУХ ГРУПП ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF SEVERE HORMONE-DEPENDENT ASTHMA PATIENTS OF TWO GROUPS AFTER TREATMENT

Показатель Indicator	До лечения Before treatment	Контрольная группа Control group (n = 35)	Вобэнзим группа Wobenzym group (n = 20)
Число обострений БА в год Number of exacerbations of asthma per year	4,60±0,24	4,03±0,74	3,63±0,43*
Число госпитализаций в год Number of hospitalizations per year	2,64±0,13	2,58±0,39	2,01±0,25*
Число дней госпитализаций Number of days of hospitalization	23,20±1,01	22,45±1,15*	14,55±1,45*
Число вызовов СМП в год Number of calls emergency medical care in the year	7,81±2,10	6,94±2,17*	4,44±2,62*
Число курсов увеличения дозы системных ГКСГ в год Number of courses increasing the dose of oral corticosteroids per year	2,68±0,15	2,56±0,42*	0,43±0,19*

Примечание. * – статистически достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

Note. *, statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the control group.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМ ТЕРАПИИ НА СТРУКТУРУ ЭНДОБРОНХИТОВ ПАЦИЕНТОВ ДВУХ ГРУПП ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ФТБС (%)

TABLE 2. EFFECT OF DIFFERENT THERAPY REGIMENS ON THE STRUCTURE OF ENDOBRONCHITIS PATIENTS OF TWO GROUPS ACCORDING TO THE RESULTS OF BRONCHOSCOPY (%)

Группы Groups		Катаральный Catarrhal (%)	Слизистый Mucous (%)	Слизисто- гнойный Mucopurulent (%)	Атрофический Atrophic (%)	Не обнаружен Not found (%)
Контрольная группа Control group	До Before	14 (40,0%)	11 (31,4%)	10 (28,6%)	0	0
	После After	7 (20,0%)	10 (28,6%)	16 (45,7%)	2 (5,7%)	0
Вобэнзим Wobenzym	До Before	9 (45,0%)	7 (35,0%)	4 (20,0%)	0	0
	После After	14 (70,0%)	4 (20,0%)	2 (10,0%)	0	0

лечения вобэнзимом). Снижение частоты эпизодов инфекции, как следствие проведенной системной энзимотерапии, отразилось и на частоте применения антибиотикотерапии в период обострения интеркуррентных инфекций, что проявилось снижением числа лиц с дисбактериозом (16,0% – до лечения, 2,85% – после энзимотерапии вобэнзимом), что можно объяснить усилением вобэнзимом действия эубиотиков при коррекции дисбактериоза.

Отмечена положительная динамика клинических проявлений тяжелой БА у пациентов, получивших системную энзимотерапию: 4,8±0,2 – до лечения, 2,6±0,9 баллов – на фоне лечения вобэнзимом; контрольная группа – 4,7±0,9 до ле-

чения, 3,9±0,8 – после лечения; ночные симптомы 3,2±0,4 – до лечения, 2,0±0,7 – на фоне лечения вобэнзимом; контрольная группа 3,2±0,8 – до лечения, 3,0±0,5 – после лечения. Аналогичная тенденция прослеживалась и в изменении потребности в β_2 -агонистах короткого действия.

Анализ показателей функционального состояния бронхов в процессе стандартного базисного лечения больных тяжелой гормонозависимой БА, а также на фоне терапии вобэнзимом выявил улучшение бронхиальной проходимости (пиковая скорость выдоха (ПСВ) возросла у пациентов на фоне лечения вобэнзимом до 70,1±2,2%, кон-

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМ ТЕРАПИИ НА СТРУКТУРУ ЭНДОБРОНХИТОВ ПАЦИЕНТОВ ДВУХ ГРУПП ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ФТБС (%)

TABLE 3. EFFECT OF DIFFERENT THERAPY REGIMENS ON THE STRUCTURE OF ENDOBRONCHITIS PATIENTS OF TWO GROUPS ACCORDING TO THE RESULTS OF BRONCHOSCOPY (%)

Группы Groups		Катаральный Catarrhal (%)	Слизистый Mucous (%)	Слизисто- гнойный Mucopurulent (%)	Атрофический Atrophic (%)	Не обнаружен Not found (%)
Контрольная группа Control group	До Before	14 (40,0%)	11 (31,4%)	10 (28,6%)	0	0
	После After	7 (20,0%)	10 (28,6%)	16 (45,7%)	2 (5,7%)	0
Вобэнзим Wobenzym	До Before	9 (45,0%)	7 (35,0%)	4 (20,0%)	0	0
	После After	14 (70,0%)	4 (20,0%)	2 (10,0%)	0	0

трольная — до $56,9 \pm 4,0\%$; ЖЕЛ — до $88,7 \pm 2,4\%$, $68,7 \pm 2,4\%$ соответственно).

Благодаря проведению системной энзимотерапии, у части пациентов стало возможным снизить дозу системных глюкокортикоидов, причем у некоторых из этого числа — отказаться от приема системных ГКСГ и перейти на базисную терапию ИГКС в высоких дозах (табл. 2). В то время как у больных контрольной группы, несмотря на адекватный подход к ведению данного контингента больных, снизить дозу пероральных глюкокортикоидов не удалось ни одному больному (табл. 2).

Анализ динамики бронхоскопических данных и цитоморфологии бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) больных тяжелой гормонозависимой БА, получавших СЭТ, в сравнении с больными контрольной группы выявил снижение выраженности воспалительного процесса, что проявилось положительной динамикой бронхоскопической картины: уменьшение доли слизисто-гнойных эндобронхитов и степени выраженности катарального эндобронхита (табл. 3), а также данными цитологического исследования БАЛЖ (табл. 3) (уменьшение цитологических признаков воспаления в группе вобэнзима: значительное снижение общего количества клеток ($0,55 \pm 0,22 \times 10^6/\text{мл}$) и, в частности, нейтрофилов в бронхоальвеолярном пространстве ($31,8 \pm 10,4\%$)). В то время как у больных контрольной группы позитивных изменений выявлено не было (клеточность лаважа: $0,66 \pm 0,13 \times 10^6/\text{мл}$ — после лечения, $0,71 \pm 0,22 \times 10^6/\text{мл}$ — исходно; нейтрофилы: $43,6 \pm 10,4\%$ — после лечения, $46,4 \pm 11,5\%$ — исходно).

При проведении анализа динамики уровня кортизола в сыворотке крови больных исследуемых групп было выявлено, что у пациентов контрольной группы отмечалось значительное снижение

($33,81 \pm 11,79$ нмоль/л) к концу периода наблюдения и так исходно низкого ($68,78 \pm 12,67$ нмоль/л) показателя. В то время как у больных группы на фоне проведения системной энзимотерапии вобэнзимом — стабильная тенденция к улучшению показателей кортизола к концу периода наблюдения ($150,56 \pm 20,64$ нмоль/л).

Анализ данных иммунологического обследования пациентов двух групп позволил определить наиболее значимые изменения, характерные для состояния иммунной системы в зависимости от проводимой терапии.

Динамические изменения показателей клеточного звена иммунной системы контрольной группы больных тяжелой гормонозависимой БА за 12 месяцев наблюдения характеризуются монотонностью (табл. 4). В то время как у больных, получавших системную энзимотерапию, выявлено увеличение популяции зрелых лимфоцитов, экспрессирующих на мембране CD3⁺ антиген ($69,6 \pm 2,8\%$ — вобэнзим); достоверное повышение содержания лимфоцитов, обладающих хелперно-индукторной активностью ($40,6 \pm 3,2\%$ — вобэнзим). В отношении клеток, экспрессирующих CD25⁺ антиген (рецептор к IL-2) у пациентов контрольной группы и в группе вобэнзима — не отмечалось выраженных изменений. В то же время отмечалось достоверное уменьшение числа CD95⁺ лимфоцитов (рецепторов маркирующих готовность к апоптозу): вобэнзим — $2,6 \pm 0,7\%$ (табл. 4). При этом в контрольной группе данный параметр иммунного статуса по-прежнему оставался повышенным ($6,2 \pm 0,5\%$).

Анализ динамики цитокинового статуса у исследуемых больных обнаружил снижение повышенных фоновых значений IL-2, IL-4, IFN γ в сыворотке крови и назальных смывах у пациентов, получивших системную энзимотерапию вобэнзимом через 2 недели (как следствие проведенной в период обострения усиленной противо-

ТАБЛИЦА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ БОЛЬНЫХ ДВУХ ГРУПП (КОНТРОЛЬНОЙ (К), n = 35 И ПОЛУЧАВШИХ ВОБЭНЗИМ (В), n = 20) ТЯЖЕЛОЙ ГОРМОНОЗАВИСИМОЙ БА ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 4. COMPARATIVE DYNAMICS INDICATORS OF CELLULAR LINK OF IMMUNE SYSTEM OF PATIENTS OF TWO GROUPS (CONTROL (K), n = 35 AND TREATED WITH WOBENZYM (B), n = 20) OF THE SEVERE HORMONE-DEPENDENT ASTHMAFTER TREATMENT

Показатель Indicator	Группы Groups	Исходно Initially	Через 14 дней After 14 days	Через 6 месяцев After 6 months	Через 12 месяцев After 12 months
CD3 ⁺ , %	К	55,7±3,20	53,4±2,40	52,3±2,70	***50,7±3,10**
	В	53,5±4,20	54,2±3,10	68,4±2,70*	***69,6±2,80*
CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /л	К	1,16±0,12	1,12±0,11	1,09±0,14	1,06±0,15**
	В	1,11±0,16	1,13±0,21	1,19±0,19*	1,21±0,18*
CD4 ⁺ , %	К	32,6±4,10	32,5±4,00	33,2±3,80	***32,8±3,20
	В	32,9±2,40	36,6±2,60	42,2±2,10*	***40,6±3,20*
CD4 ⁺ , × 10 ⁹ /л	К	0,68±0,06	0,68±0,07	0,69±0,04	0,68±0,05
	В	0,69±0,09	0,71±0,06	0,73±0,07*	0,71±0,05*
CD8 ⁺ , %	К	26,1±1,30	26,6±1,80	27,1±1,50	***26,7±1,10
	В	26,6±2,20	25,9±3,10	22,8±3,20	***23,3±2,70
CD8 ⁺ , × 10 ⁹ /л	К	0,54±0,05	0,55±0,06	0,56±0,06	***0,56±0,04
	В	0,56±0,08	0,54±0,07	0,39±0,06	***0,40±0,05*
CD16 ⁺ , %	К	8,3±1,20	7,9±1,40	6,40±2,10**	***6,31±1,30**
	В	8,1±1,30	8,8±1,40	11,88±2,00*	***12,22±2,10*
CD16 ⁺ , × 10 ⁹ /л	К	0,17±0,01	0,16±0,04	0,13±0,03**	***0,13±0,02**
	В	0,17±0,03	0,18±0,04	0,29±0,06*	***0,30±0,04*
CD25 ⁺ , %	К	2,6±0,70	3,1±0,50	3,4±0,80**	***3,8±0,40**
	В	2,6±0,80	2,6±0,70	2,8±0,60	***2,7±0,50
CD25 ⁺ , × 10 ⁹ /л	К	0,05±0,02	0,06±0,02	0,07±0,03	***0,08±0,02**
	В	0,05±0,02	0,05±0,02	0,05±0,03	***0,05±0,02
CD95 ⁺ , %	К	5,3±0,80	5,5±0,80	6,0±0,90**	***6,2±0,50**
	В	5,6±0,80	3,6±0,40	2,8±0,60*	***2,6±0,70*
CD95 ⁺ , × 10 ⁹ /л	К	0,11±0,01	0,11±0,02	0,12±0,07	***0,13±0,06**
	В	0,11±0,03	0,07±0,02	0,05±0,03*	***0,04±0,02*
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	К	1,25±0,42	1,24±0,65	1,23±0,58	***1,25±0,27
	В	1,24±0,40	1,41±0,90	1,85±0,50*	***1,74±0,40*
Th ₁ , %	К	11,03±1,62	11,59±1,46	11,36±2,04	***10,71±1,89**
	В	10,01±1,75	11,96±1,65	13,54±2,04*	***14,43±1,71*
Th ₂ , %	К	16,98±2,11	15,09±2,05	17,08±2,22	***17,02±2,53
	В	17,02±2,24	17,02±2,28	14,09±2,01*	***12,05±2,05*

Примечание. * – статистически достоверное различие показателей до и после лечения вобэнзимом при $p < 0,05$; ** – статистически достоверное различие показателей в начале и в конце периода наблюдения в контрольной группе при $p < 0,05$; *** – статистически достоверные различия показателей после проведенного лечения между контрольной группой и группой получавших вобэнзим при $p < 0,05$.

Note. *, statistically significant difference of indicators before and after treatment with Wobenzym at $p < 0.05$; **, statistically significant difference of indicators at the beginning and end of the observation period in the control group at $p < 0.05$; ***, statistically significant differences in the rate after treatment between the control group and the group receiving Wobenzym at $p < 0.05$.

воспалительной терапии ГКСТ). При этом изменения носили следующий характер: уровень IL-2 имел тенденцию к снижению (в 1,7 раза) в сы-

воротке крови и увеличению в назальных смывах (в 2,3 раза), тенденцию к повышению уровня IFN γ в сыворотке крови (до 6,96±1,02 пг/мл)

и назальных смывах (до $8,88 \pm 3,24$ пг/мл), а также снижение IL-4 в сыворотке крови (в 1,7 раз) и в назальных смывах (в 2 раза) (табл. 5).

Сопоставительный анализ динамики показателей гуморального звена у исследуемых больных выявил: снижение у пациентов, получивших системную энзимотерапию изначально повышенного уровня содержания CD20⁺ лимфоцитов (вобэнзим – до $8,36 \pm 0,44\%$). В то же время в группе получавших вобэнзим наблюдалось статистически достоверное снижение IgG ($10,88 \pm 1,72$ г/л), IgA ($1,40 \pm 0,17$ г/л) и IgE общего в сыворотке крови ($70,8 \pm 17,2$ г/л), а уровень IgM существенных изменений не претерпел (табл. 6). Обращало внимание достоверное снижение ЦИК, при этом была обнаружена интересная особенность: через 2 недели после начала энзимотерапии отмечалось резкое увеличение данного показателя в сыворотке крови ($160,69 \pm 46,4$ у. е., до лечения – $129,8 \pm 32,7$ у. е.), а после окончания курса энзимотерапии – достоверное и значительное его снижение ($62,4 \pm 12,4$ у. е.) (что может быть объяс-

нено способностью системных энзимов расщеплять не только циркулирующие в крови ИК, но и фиксированные в тканях [22, 25]. Анализ динамики показателей гуморального звена иммунной системы у больных контрольной группы не выявил значимых изменений (табл. 6).

Анализ динамики параметров фагоцитарного звена у больных контрольной группы не выявил каких-либо позитивных изменений, в то время как в группе с СЭТ отмечались достоверные изменения стимулированного кислородзависимого метаболизма по сравнению с исходными показателями, что подтверждается достоверным повышением коэффициента стимуляции (на фоне вобэнзима: $1,46 \pm 0,29$ – до лечения, $1,87 \pm 0,26$ – после лечения) (табл. 7).

Обсуждение

Положительная динамика бронхоскопической картины и данных цитологического исследования бронхоальвеолярного лаважа у больных тяжелой гормонозависимой БА после проведе-

ТАБЛИЦА 5. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И НАЗАЛЬНЫХ СМЫВАХ У БОЛЬНЫХ ДВУХ ГРУПП (КОНТРОЛЬНОЙ (К), n = 35 И ПОЛУЧАВШИХ ВОБЭНЗИМ (В), n = 20) ТЯЖЕЛОЙ ГОРМОНОЗАВИСИМОЙ БА ДО И ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 5. COMPARATIVE DYNAMICS INDICATORS OF CYTOKINE STATUS IN THE SERUM AND NASAL SWABS IN PATIENTS OF BOTH GROUPS (CONTROL (K), n = 35 AND TREATED WITH WOBENZYM (B), n = 20) SEVERE HORMONE-DEPENDENT ASTHMA BEFORE AND AFTER TREATMENT

Показатель Indicator	Группы Groups	До лечения Before treatment	Через 14 дней After 14 days	Через 6 месяцев After 6 months	Через 12 месяцев After 12 months
IL-2 в сыворотке, пг/мл IL-2 in serum, pg/ml	К	12,15±2,05	7,04±2,11	8,24±1,98**	8,99±2,12**
	В	12,17±2,81	7,78±1,05*	8,36±1,96*	7,04±2,21*
IL-2 в назальных смывах, пг/мл IL-2 in nasal swabs, pg/ml	К	2,42±1,15	2,02±1,23	***1,88±1,46**	***2,11±1,19
	В	2,66±1,17	2,01±0,99	***5,06±2,34*	***6,15±2,10*
IL-4 в сыворотке, пг/мл IL-4 in serum, pg/ml	К	105,24±28,90	88,7±21,46	104,85±23,44	***111,31±26,31
	В	113,81±36,35	103,7±22,1	99,2±10,9*	67,88±8,70*
IL-4 в назальных смывах, пг/мл IL-4 in nasal swabs, pg/ml	К	158,21±35,73	123,66±28,56**	***148,9±31,04	***164,48±36,32
	В	160,33±38,17	129,77±26,44	***102,34±19,15*	***74,26±26,64*
IFN γ в сыворотке, пг/мл IFN γ in serum, pg/ml	К	20,92±4,73	4,15±2,71**	5,982±2,48**	***4,47±2,12**
	В	20,34±5,66	3,08±0,84*	5,72±1,08*	***6,96±1,02*
IFN γ в назальных смывах, пг/мл IFN γ in nasal swabs, pg/ml	К	16,02±4,04	8,43±3,96**	7,66±3,12**	***6,98±2,92**
	В	15,89±4,33	7,79±2,51*	7,69±3,44*	***8,88±3,24*

Примечание.* – статистически достоверное различие показателей до и после лечения вобэнзимом при $p < 0,05$; ** – статистически достоверное различие показателей в начале, через 14 дней, 6 месяцев и в конце периода наблюдения в контрольной группе при $p < 0,05$; *** – статистически достоверные различия показателей после проведенного лечения между контрольной группой и группой получавших вобэнзим при $p < 0,05$.

Note. *, statistically significant difference of indicators before and after treatment with Wobenzym at $p < 0.05$; **, statistically significant difference indicators at the beginning, after 14 days, 6 months and at the end of the observation period in the control group at $p < 0.05$; ***, statistically significant differences in the rate after treatment between the control group and the group receiving Wobenzym at $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 6. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНА У БОЛЬНЫХ ДВУХ ГРУПП (КОНТРОЛЬНОЙ (К), n = 35 И ПОЛУЧАВШИХ ВОБЭНЗИМ (В), n = 20) ТЯЖЕЛОЙ ГОРМОНОЗАВИСИМОЙ БА ДО И ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 6. COMPARATIVE DYNAMICS OF INDICES OF HUMORAL PATIENTS OF BOTH GROUPS (CONTROL (K), n = 35 AND TREATED WITH WOBENZYM (B), n = 20) SEVERE HORMONE-DEPENDENT ASTHMA BEFORE AND AFTER TREATMENT

Показатель Indicator	Группы Groups	Исходно Initially	Через 14 дней After 14 days	Через 6 месяцев After 6 months	Через 12 месяцев After 12 months
CD20 ⁺ , %	К	10,24±0,83	10,70±0,46	***11,20±0,97**	***12,01±0,36**
	В	10,88±0,96	9,97±0,83	***8,48±0,72*	***8,36±0,44*
CD20 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD20 ⁺ , × 10 ⁹ /l	К	0,33±0,04	0,35±0,06	***0,36±0,06	***0,39±0,05**
	В	0,36±0,90	0,32±0,71	***0,28±0,84*	***0,27±0,58*
IgA, г/л IgA, g/l	К	2,89±0,32	2,97±0,45	***2,88±0,32	***3,05±1,28**
	В	2,78±0,42	2,12±0,68	***1,42±0,32*	***1,40±0,17*
IgM, г/л IgM, g/l	К	1,70±0,32	1,78±0,45	***1,73±0,91	***1,76±0,88
	В	1,68±0,41	1,59±0,63	***1,47±0,56	***1,32±0,78
IgG, г/л IgG, g/l	К	13,05±3,42	13,12±2,92	***13,26±3,45	***13,87±3,26
	В	13,32±4,36	12,96±4,04	***11,65±3,45*	***10,88±1,72*
IgE общ., нг/л Total IgE, ng/l	К	295,8±63,2	***286,4±59,6	***303,9±62,4	***310,4±46,9**
	В	304,2±81,3	***158,6±50,5*	***99,6±20,4*	***70,8±17,2*
ЦИК, у. е. CIC, c. u.	К	130,2±21,8	***120,9±19,7**	***126,3±24,6	***132,4±30,6
	В	129,8±32,7	***160,69±46,4*	***66,3±17,7*	***62,4±12,4*

Примечание. См. примечание к таблице 5.

Note. As for Table 5.

ТАБЛИЦА 7. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕЙТРОФИЛЬНОГО ЗВЕНА У БОЛЬНЫХ ДВУХ ГРУПП (КОНТРОЛЬНОЙ (К), n = 35 И ПОЛУЧАВШИХ ВОБЭНЗИМ (В), n = 20) ТЯЖЕЛОЙ ГОРМОНОЗАВИСИМОЙ БА ДО И ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 7. COMPARATIVE DYNAMICS OF INDICES OF NEUTROPHIL LEVEL IN PATIENTS OF BOTH GROUPS (CONTROL (K), n = 35 AND TREATED WITH WOBENZYM (B), n = 20) SEVERE HORMONE-DEPENDENT ASTHMA BEFORE AND AFTER TREATMENT

Показатель Indicator	Группы Groups	Исходно Initially	Через 14 дней After 14 days	Через 6 месяцев After 6 months	Через 12 месяцев After 12 months
НСТ спонт. NBT spontaneous	К	118,0±7,3	122,1±8,4	***129,3±6,2**	***119,6±8,3
	В	124,8±9,8	118,7±6,6	***110,3±7,3*	***107,4±9,2*
НСТ стим. NBT stimulated	К	175,4±22,3	168,6±19,2**	***181,4±20,1	***172,3±27,9
	В	182,7±15,9	179,6±16,4	***202,6±21,2*	***200,1±21,8*
К стим. Coefficient of stimulation	К	1,48±0,21	***1,37±0,27**	***1,40±0,23	***1,44±0,29
	В	1,46±0,29	***1,52±0,18	***1,83±0,21*	***1,87±0,26*

Примечание. См. примечание к таблице 5.

Note. As for Table 5.

ния курса системной энзимотерапии вобэнзимом на фоне стандартной базисной терапии подтвердила противовоспалительный эффект данной группы препаратов.

Полученные результаты дают основание сделать вывод, что включение вобэнзима в ком-

плексную терапию больных тяжелой гормонозависимой БА с сопутствующим синдромом ВИН приводит к позитивным клинико-функциональным и иммунологическим сдвигам в течении основного заболевания. Проведение системной энзимотерапии вобэнзимом, на фоне стандартного

базисного лечения (пероральные ГКСГ, ИГКС, β_2 -агонисты длительного действия), значительно улучшило клинические показатели и показатели функционального состояния бронхов, что у ряда больных дало возможность контролировать течение тяжелой гормонозависимой БА на более низких поддерживающих дозах пероральных ГКСГ, двух пациентов перевести на ИГКС, у всех больных снизить потребность в β_2 -агонистах короткого действия. Достигнутый контроль над течением заболевания сохранялся на протяжении всего периода наблюдения. Системная энзимотерапия вобэнзимом способствовала устойчивому нарастанию уровня кортизола, что свидетельствует о восстановлении у данных пациентов функции коры надпочечников в периоде реконвалесценции [12, 24].

Применение вобэнзима сопровождалось позитивной динамикой инфекционного синдрома в сочетании с уменьшением воспалительного процесса в бронхах по результатам ФТБС и цитограммы БАЛЖ, что, вероятно, связано с позитивными сдвигами параметров иммунной системы. Снижение уровня ЦИК говорит о повышении клиренса патогенных иммунных комплексов.

Резюмируя все вышеизложенное, отмечаем, что включение вобэнзима в комплексную базисную терапию больных тяжелой гормонозависимой бронхиальной астмой оказывает противовоспалительное, противоотечное и нормализующее на измененные параметры показателей иммунного статуса действие, безопасно и клинически эффективно; сопровождается улучшением параметров функционального состояния бронхов, позитивным изменением цитограммы БАЛЖ, устойчивым нарастанием уровня кортизола. Вобэнзим показан больным тяжелой БА с сопутствующей ЖКТ патологией, нарушенной функцией коры надпочечников (при снижении уровня кортизола в сыворотке крови менее 150,0 нмоль/л), при сочетании тяжелой БА и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) (с целью усиления бронхолитического, противоотечного и противовоспалительного эффектов стандартной терапии), часто болеющим простудными заболеваниями, в иммунном статусе которых отмечено повышение ЦИК. Включение вобэнзима в схему комплексной терапии тяжелой БА следует проводить курсом не менее двух месяцев.

Список литературы / References

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с. [Glants S. Medical-biological statistics]. Moscow: Practice, 1998. 459 p.
2. Грובהва О.М., Черняев А.Л. Бронхоальвеолярный лаваж при бронхиальной астме: состояние вопроса в настоящее время и перспективы развития // *Materia MEDICA*, 1998. № 2 (18). С. 8-15. [Grobova O.M., Chernyaev A.L. Bronchoalveolar lavage in bronchial asthma: state of the question in present time and perspectives of development. *Materia MEDICA*, 1998, no. 2 (18), pp. 8-15. (In Russ.)]
3. Гушин И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль. М.: Фармарус Принт, 1998. 252 с. [Gushin I.S. Allergic inflammation and pharmacological control]. Moscow: Farmarus Print, 1998. 252 p.
4. Дрожжев М.Е., Коганов С.Ю. Гормонзависимая бронхиальная астма у детей: клинические особенности и лечение // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 1995. № 6. С. 31-38. [Drozhzhev M.E., Koganov S.Yu. Hormone-dependent bronchial asthma in children: clinical features and treatment. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii* = *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 1995, no. 6, pp. 31-38. (In Russ.)]
5. Ильина Н.И., Огородова Л.М. Характеристика цитокинового профиля у пациентов с терапевтически резистентной астмой // Иммунология, 2003 № 4. С. 223-226. [Ilyina N.I., Ogorodova L.M. Characteristic of cytokine profile in patients with resistant asthma. *Immunologiya* = *Immunology*, 2003, no. 4, pp. 223-226. (In Russ.)]
6. Ильина Н.И., Гудима Г.О. Воспаление и иммунитет в общеклинической практике. Общая концепция // Цитокины и воспаление, 2005. Т. 4, № 3. С. 42-44. [Ilyina N.I., Gudima G.O. Inflammation and immunity in General clinical practice. The General concept. *Tsitokiny i vospalenie* = *Cytokines and Inflammation*, 2005, Vol. 4, no. 3, pp. 42-44. (In Russ.)]
7. Караулов А.В., Сокуренок С.И., Бондаренко Н.Л. Стероидзависимая бронхиальная астма: особенности терапии // Астма, 2003. Т. 4, № 1. С. 42. [Karaulov A.V., Sokurenko S.I., Bondarenko N.L. Steroid-dependent bronchial asthma: features of therapy. *Astma* = *Asthma*, 2003, Vol. 4, no. 1, p. 42. (In Russ.)]
8. Караулов А.В. Новые концепции развития бронхиальной астмы: иммунологические и генетические аспекты // Практикующий врач, 1998. № 12. С. 3-5. [Karaulov A.V. New concept for the development of asthma: immunological and genetic aspects. *Praktikuyushchiy vrach* = *Practicing Doctor*, 1998, Vol. 12, pp. 3-5. (In Russ.)]
9. Ковальчук Л.В., Череев А.Н. Методические рекомендации по оценке иммунного статуса. М., 1984. 55 с. [Kovalchuk L.V., Cheredeev A.N. Methodical recommendation for the assessment of immune status]. Moscow, 1984. 55 p.
10. Лусс Л.В. Синдром вторичной иммунной недостаточности у больных с аллергическими заболеваниями и методы ее коррекции // Лечащий врач, 2000. № 4. С. 34-39. [Luss L.V. Syndrome secondary immune deficiency in patients with allergic diseases and methods of its correction. *Lechashchiy vrach* = *Attending Physician*, 2000, no. 4, pp. 34-39. (In Russ.)]
11. Лусс Л.В. Принципы применения иммуномодулирующей терапии у больных с atopическими заболеваниями, протекающими с синдромом вторичной иммунной недостаточности // Аллергология и иммунология, 2002. Т. 3, № 1. С. 159-163. [Luss L.V. Principles of immunomodulation therapy in patients with atopic diseases proceeding with a syndrome of secondary immune deficiency. *Allergologiya i immunologiya* = *Allergology and Immunology*, 2002, Vol. 3, no. 1, pp. 159-163. (In Russ.)]

12. Мазуров В.И., Лиля А.М., Столов С.В., Кнорринг Г.Ю. Опыт применения системной энзимотерапии при некоторых заболеваниях внутренних органов // Цитокины и воспаление, 2002. Т. 1, № 3. С. 68-72. [Mazurov V.I., Lila A.M., Stolor S.V., Knorring G.Yu. Experience in the use of systemic enzyme therapy in certain diseases of internal organs. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2002, Vol. 1, no. 3, pp. 68-72. (In Russ.)]
13. Мачарадзе Д.Ш., Сепиашвили Р.И. Иммунологический подход к терапии стероид-резистентной астмы // Астма, 2002. Т. 3, № 1. С. 43-48. [Macharadze D.Sh., Sepiashvili R.I. Immunological approach to the therapy of steroid-resistant asthma. *Asthma = Asthma*, 2002, Vol. 3, no. 1, pp. 43-48. (In Russ.)]
14. Немцов В.И., Александрова Р.А., Магидов М.Я. Особенности бронхиальной астмы у больных с патологией гастродуоденальной зоны // Аллергология, 2002. № 4. С. 12-16. [Nemzov V.I., Aleksandrova R.A., Magidov M.Ya. Features of asthma in patients with pathology of gastroduodenal zone. *Allergologiya = Allergy*, 2002, no. 4, pp. 12-16. (In Russ.)]
15. Панина М.И. Нейроэндокринные и аминорегуляторные механизмы в формировании иммунных нарушений при неаллергической бронхиальной астме // Астма, 2003. Т. 4, № 1. С. 5-12. [Panina M.I. Neuroendocrine and aminolevulinate mechanisms in the formation of immune disorders in non-allergic bronchial asthma. *Asthma = Asthma*, 2003, Vol. 4, no. 1, pp. 5-12. (In Russ.)]
16. Сизякина Л.П., Чурюкина Э.В. Клинико-иммунологическая характеристика фенотипа бронхиальной астмы с синдромом вторичной иммунной недостаточности // Российский аллергологический журнал, 2015. № 2. С. 11-14. [Siziakina L.P., Churyukina E.V. Clinical and immunological characterization of the phenotype of bronchial asthma with secondary immune deficiency syndrome. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergy Journal*, 2015, no. 2, pp. 11-14. (In Russ.)]
17. Ситникова Е.П., Федоров В.Н., Ситников И.Г. Возможности системной энзимотерапии при лечении обструктивного бронхита у детей // Вопросы современной педиатрии, 2004. Т. 3, № 5. С. 109-111. [Sitnikova E.P., Fedorov V.N., Sitnikov I.G. Possible systemic enzyme therapy in the treatment of obstructive bronchitis in children. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2004, Vol. 3, no. 5, pp. 109-111. (In Russ.)]
18. Удалова В.А., Латышева Т.В., Варфоломеева М.И. Перспективы изучения цитокинового профиля у больных бронхиальной астмы // Российский аллергологический журнал, 2005. № 3. С. 12-20. [Udalova V.A., Latysheva T.V., Varfolomeeva M.I. Perspectives for the study of cytokine profile in patients with bronchial asthma. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergy Journal*, 2005, no. 3, pp. 12-20. (In Russ.)]
19. Чурюкина Э.В. Эффективность иммуномодуляторов в комплексном лечении больных тяжелой гормонозависимой бронхиальной астмой: дисс. ... канд. мед. наук / Ростовский государственный медицинский университет. Ростов-на-Дону, 2007. [Churyukina E.V. The efficiency of immunomodulators in complex treatment of patients with severe hormone-dependent bronchial asthma: Cand. Diss. (Med. Sci.). Rostov-on-Don: Rostov State Medical University, 2007.]
20. Klaschka F. Oral enzymes – new approach to cancer treatment: Immunological concepts for general and clinical practice. Complementary cancer treatment. Germany. Forum Medizin, 1996. 220 p.
21. Morita A.R., Uchida D.A., Taussig S.J., Chou S.C., Hokama Y. Chromatographic fractionation and characterization of the active platelet aggregation inhibitory factor from bromelain. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1979, Vol. 239, p. 340.
22. Nouza K., Cap P. Immunomodulacni ucinky enzymoterapie. *Enzymoterapie v lekarske praxi*, 1993, no. 2, pp. 9-13.
23. Sasaki M., Yamamoto H., Yamamoto H., Iida S.: Interaction of human serum proteinase inhibitors with proteolytic enzymes of animal, plant and bacterial origin. *J. Biochem.*, 1974, Vol. 75, pp. 171-175.
24. Steffen C., Menzel J. Grundlagenuntersuchung zur Enzymtherapie bei Immunkomplexkrankheiten. *Wiener klin. Wschr.*, 1985, Vol. 97, pp. 376-385.
25. Steffen C., Menzel J. Enzymabbau von Immunkomplexen. *Zeitschr. f. Rheumatol.*, 1983, Vol. 42, p. 249.
26. Trevanil A.S. Effect of proteolytic enzymes on neutrophil FcγRII activity. *Immunology*, 1994, Vol. 82, pp. 632-637.

Авторы:

Чурюкина Э.В. — к.м.н., доцент, доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Сизякина Л.П. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Churyukina E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology and Allergy, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Siziakina L.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Immunology and Allergy, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 16.05.2017

Отправлена на доработку 21.06.2017

Принята к печати 14.06.2018

Received 16.05.2017

Revision received 21.06.2017

Accepted 14.06.2018

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ ЛОКУСА HLA-DRB1 ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Гусева В.И.¹, Лапин С.В.¹, Маслянский А.Л.², Мячикова В.Ю.²,
Чухловин А.Б.¹, Иванова Н.Е.¹, Ткаченко О.Ю.¹, Блинова Т.В.¹,
Тотолян Арег А.^{1,3}

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

³ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Ревматоидный артрит (РА) является наиболее распространенным аутоиммунным воспалительным артритом у взрослых. К серологическим маркерам РА относятся ревматоидный фактор (РФ) и антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП). Основным генетическим фактором, определяющим предрасположенность к РА, является носительство ряда аллелей HLA-DRB1. Аллели локуса HLA-DRB1 кодируют аминокислотную последовательность, получившую название Shared Epitope (SE).

Целью нашего исследования было оценить клиническое значение и встречаемость генов SE и HLA-DRB1, а также проанализировать прогностическую значимость этих факторов у больных РА.

Нами была собрана коллекция образцов сывороток и ДНК 72 пациентов с РА. Для типирования генов по локусу HLA-DRB1 применялись коммерческие наборы фирмы «ДНК-Технология» (Москва, Россия). HLA-DRB1 SE были генотипированы методом ПЦР в реальном времени со специфичными праймерами. Серологические маркеры АЦЦП и РФ детектировались в сыворотке методом ИФА (Euroimmun AG, Lübeck, Германия) и турбодиметрическим методом соответственно. Активность болезни оценивалась с помощью индекса активности РА DAS-28.

Анализ популяционной частоты генов HLA-DRB1 в Северо-Западном регионе показал, что встречаемость генов HLA-DRB1*04 составляет 11,4%, генов HLA-DRB1*01 – 14,2%, HLA-DRB1*10 и HLA-DRB1*14 – 0,8 и 2% соответственно. Аллельные гены DRB1*04 и DRB1*01 встречались у 73,6% пациентов с РА, в то время как в группе контроля – у 43,9%. Среди больных РА частота гена SE составила 66,6%. У пациентов с SE детектировались высокие титры АЦЦП и обнаруживалось более высокое значение индекса DAS28.

Аллельные вариации HLA-DRB, кодирующие SE, ассоциированы с АЦЦП-положительным РА у жителей Северо-Западного региона Российской Федерации. Выявление аллельных генов локуса HLA-DRB1 и SE может быть дополнением к серологической диагностике РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, антитела к циклическому цитруллинированному пептиду, курение, HLA-DRB1, общий эпитоп

Адрес для переписки:

Ткаченко О.Ю.
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого,
6/8, корп. 28.
Тел.: 8 (921) 095-94-98.
E-mail: tkachenie@mail.ru

Address for correspondence:

Tkachenko O. Yu.
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg, L. Tolstoy str.,
6-8, bldg 28.
Phone: 7 (921) 095-94-98.
E-mail: tkachenie@mail.ru

Образец цитирования:

В.И. Гусева, С.В. Лапин, А.Л. Маслянский,
В.Ю. Мячикова, А.Б. Чухловин, Н.Е. Иванова,
О.Ю. Ткаченко, Т.В. Блинова, Арег А. Тотолян
«Клиническое значение определения генов локуса
HLA-DRB1 при ревматоидном артрите»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2.
С. 333–340. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-333-340
© Гусева В.И. и соавт., 2019

For citation:

V.I. Guseva, S.V. Lapin, A.L. Maslyansky, V.Yu. Myachikova,
A.B. Chukhlovin, N.E. Ivanova, O.Yu. Tkachenko,
T.V. Blinova, Areg A. Totolian “Clinical importance
of HLA-DRB1 gene loci detection in rheumatoid arthritis”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 2, pp. 333–340.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-333-340
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-333-340

CLINICAL IMPORTANCE OF HLA-DRB1 GENE LOCI DETECTION IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Guseva V.I.^a, Lapin S.V.^a, Maslyansky A.L.^b, Myachikova V.Yu.^b,
Chukhlov A.B.^a, Ivanova N.E.^a, Tkachenko O.Yu.^a, Blinova T.V.^a,
Totolian Areg A.^{a, c}

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

^b V. Almazov North-West Federal Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

^c L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Rheumatoid arthritis (RA) is a most common autoimmune inflammatory arthritis in adults. Serological marker of RA are rheumatoid factor (RF) and antibodies to cyclic citrullinated peptide (ACCP). The main genetic factor that determine predisposition to RA is HLA-DRB1 alleles. The HLA-DRB1 locus alleles may encode a common 5-amino acid sequence called 'shared epitope' (SE).

The aim of our study is to assess the clinical significance and occurrence of SE and HLA-DRB1 genes and to analyze the prognostic significance of these factors for RA patients.

We collected a serum and DNA samples from 72 patients with RA. For genotyping of HLA-DRB1 locus "DNA-Technology" kits (Moscow, Russia) were used. HLA-DRB1 SE sequences were genotyped by real-time PCR with specific primers. Determination of ACCP in serum was performed by ELISA (Euroimmun AG, L beck, Germany), RF detection, by turbidimetric method. Clinical status of the disease was assessed using the RA DAS-28 Activity Index.

We have obtained the following results: determination of HLA-DRB1 gene frequency in the North-West region of Russia showed that the HLA-DRB1*04 gene variant occurred at 11.4%, HLA-DRB1*01, 14.2%. HLA-DRB1*10 and HLA- DRB1*14 occurred, respectively, in 0.8% and 2% of the cases. The DRB1*04 and DRB1*01 allelic variants were found in 73.6% of patients with RA, and in 43.9% of the control group. Among patients with RA, the SE gene frequency was 66.6%. SE is associated with ACCP detection and higher DAS28 index. Conclusions: The allelic variations of HLA-DRB encoding SE are associated with ACCP-positive RA in the population of the North-West region of the Russian Federation. Identification of HLA-DRB1 allelic gene variants and SE sequences in this locus serve as an additional test to specify serological diagnosis in rheumatoid arthritis.

Keywords: rheumatoid arthritis, antibodies to cyclic citrullinated peptide, smoking, HLA-DRB1, shared epitope

Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда Соглашение РНФ № 16-15-00118.

Введение

Ревматоидный артрит (РА) — это системное аутоиммунное заболевание, которое поражает до 1% взрослой популяции в большинстве стран Европы и США [21]. Основными его характеристиками являются хроническое воспаление мелких суставов с синовитом, сопровождающимся деструкцией суставного хряща и перихондральной кости, субхондральным остеопорозом, что способствует развитию функциональной недостаточности суставов. Разрушение суставов протекает на фоне системного иммуновоспалительного процесса, а также частых внесуставных проявлений заболевания [1]. Наличие специфических серологических биомаркеров отличает РА от других форм деструктивных артритов, а ревматоидный фактор, характерный для РА, был

одним из первых описанных аутоантител при аутоиммунных заболеваниях [3, 29]. Разработка тестов для определения антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) и антител к другим цитруллиновым антигенам стала новой вехой в лабораторной диагностике этого заболевания, а также понимания этиопатогенеза РА [2, 20].

Хотя этиология развития РА установлена только частично, но не вызывает сомнения важность генетической предрасположенности к развитию заболевания, наряду с воздействием ряда факторов внешней среды. Наиболее убедительные доказательства роли наследственного фактора в развитии РА выявлены у монозиготных близнецов, у которых конкордантность развития заболевания составляет от 12 до 15% по сравнению с 1% для общей популяции. Основным генетическим фактором, определяющим предрасположенность к РА, является носительство ряда аллелей HLA-DRB1. Аллели локуса HLA-DRB1

кодируют, в частности, особую аминокислотную последовательность, получившую название “Shared Epitope” (от англ. «общий эпитоп»), или SE [7]. Структура SE представляет собой последовательность аминокислот в позиции 70-74 бета-цепи молекулы HLA-DRB1, которая кодируется исключительно несколькими аллелями локуса HLA-DRB1, в том числе HLA-DRB1*01; *0401; *0404; *0405; *0408.

В развитии аутоиммунной реакции при РА принимают участие факторы внешней среды, например курение, хронический пародонтит, производственная пыль и частицы диоксида кремния, которые способны запускать воспалительную реакцию в соединительной ткани, где экспрессируется ряд неоантигенов [9, 16]. Подобные неоантигены возникают в процессе посттрансляционной модификации белков, к которым относят цитруллинирование, карбамойлирование, ацилирование [23, 24]. Отчасти причиной этих модификаций являются ферменты нейтрофилов, в частности пептидил-аргинин деаминазы, причем особенно часто подвергаются воспалительному дезаминированию компоненты погибающих (апоптотических) клеток. Цитруллинированные антигены ряда белков, в частности фибриногена, енолазы, виментина, коллагена, становятся мишенью аутоиммунных реакций при РА [14, 21].

Особенностью генов HLA, содержащих SE, является их способность специфически связываться с цитруллинированными пептидами белков, в отличие от их нативных аргинин-содержащих форм. Участие продуктов генов HLA-DRB1 в презентации экзогенных пептидов антиген-презентирующими клетками приводит к формированию Т-клеточных иммунных ответов на цитруллинированные антигены, формированию Т-клеточных хелперных клонов, в результате чего индуцируется выработка высокопатогенных антицитруллиновых антител [19, 22].

Учитывая известную роль HLA-DRB1 генов, содержащих SE, в иммунопатогенезе РА, диагностическая ценность молекулярно-биологического выявления SE изучена недостаточно. **Цель нашего исследования** — оценить клиническое значение и встречаемость генов SE и HLA-DRB1, а также проанализировать прогностическую значимость этих факторов у больных РА. Для этого было исследовано распределение генов локуса HLA-DRB1 в популяции жителей Санкт-Петербурга и Северо-Западного федерального округа Российской Федерации, а также обследована группа больных с РА.

Материалы и методы

Среди пациентов, проходящих стационарное лечение по поводу РА, нами была обследована

группа из 72 больных, в том числе 61 — женского пола и 11 — мужского. В исследование были включены пациенты, получающие терапию модифицирующими препаратами — метотрексатом, лефлуномидом либо их комбинации. Ни один из пациентов не получал биологическую терапию генно-инженерными рекомбинантными препаратами. Средний возраст обследованных составил $58,9 \pm 13,8$ лет, средняя длительность заболевания составила $10,7 \pm 9,4$ лет. Вторая рентгенологическая стадия РА была выявлена у 24 пациентов, 3-я рентгенологическая стадия — у 22 пациентов. Пациенты были клинически обследованы для исключения сопутствующих аутоиммунных состояний, таких как болезнь Шегрена, аутоиммунный тиреоидит, сахарный диабет, синдром Рейно, воспалительные заболевания кишечника. Проводилось определение индекса активности артрита (DAS28), которое показало разброс значений от 2 до 8, а именно 26 пациентов имели высокую клинико-лабораторную активность ревматоидного артрита, 38 — умеренную.

Для определения встречаемости основных аллелей HLA-DRB1 в популяции Северо-Западного региона нами были проанализированы частоты аллелей среди лиц, обследованных в лаборатории тканевого типирования НИИ онкологии им. Раисы Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова диагностическими наборами Protrans ($n = 1070$).

Определение АЦЦП в сыворотке крови осуществляли методом ИФА с помощью коммерческого набора (Euroimmun AG, Lübeck, Германия), значения нормы не превышали 5 RU/мл. Выявление РФ проводили методом турбидиметрии на биохимическом анализаторе A15 (Испания), значения нормы менее 20 ME/мл.

Для дополнительного генетического анализа использовали геномную ДНК, которую экстрагировали колоночным методом наборами QIAGEN “QIAamp DNA Blood Mini Kit” (Дюссельдорф, Германия) из цельной крови. Для типирования генов по локусу HLA-DRB1 применяли коммерческие наборы фирмы «ДНК-Технология» (Москва, Россия).

Для определения SE, состоящего из последовательности аминокислот QRRAA (Glu, Arg, Arg, Ala, Ala), мы использовали пару праймеров, имеющих два направления считывания: SE-Forward (5'-3') — tgt-gtc-tgc-agt-agg-tgt-cca и SE-Reverse (3'-5') — acc-tgt-gga-tga-cgt-ctg-tgt, а также флуоресцентный TaqMan зонд с 5'-3' последовательностью с меткой — (FAM) cc-tgg-agc-aga-agc-ggg-cc (BHQ1), кодирующий общий антиген из 5 аминокислот (QRRAA). ПЦР-смесь включала реактивы из набора фирмы Синтол: 2,5 mM dNTP, 10xПЦР буфер Б, 25 mM MgCl₂, SynTaq

ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами (5 Е/мкл), деионизированную воду, праймеры и зонд в концентрации 10 пмоль/мл и ДНК пациентов в концентрации 20-50 нг/мл. Последующая ПЦР в реальном времени состояла из следующих этапов: «горячий старт» — 4 мин 45 с при 95 °С, затем 45 циклов из трех ступеней по 20 с при 95 °С, 55 °С и 62 °С. Статистическая обработка результатов проводилась методами описательной статистики (вычисление средних значений, средних квадратических отклонений, медианы) и непараметрическими методами (критерий Хи-квадрат Пирсона).

Результаты

Анализ популяционной частоты генов HLA-DRB1 в Северо-Западном регионе показал, что встречаемость генов HLA-DRB1*04 составляет 11,4%, генов HLA-DRB1*01 — 14,2%, HLA-DRB1*10 и HLA-DRB1*14 — 0,8 и 2% соответственно. Данные о распределении аллельных форм генов локуса HLA-DRB1 приведены в таблице 1. Результаты типирования высокого разрешения среди контрольной группы позволили проанализировать распределение аллельных форм генов риска развития РА внутри группы, данные приведены в таблице 2.

Проведенный нами анализ распределения генов системы HLA среди больных с РА показал, что гены риска развития заболевания преобладают в популяции. Так, аллельные гены DRB1*04 встречаются у 58,3% (n = 42) пациентов, из которых 8% гомозиготы (n = 5), и DRB1*01 — у 33,3% (n = 24), из которых 5% гомозиготы (n = 3). Аллельные гены из групп риска развития РА DRB1*04 и DRB1*01 отмечались у 43,9 % исследованной популяции.

Среди больных РА частота гена общего эпитопа (последовательность QRRAA), определенного с помощью метода ПЦР в реальном времени с аллель-специфическими праймерами, составила 66,6% (48/72). Также мы сопоставили результаты выявления гена SE с результатами типирования по локусу HLA-DRB1 методом статистического анализа — точного критерия Фишера. Диаграмма встречаемости гена SE среди пациентов, типированных по локусу DRB1, представлена на рисунке 1. У 63,8% (46/72) пациентов, имеющих ген DRB1*04 и/или DRB1*01, был выявлен ген SE, таким образом, можно утверждать, что именно аллели DRB1*04 и DRB1*01 преимущественно кодируют SE у мембранных белков, презентующих антигены при РА. Наши результаты указывают на то, что распределение генов риска развития РА у больных значительно отличается

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ФОРМ ГЕНОВ HLA-DRB1 У ЖИТЕЛЕЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА И СЕВЕРО-ЗАПАДА РФ (n = 1070)

TABLE 1. DISTRIBUTION OF ALLELIC FORMS OF HLA-DRB1 GENES IN RESIDENTS OF ST. PETERSBURG AND THE NORTH-WEST OF THE RUSSIAN FEDERATION (n = 1070)

Аллельные гены HLA-DRB1 Allelic genes HLA-DRB1	*01	*03	*04	*07	*08	*09	*10	*11	*12	*13	*14	*15	*16
Встречаемость, % Frequency, %	14,2	9,2	11,4	14,1	4	1,6	0,8	11	2,5	10,8	2	14,6	3,8

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ФОРМ ГЕНОВ В ГРУППАХ ГЕНОВ DRB1*01 И DRB1*04, СОДЕРЖАЩИХ SE, ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ РИСКА РАЗВИТИЯ РА У ЖИТЕЛЕЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА И СЕВЕРО-ЗАПАДА РФ (n = 1070)

TABLE 2. DISTRIBUTION OF ALLELIC FORMS OF GENES IN GROUPS OF DRB1*01 AND DRB1*04 GENES CONTAINING SE, IN DETERMINING THE RISK OF RA DEVELOPMENT AMONG RESIDENTS OF ST. PETERSBURG AND THE NORTH-WEST OF THE RUSSIAN FEDERATION (n = 1070)

Аллельные гены группы DRB1*01 Allelic genes of group DRB1*01	Встречаемость, % Frequency, %	Аллельные гены группы DRB1*04 Allelic genes of group DRB1*04	Встречаемость, % Frequency, %
DRB1*01:01	86%	DRB1*04:01	33%
Другие гены этой группы Other genes of this group	14%	DRB1*04:04	29%
		DRB1*04:08	5%
		Другие аллели этой группы Other genes of this group	33%

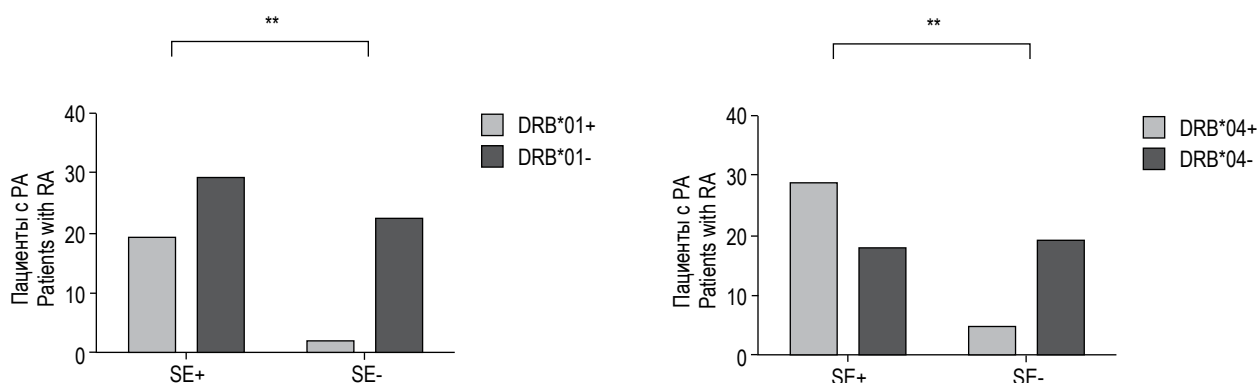


Рисунок 1. Ассоциация гена SE и аллельных генов из группы DRB1*01 у больных РА (по оси абсцисс), по оси ординат – доля пациентов с данным аллелем

Примечание. ** – $p < 0,01$ при сравнении наличия аллелей HLA-DRB1*01 и *04 и наличия гена SE в группе больных РА.

Figure 1. Association of SE gene and allelic genes from DRB1*01 group in RA patients (the abscissa axis), the ordinate represents the proportion of patients with this allele

Note. **, $p < 0.01$ when comparing the presence of HLA-DRB1*01 and *04 alleles and the presence of the SE gene in the RA patients group.

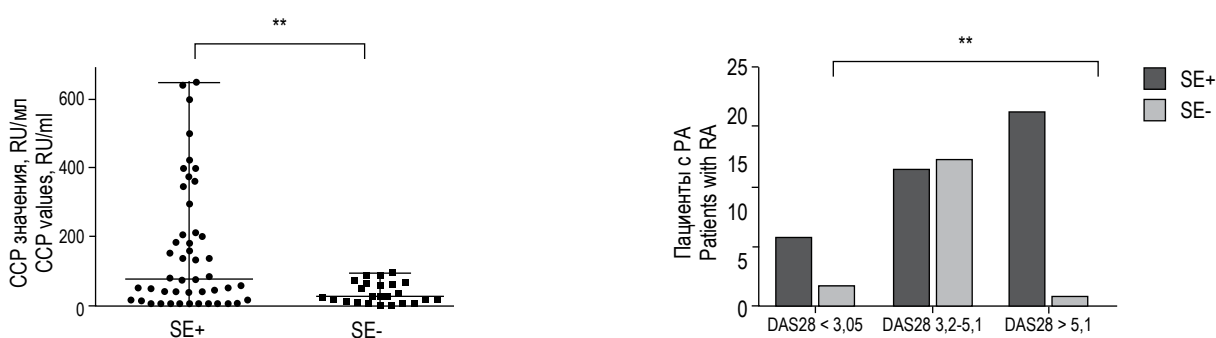


Рисунок 2. Присутствие гена SE и аллелей группы DRB1*04 у больных РА (по оси абсцисс), по оси ординат – доля пациентов с данным аллелем

Примечание. ** – $p < 0,01$ при сравнении наличия аллелей HLA-DRB1*01 и *04 и наличия гена SE в группе больных РА.

Figure 2. Presence of SE gene and alleles of DRB1*04 group in RA patients (the abscissa axis), the ordinate represents the proportion of patients with this allele

Note. **, $p < 0.01$ when comparing the presence of HLA-DRB1*01 and *04 alleles and the presence of the SE gene in the RA patients group.

Рисунок 3. Распределение показателей по АЦЦП у больных РА в двух группах: SE+ и SE

Примечание. По оси абсцисс – наличие или отсутствие общего эпитопа. По оси ординат – доля пациентов с данным аллелем. SE – ген, кодирующий «общий эпитоп». * – $p < 0,05$.

Figure 3. The distribution of the ACCP in RA patients in two groups: SE+ and SE

Note. The abscissa is the presence or absence of a common epitope.

The ordinate represents the proportion of patients with this allele. SE is a gene encoding a "sharep epitope". *, $p < 0.05$.

от данных в контрольной группе. Аллельные гены из групп риска развития РА DRB1*04 и DRB1*01 встречаются у 73,6% пациентов с РА, в то время как в группе контроля – только у 43,9%.

Мы провели анализ клинических и лабораторных данных у больных с РА в зависимости от присутствия SE в их генотипе. Нами была отмечена значительная вариация результатов измерения АЦЦП среди обследованных больных в зависимости от присутствия гена SE. Так, у пациентов с SE значения АЦЦП преимущественно превышали величину 100 RU/мл, а именно у 53%

(25/47) пациентов. Взаимосвязь АЦЦП с наличием гена SE представлена на рисунке 2.

Анализ индекса активности артрита (DAS28) в зависимости от наличия гена SE показал, что у 20 пациентов с SE отмечался высокий индекс (больше 5,1), у 14 пациентов DAS28 находился в диапазоне от 3,2 до 5,1, и у 7 пациентов с SE – ниже 3,05. У пациентов без гена SE показатель DAS28 в среднем составлял $4,7 \pm 1,3$, т.е. в основном эти пациенты попадали в группу средней и низкой активности артрита. Соотношение индекса DAS28 и наличия гена SE проиллюстрировано на рисунке 3.

Обсуждение

Связь между генами главного комплекса гистосовместимости (HLA) II класса и восприимчивостью к РА впервые была обнаружена в 1970-х годах [22]. На данный момент вклад DRB1 SE в развитие РА был широко изучен в разных популяциях, включая азиатов, европейцев и коренных американцев. Эти исследования показывают, что наличие SE-содержащих аллелей DRB1 значимо повышает риск развития РА в различных популяциях [13, 14, 15]. У европейцев с РА связаны DRB1*0401, *0404 и *0408, в азиатских популяциях — DRB1 *0405 [6, 10, 11, 12, 30, 32]. Наши результаты по исследованию значимости HLA в этиологии РА в популяции жителей Санкт-Петербурга и Северо-Западного района Российской Федерации сопоставимы с европейской популяцией. Аллельные гены DRB1*04 и DRB1*01 у пациентов с РА встречались в 2 раза чаще по сравнению с контрольной группой. Схожие результаты были получены среди жителей Москвы — среди доноров встречаемость генов риска развития РА составила 12,6%, в то время как среди больных РА — 45,5% [2]. Наши данные указывают на несколько большую частоту SE-позитивных аллелей, однако эту разницу можно объяснить наличием общих эпитопов в других аллелях DRB1 (например, *1421 и др.).

В 2005 году было впервые обнаружено, что HLA-DRB1 аллели, кодирующие SE, ассоциированы с АЦЦП-положительным РА [8]. Данная закономерность была подтверждена во многих последующих исследованиях [7, 13, 18, 19]. Эти данные легли в основу разработанной L. Klareskog этиологической модели РА. Он по-

казал, что HLA-DRB1, а также полиморфизмы в области МНС II класса ассоциированы с курением у АЦЦП-положительных пациентов с РА [9]. При этом у АЦЦП-положительных пациентов наблюдается более активное течение заболевания по сравнению с больными РА без АЦЦП [25]. Соответственно, в ряде исследований выявление SE у пациентов с РА коррелирует со степенью повреждения суставов и смертностью [4, 5, 28].

Сопоставляя наши результаты генетического типирования и серологического скрининга, мы также выявили взаимосвязь наличия SE с высокими титрами АЦЦП в группе пациентов с РА. При анализе клинической активности РА мы обнаружили, что наличие гена SE ассоциировано с более высокими значениями индекса DAS28 у большей части пациентов с РА. Полученные нами результаты перекликаются с опубликованными данными Н.В. Демидовой (Москва), где также сообщается об ассоциации SE с высоким уровнем АЦЦП, а также сохранении высокой воспалительной активности прогрессирования эрозивных изменений в суставах у пациентов при наличии SE в течение года наблюдения [17].

Таким образом, выявление аллельных генов локуса HLA-DRB1 и SE может быть дополнением к серологической диагностике РА для оценки активности заболевания, риска развития суставных деструкций и назначения адекватной иммуносупрессивной терапии. Выявление SE (общего эпитопа в последовательности DRB1) может быть дополнительным критерием большей активности заболевания у больных с РА. Для внедрения этого молекулярного теста в клинике требуются исследования в больших когортах больных РА и в разных популяциях.

Список литературы / References

1. Беляева И.Б., Лапин С.В., Созина А.В., Мазуров В.И., Тотолян А.А. Антитела к цитруллин-содержащим антигенам в диагностике и прогнозировании течения раннего ревматоидного артрита // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 1. С. 77-84. [Belyaeva I.B., Lapin S.V., Sozina A.V., Mazurov V.I., Totolian A.A. Autoantibodies to citrullinated antigens for diagnosis and prediction of clinical course in early rheumatoid arthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 1, pp. 77-84. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2007-1-77-84.
2. Лапин С.В., Маслянский А.Л., Илианова Е.П., Мазуров В.И., Тотолян А.А. Клиническое значение антител к циклическому цитруллинированному пептиду при раннем ревматоидном артрите // Медицинская иммунология, 2004. Т. 6, № 1-2. С. 57-66. [Lapin S.V., Maslyansky A.L., Ilivanova E.P., Mazurov V.I., Totolian A.A. Clinical significance of anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies in patients with early rheumatoid arthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2004, Vol. 6, no. 1-2, pp. 57-66. (In Russ.)]
3. Маслянский А.Л., Лапин С.В., Илианова Е.П., Мазуров В.И., Тотолян А.А. Антикератиновые антитела и антиперинуклеарный фактор являются маркером агрессивного течения ревматоидного артрита // Медицинская иммунология, 2003. Т. 5, № 5-6. С. 599-608. [Maslyansky A.L., Lapin S.V., Ilivanova E.P., Mazurov V.I., Totolian A.A. Antikeratin antibodies and antiperinuclear factor are markers of aggressive rheumatoid arthritis. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2003, Vol. 5, no. 5-6, pp. 599-608. (In Russ.)]
4. Ajeanov S. Disease factors in early rheumatoid arthritis are associated with differential risks for cardiovascular events and mortality depending on age at onset: A 10-year observational cohort study. *J. Rheumatol.*, 2013, Vol. 40, no. 12, pp. 1958-1966.
5. Bukhari M., Thomson W., Naseem H., Bunn D., Silman A., Symmons D., Barton A. The performance of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in predicting the severity of radiologic damage in inflammatory polyarthritis: Results from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Rheum.*, 2007, Vol. 56, no. 9, pp. 2929-2935.
6. Chan S.H., Lin Y.N., Wee G.B., Koh W.H., Boey M.L. HLA class 2 genes in Singaporean Chinese rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.*, 1994, Vol. 33, no. 8, pp. 713-717.

7. Gregersen P.K., Silver J., Winchester R.J. The shared epitope hypothesis. *Arthritis Rheum.*, 1987, Vol. 30, no. 11, pp. 1205-1212.
8. Huizinga T.W., Amos C.I., van der Helm-van Mil A.H., Chen W., van Gaalen F.A., Jawaheer D., Schreuder G.M., Wener M., Breedveld F.C., Ahmad N., Lum R.F., de Vries R.R., Gregersen P.K., Toes R.E., Criswell L.A. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum.*, 2005, Vol. 52, no. 11, pp. 3433-3438.
9. Klareskog L., Stolt P., Lundberg K., Källberg H., Bengtsson C., Grunewald J., Rönnelid J., Harris H.E., Ulfgren A.K., Rantapää-Dahlqvist S., Eklund A., Padyukov L., Alfredsson L. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.*, 2006, Vol. 54, no. 1, pp. 38-46.
10. Lee H.S., Lee K.W., Song G.G., Kim H.A., Kim S.Y., Bae S.C. Increased susceptibility to rheumatoid arthritis in Koreans heterozygous for HLA-DRB1*0405 and *0901. *Arthritis Rheum.*, 2004, Vol. 50, no. 11, pp. 3468-3475.
11. Lin L., Chen Y., Xiao Z., Huang S., Yang Z. The association of HLA-DRB1 alleles with rheumatoid arthritis in the Chinese Shantou population: a follow-up study. *Biochem. Cell Biol.*, 2007, Vol. 85, no. 2, pp. 227-238.
12. Liu S.C., Chang T.Y., Lee Y.J., Chu C.C., Lin M., Chen Z.X., Liu H.F., Dang C.W., Chang S.C., Lee C.S., Chen T.L., Huang C.H. Influence of HLA-DRB1 genes and the shared epitope on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Taiwanese. *J. Rheumatol.*, 2007, Vol. 34, no. 4, pp. 674-680.
13. Louzada-Junior P., Freitas M.V.C., Oliveira R.D.R., Deghaide N.H.S., Conde R.A., Bertolo M.B., Donadi E.A. A majority of Brazilian patients with rheumatoid arthritis HLA-DRB1 alleles carry both the HLA-DRB1 shared epitope and anti-citrullinated peptide antibodies. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Vol. 41, no. 6, pp. 493-499.
14. McInnes I.B., Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.*, 2011, Vol. 365, no. 23, pp. 2205-2219.
15. Okada Y., Kim K., Han B., Pillai N.E., Ong R.T., Saw W.Y., Luo M., Jiang L., Yin J., Bang S.Y., Lee H.S., Brown M.A., Bae S.C., Xu H., Teo Y.Y., de Bakker P.I., Raychaudhuri S. Risk for ACPA-positive rheumatoid arthritis is driven by shared HLA amino acid polymorphisms in Asian and European populations. *Hum. Mol. Genet.*, 2014, Vol. 23, no. 25, pp. 6916-6926.
16. Padyukov L., Suva C., Stolt P., Alfredsson L., Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2004, Vol. 50, no. 10, pp. 3085-3092.
17. Pursglove M., Murray J., Smyth S. Intermediate Russian: a Grammar and Workbook. *Mod. Lang. Rev.*, 2002, Vol. 97, no. 2, p. 509.
18. Revirion D., Perdriger A., Toussiot E., Wendling D., Balandraud N., Guis S., Semana G., Tiberghien P., Mercier P., Roudier J. Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2001, Vol. 44, no. 3, pp. 535-540.
19. Scally S.W., Petersen J., Law S.C., Dudek N.L., Nel H.J., Loh K.L., Wijeyewickrema L.C., Eckle S.B., van Heemst J., Pike R.N., McCluskey J., Toes R.E., la Gruta N.L., Purcell A.W., Reid H.H., Thomas R., Rossjohn J. A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, no. 12, pp. 2569-2582.
20. Schellekens G.A., de Jong B.A.W., van den Hoogen F.H.J., van de Putte L.B.A., van Venrooij W.J. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.*, 1998, Vol. 101, no. 1, pp. 273-281.
21. Silman A.J., Pearson J.E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.*, 2002, Vol. 4, Suppl. 3, pp. S265-S272.
22. Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.*, 1978, Vol. 298, no. 16, pp. 869-871.
23. Stolt P., Yahya A., Bengtsson C., Källberg H., Rönnelid J., Lundberg I., Klareskog L., Alfredsson L.; EIRA Study Group. Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, Vol. 69, no. 6, pp. 1072-1076.
24. Too C.L., Muhamad N.A., Ilar A., Padyukov L., Alfredsson L., Klareskog L., Murad S., Bengtsson C. Occupational exposure to textile dust increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a Malaysian population-based case-control study. *Ann. Rheum. Dis.*, 2015, pp. 1-6.
25. van der Helm-van Mil A.H.M., Verpoort K.N., Breedveld F.C., Toes R.E.M., Huizinga T.W.J. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2005, Vol. 7, no. 5, pp. R949-R958.
26. van der Woude D., Lie B.A., Lundström E., Balsa A., Feitsma A.L., Houwing-Duistermaat J.J., Verduijn W., Nordang G.B., Alfredsson L., Klareskog L., Pascual-Salcedo D., Gonzalez-Gay M.A., Lopez-Nevot M.A., Valero F., Roep B.O., Huizinga T.W., Kvien T.K., Martín J., Padyukov L., de Vries R.R., Toes R.E. Protection against anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1*1301: A meta-analysis of HLA-DRB1 associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein. *Arthritis Rheum.*, 2010, Vol. 62, no. 5, pp. 1236-1245.
27. van Gaalen F.A., van Aken J., Huizinga T.W.J., Schreuder G.M.Th., Breedveld F.C., Zanelli E., van Venrooij W.J., Verweij C.L. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2004, Vol. 50, no. 7, pp. 2113-2121.
28. Viatte S., Barton A. The role of rheumatoid arthritis genetic susceptibility markers in the prediction of erosive disease. *Eur. Musculoskelet. Rev.*, 2012, Vol. 7, no. 2, pp. 102-107.
29. Waaler E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1940, Vol. 17, no. 2, pp. 172-188.
30. Wakitani S., Imoto K., Murata N., Oonishi H., Ochi T., Yoneda M. An association between the natural course of shoulder joint destruction in rheumatoid arthritis and HLA-DRB1*0405 in Japanese patients. *Scand. J. Rheumatol.*, 1998, Vol. 27, no. 2, pp. 146-148.

31. Willkens R.F., Nepom G.T., Marks C.R., Nettles J.W., Nepom A.S. Association of HLA-Dw16 with rheumatoid arthritis in Yakima Indians. Further evidence for the "shared epitope" hypothesis. *Arthritis Rheum.*, 1991, Vol. 34, no. 1, pp. 43-47.
32. Xue Y., Zhang J., Chen Y.M., Guan M., Zheng S.G., Zou H.J. The HLA-DRB1 shared epitope is not associated with antibodies against cyclic citrullinated peptide in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.*, 2008, Vol. 37, no. 3, pp. 183-187.

Авторы:

Гусева В.И. — младший научный сотрудник НМЦ по молекулярной медицине Министерства здравоохранения РФ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Лапин С.В. — к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине Министерства здравоохранения РФ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Маслянский А.Л. — к.м.н., врач-ревматолог, старший научный сотрудник НИЛ ревматологии ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

Мячикова В.Ю. — врач-ревматолог отделения ревматологии ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

Чухловин А.Б. — д.м.н., заведующий лабораторией НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Иванова Н.Е. — врач-гематолог, заведующая лабораторией тканевого типирования клиники ТКМ, НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Ткаченко О.Ю. — врач КЛД, лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине Министерства здравоохранения РФ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Блинова Т.В. — врач КЛД, лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине Министерства здравоохранения РФ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Guseva V.I., Junior Research Associate, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lapin S.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Autoimmunology, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Maslyansky A.L., PhD (Medicine), Rheumatologist, Senior Research Associate, Research Laboratory of Rheumatology, V. Almazov North-West Federal Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

Myachikova V.Yu., Rheumatologist, Department of Rheumatology, V. Almazov North-West Federal Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

Chukhlovin A.B., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Transplantation Immunology, R. Gorbacheva Memorial Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Ivanova N.E., Hematologist, Head, Laboratory of HLA Typing, R. Gorbacheva Memorial Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Tkachenko O.Yu., Clinical Laboratory Diagnostician, Laboratory of Autoimmunology, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Blinova T.V., Clinical Laboratory Diagnostician, Laboratory of Autoimmunology, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Immunology Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 20.03.2018

Отправлена на доработку 05.04.2018

Принята к печати 03.04.2018

Received 20.03.2018

Revision received 05.04.2018

Accepted 03.04.2018

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕЧНОЙ ПАРЕНХИМЫ В МОЧЕ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПИЕЛОНЕФРИТОМ МЕТОДАМИ ИФА И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Захарова Н.Б.¹, Пастушкова Л.Х.², Лях Р.В.¹, Понукалин А.Н.¹,
Вараксин Н.А.³, Офицеров В.И.³, Кононихин А.С.⁴, Ларина И.М.²,
Николаев Е.Н.⁴

¹ ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского»
Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

² ФГБУН «ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН», Москва, Россия

³ АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

⁴ ФГБУН «Институт энергетических проблем химической физики имени В.Л. Тальрозе РАН», Москва, Россия

Резюме. Проведено клиническое наблюдение и обследование 22 больных хроническим пиелонефритом (ХПН) и 30 практически здоровых лиц. Больные ХПН обследованы дважды. В первую группу (Г1) вошли пациенты с обострением данного заболевания. В группу сравнения (Г2) – те же больные спустя 1,5–3 месяца после завершения лечения, без клинических проявлений обострения ХПН. У всех обследованных пациентов не выявлены лабораторные признаки острого почечного повреждения. В образцах мочи всех обследованных лиц проводили определение концентрации VEGF, MCP-1, IL-8 и IL-18 в моче методом ИФА. У 6 пациентов Г1 и 6 Г2 с исследовали белковый спектр мочи с помощью масс-спектрометрического анализа, используя хроматограф Agilent 1100 и гибридный масс-спектрометр LTQ-FT Ultra. Результаты параллельного определения белков мочи двумя методами показали, что обострение ХПН развивается на фоне локальной вторичной иммунной недостаточности на уровне уротелия почечных канальцев. Определение протеома мочи с помощью масс-спектрометрии при обострении заболевания позволяет идентифицировать белки, связанные с повреждением эпителиальной выстилки почечных канальцев и формированием локального иммунного ответа.

Ключевые слова: пиелонефрит, цитокины, мочевые биомаркеры, протеомика, масс-спектрометрия

Адрес для переписки:

Захарова Наталья Борисовна
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский
университет имени В.И. Разумовского» Министерства
здравоохранения РФ
410012, Россия, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112.
Тел.: 8 (909) 336-02-61.
E-mail: lipidgormon@mail.ru

Address for correspondence:

Zakharova Natalia B.
V. Razumovsky Saratov State Medical University
410012, Russian Federation, Saratov,
Bolshaya Kazachya str., 112.
Phone: 7 (909) 336-02-61.
E-mail: lipidgormon@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Б. Захарова, Л.Х. Пастушкова, Р.В. Лях,
А.Н. Понукалин, Н.А. Вараксин, В.И. Офицеров,
А.С. Кононихин, И.М. Ларина, Е.Н. Николаев
«Определение биомаркеров повреждения почечной
паренхимы в моче пациентов с хроническим
пиелонефритом методами ИФА и масс-
спектрометрии» // Медицинская иммунология, 2019.
Т. 21, № 2. С. 341-350.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-341-350
© Захарова Н.Б. и соавт., 2019

For citation:

N.B. Zakharova, L.Kh. Pastushkova, R.V. Lyakh,
A.N. Ponukalin, N.A. Varaksin, V.I. Ofitserov,
A.S. Kononikhin, I.M. Larina, E.N. Nikolaev "Renal
parenchymal damage: identification of urinary biomarkers in
the patients with chronic pyelonephritis by means of ELISA and
mass spectrometry techniques", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2,
pp. 341-350.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-341-350
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-341-350

RENAL PARENCHYMAL DAMAGE: IDENTIFICATION OF URINARY BIOMARKERS IN THE PATIENTS WITH CHRONIC PYELONEPHRITIS BY MEANS OF ELISA AND MASS SPECTROMETRY TECHNIQUES

Zakharova N.B.^a, Pastushkova L.Kh.^b, Lyakh R.V.^a, Ponukalin A.N.^a,
Varaksin N.A.^c, Ofitserov V.I.^c, Kononikhin A.S.^d, Larina I.M.^b,
Nikolaev E.N.^d

^a Saratov State V. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

^b Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

^d V. Talrose Institute of Energy Problems in Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. We performed clinical observations and laboratory examination of 22 patients with chronic pyelonephritis (chronic renal failure, CRF) and 30 healthy individuals. The patients with CRF were examined twice. The first group (Group I) included patients with exacerbation of the disease. The comparison series (Group II) was represented by the same patients who were examined 1.5-3 months after completion of treatment, without clinical exacerbation of chronic pyelonephritis (CPN). Laboratory signs of acute renal damage were not detectable in all the patients examined. Concentrations of VEGF, MCP-1, IL-8 and IL-18 were determined in urine samples of all examined persons by ELISA technique. Protein spectrum of urine was assessed in six patients from Group I, and in six cases of Group II by means of mass spectrometry, using Agilent 1100 chromatographic device, and LTQ-FT Ultra hybrid mass spectrometer. The results of parallel determination of urine proteins by the two methods have shown that the evolving CPN exacerbation is associated with local secondary immune deficiency at the level of renal tubular urothelium. Determination of urine proteome by means of mass spectrometry in exacerbating disease allows identify the proteins associated with damage to epithelial lining of renal tubules and development of local immune response.

Keywords: pyelonephritis, cytokines, urinary biomarkers, proteomics, mass spectrometry

Экспериментальные данные, используемые в работе, были получены в рамках программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. (тема №АААА-А18-118112090111-4).

Введение

Пиелонефрит (ПН) — одно из наиболее распространенных инфекционных заболеваний почек и мочевыводящих путей человека [2, 12, 42]. Основой заболевания считается нарушение локальной иммунной защиты эпителия канальцев почек при ПН, за счет атаки возбудителями инфекции теряет свои структурно-функциональные свойства и перестает участвовать в локальной иммунной защите [13, 18, 27]. Показано, что в острый период заболевания грамотрицательная флора, кишечная палочка и протей могут продвигаться по эпителию канальцев почек вверх против тока мочи, снижая активность фагоцитоза и выделяя эндотоксины, приводя к трансформации структурно-функциональные свойства уротелия [4, 6, 8, 11, 12]. Поврежденный при кон-

такте с бактериальной флорой уротелий теряет барьерные свойства, что приводит к инфильтрации нейтрофилами и моноцитами интерстиция почечной паренхимы [1, 5, 7, 9, 15, 41] и развитию тубулоинтерстициального воспаления с образованием воспалительных инфильтратов. Данные процессы сопровождаются подъемом экскреции с мочой провоспалительных цитокинов и их рецепторов, хемокинов, острофазных белков, характеризующих тяжесть воспалительных изменений паренхимы почек [7, 9, 15, 17, 20, 21, 36]. Повреждение тубулоинтерстициальной ткани почек при ПН сопровождается развитием тканевой гипоксии — основного индуктора синтеза фактора роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF) подоцитами клубочков и клетками канальцев почки, стимулирующего пролиферацию мезангиоцитов и гиперпродукцию мезангиального матрикса, приводящую к развитию нефросклероза [8, 14, 19].

В работе, проведенной ранее, показано, что результаты анализа вышеприведенных медиаторов иммунитета перспективны для оценки струк-

турно-функциональных изменений паренхимы почки могут быть успешно использованы в качестве показателей активности воспалительного процесса и фиброзной трансформации ткани почек при пиелонефритах [7]. Отмечено также, что их концентрация в моче пациентов имеет большую диагностическую значимость, чем в сыворотке крови.

Для выявления и количественного определения этих биомаркеров в моче в настоящее время применяют методы иммунохимического анализа с использованием моноклональных антител к их антигенным детерминантам и выявлении их комплексов с помощью ферментных, флуоресцентных и хемилюминесцентных меток (ИФА и ИХЛА) [3, 6, 8, 14, 16]. Об актуальности таких исследований свидетельствуют появившиеся за последние годы клинические рекомендации по диагностике, классификации и оценке тяжести хронических заболеваний почек, клинике и диагностике острого почечного повреждения [8, 10, 11, 19, 35, 37, 50].

Для поиска новых биомаркеров, характеризующих состояния клеток почек, применяется масс-спектрометрия, позволяющая идентифицировать в клинических образцах ряд низкомолекулярных белков в ничтожно малых концентрациях. Процедура так называемого панорамного анализа протеома мочи человека строится на стандартном подходе, состоящем: из отбора пробы; очистки, концентрирования и предварительном разделении смеси белков; энзиматического расщепления белков с получением смеси пептидов; хромато-масс-спектрометрического анализа смеси пептидов; поиска и идентификации белков с использованием международных баз данных. Считается, что выявление диагностически значимых составляющих протеинов белкового спектра мочи в ближайшем десятилетии позволит получить целый ряд новых биомаркеров, позволяющих внести существенный вклад в исследование ранних, доклинических стадий заболеваний почек и развитие персонализированных методов лечения. Моча — максимально доступный и почти идеальный клинический образец как для клинических, так и для фундаментальных исследований, содержащий информацию не только о почке и мочевом тракте, но и о состоянии других органов [4]. Она может быть получена неинвазивным методом в любых объемах. В настоящее время в образцах мочи человека выделено около 3500 различных белков [38, 44].

Цель исследования — выявление в моче пациентов с хроническим пиелонефритом низкомолекулярных белков, которые характерны для обострения данного заболевания и могут определяться методами ИФА и масс-спектрометрии.

Материалы и методы

Проведено клиническое наблюдение и обследование 52 человек. В первую группу (Г1) вошли 22 пациентов с обострением ХПН без лабораторных признаков нарушения функции почек, находившихся на амбулаторном лечении в ГУЗ СО «Саратовская городская поликлиника № 9». Среди обследованных были пациенты с характерными клиническими проявлениями заболевания, без сопутствующих воспалительных заболеваний и вредных привычек. Критерием включения в Г1 было наличие у пациентов обострения хронического ПН, подтвержденного анамнестическими данными, наличием характерной клинической картины, подтвержденной инструментальными и лабораторными исследованиями (ультразвуковое исследование мочевого пузыря, общеклинические анализы крови и мочи, бактериологическое исследование мочи). В исследование не включали пациентов с врожденным гидронефрозом, стриктурами мочеточника или лоханочно-мочеточникового сегмента, с выраженной сопутствующей общесоматической патологией (сахарный диабет, онкологические заболевания, ИБС, артериальная гипертензия 3-4 стадии, нарушения почечной гемодинамики), с перенесенными ранее хирургическими вмешательствами на почках. Группу сравнения (Г2) составили пациенты группы Г1 через 1,5-3 месяца после завершения лечения, без клинических проявлений обострения хронического ПН, находящиеся на этапе амбулаторного поликлинического обследования. В контрольную группу (КГ) вошли 30 практически здоровых лиц. Средний возраст пациентов с хроническим ПН (Г1 и Г2) составил 67,8 лет, лиц КГ — 53,3 года. Обследование больных ХПН согласно клиническим рекомендациям включало: обзорную рентгенографию и ультразвуковое исследование почек и мочевых путей, общеклинические анализы крови и мочи, определение сКр (креатинин сыворотки крови) и оценки СКФ (скорость клубочковой фильтрации — с помощью расчетного уравнения СКД-ЕРІ 2009). У всех обследованных пациентов не выявлены лабораторные признаки острого почечного повреждения [19].

Для исследований методом ИФА первую порцию утренней мочи, объемом не менее 10 мл, собирали в специальные стаканы с крышками. Предварительно в емкость для забора мочи вносили 20 мкл раствора ProClin 300 (Supelco, США), который позволяет предотвратить протеолиз биомаркеров в моче, контаминированной микроорганизмами [4]. Аликвоты мочи разливали в пробирки с крышками типа Eppendorf объемом 2 мл и хранили до проведения исследования при температуре -25 °С. Концентрацию VEGF,

моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), интерлейкинов-8 и -18 (IL-8 и IL-18) в моче пациентов определяли с помощью соответствующих наборов реагентов АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) для ИФА.

Сбор мочи у 6 пациентов групп Г1 и Г2 для хромато-масс-спектрометрического анализа проводили согласно стандартному протоколу [4]. В соответствии с этим протоколом для протеомного анализа мочи использовалась средняя порция второй утренней фракции (предпочтительно) или любая утренняя фракция, которая является наименее вариабельной по белковой композиции, вследствие этого — наиболее пригодной для исследований. Несмотря на малое содержание протеаз в моче, способных изменить белковую композицию образцов при их хранении, для изучения белкового состава начинали предварительную пробоподготовку не позднее чем через 20 минут после отделения фракции мочи. Каждый образец центрифугировали 10 минут при 4 °C, 2000 g для удаления загрязнений в виде крупных мертвых клеток, их фрагментов, отбирали надосадочную фракцию, которую замораживали при температуре -80 °C для длительного хранения. В дальнейшем замороженные образцы размораживали при комнатной температуре и центрифугировали повторно 10 минут при 4 °C, 2000 g.

Основные этапы подготовки образцов для протеомного анализа состояли из следующих этапов: 1) концентрирование образцов (надосадочную жидкость) центрифугированием с использованием пробирок с фильтрами AmiconUltra Ultracel-15 3k при 2000 g, 50 минут, +4 °C, до 20-ти кратного уменьшения объема; 2) высушивание образцов в вакуумном концентраторе при +30 °C; 3) восстановление (перерастворение осадка в буфере для восстановления — 0,2 M Tris основной (pH 8,5), 2,5 mM EDTA, 6M Guanidine-HCl, добавление ДТТ — 15 минут при 70 °C) и алкилирование (добавление йодацетата натрия — 30 минут при комнатной температуре в темноте) выделенной белковой фракции для денатурации белков, разрыва S-S мостиков и предотвращения обратного образования дисульфидных связей; 4) осаждение белков ацетоном с 0,1% ТФУ при -20 °C 8-19 часов и получение сухого белкового осадка (при последовательной промывке три раза этанолом с перерастворением осадка, полученного центрифугированием при 2000 g, 10 минут, +4 °C); 5) трипсинолиз — протеолиз с помощью трипсина, для чего образец растворяли в АВВ ((NH₄)₂HCO₃) буфере (pH 8,0) до конечной концентрации 1 мг/мл белка, определенной методом по Бредфорду (Bio-Rad) и добавляли трипсин

1:60 по массовым частям к белку и инкубировали при 37 °C 8-12 часов.

Анализ образцов проводили на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США) и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия) — масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса, совмещенный с линейной квадрупольной ионной ловушкой, использующейся для накопления ионов и измерения спектров индуцированной фрагментации (МС/МС) ионов. Для хроматографии использовали колонку с обращенной фазой ReproSil-Pur C18 (диаметр частиц 3 мкм, диаметр пор 100 Å, Dr. Maisch GmbH, Аммербух-Энтринген, Германия), изготовленную с использованием капилляра-эммитера (Pico-tip, New Objective Inc., США).

Масс-спектрометрический анализ фракций пептидов осуществлялся при помощи программы Xcalibur (Thermo Electron, Бремен, Германия) в 2-стадийном режиме автоматического измерения спектров. В качестве подвижной фазы использовались — растворитель А: H₂O-HCOOH (1000:1, по объему), растворитель В: CH₃CN-HCOOH (1000:1, по объему). Выполнялась градиентная хроматография с линейным увеличением относительного содержания растворителя В в потоке от 5 до 50% за 90 минут, после каждого эксперимента система промывалась 95% ацетонитрилом в течение 15 минут, а затем 100% растворителем А еще 5 минут. Измерение масс-спектров продуктов хроматографического разделения производилось в диапазоне от 300 до 1600 m/z.

Список из точных масс пептидов и масс их фрагментов использовали для поиска и идентификации белков по базе данных IPI-human (международные индексы белков, International protein indices) (version 3.65; 86379 sequences; 34740770 residues) при помощи программы Mascot (Matrix Science, Лондон, Великобритания; version 2.0.04). Дальнейшему анализу подвергались только белки, которые идентифицировались минимум по 2 пептидным фрагментам, причем один из них должен был быть уникальным для данного белка. При проведении анализа для каждого образца выполняли не менее трех технических повторов. Идентификация в поисковой машине Mascot основана на алгоритме MOWSE. Первым этапом поиска является сравнение измеренных масс продуктов МС-МС пептидов для всех записей последовательностей в базе данных с теоретическими масс-спектрами фрагментации. В итоге по степени совпадения определяли MascotScore, являющийся индексом достоверности того, что детектируемым пептидам соответствует определенный белок из конкретной базы данных. Score

всех обнаруженных пептидов (конкретного белка) суммировали, откуда вычисляли суммарный Score для белка. Основные параметры для Mascot поиска были следующие: 1) enzyme — trypsin; 2) peptidtolerance ± 5 ppm; 3) MS/MS (fragments) tolerance $\pm 0,5$ Да.

В списке белков, полученном в результате Mascot-поиска, достоверными считались только те белки, для которых были идентифицированы 2 и более триптических пептида с рейтингом (Score) более 24. Для определения места образования функции выявленных белков, а также для анализа биологических процессов организма, в которых участвуют обнаруженные в моче белки, использовались биоинформационные ресурсы по аннотации генов (Gene Ontology — GO). Частота встречаемости белка в группе пациентов оценивалась на основании полуколичественного сравнительного анализа интегральной интенсивностей триптических пептидов данного белка в хромато-масс-спектрометрическом эксперименте с использованием безметочного подхода (label-free) [4]. Для статистического анализа и определения молекулярных функций и биологических процессов, в которых участвуют белки, использовался программный пакет Perseus. В результате был получен список белков, обнаруживаемых в моче, с указанием числа пептидов, по которым они были идентифицированы, а также параметры достоверности идентификации. Основная часть информации о полученных белках была экстрагирована из баз данных UniProt (<http://www.uniprot.org>).

Для поиска потенциальных биомаркеров обострения ПН анализировали белки, содержащиеся в образцах мочи пациентов в периоде обостре-

ния (ГІ) и при переходе в хроническую форму заболевания (ГІІ).

Различия в клинических данных и клинические переменные сравнивали с помощью ранговых корреляций Спирмена и t-критерия. Разницу частоты встречаемости белка между двумя группами пациентов оценивали с помощью непараметрического теста Краскела—Уоллиса, проведенного в программе MultiExperiment Viewer (p-value меньше или равно 0,05). Данные представляли в виде медианы (Me), 25-го и 75-го процентилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$).

Результаты

При исследовании в период обострения ХПН было показано, что концентрация IL-8, VEGF, MCP-1, и IL-18 в моче больных в 5,4; 3,1; 1,7 и 1,5 раза выше ($p < 0,05$) чем соответствующие значения этих цитокинов в группе условно здоровых лиц (табл. 1). Это, очевидно, связано с тем, что уротелиальные клетки канальцев под воздействием бактериальных агентов начинают синтезировать провоспалительные цитокины и хемокины, инициируя процесс поступления в интерстиций нейтрофилов и моноцитов, играющих значимую роль в повреждении почек [5, 20]. Активация этих эффекторных клеток приводит к дальнейшему повышению продукции и экскреции с мочой MCP-1, VEGF, IL-8, IL-18.

При исследовании образцов мочи пациентов с ХПН (группа ГІІ), проведенном через 1,5–3 месяца после завершения их лечения, было отмечено снижение концентрации каждого из этих биомаркеров, однако уровни IL-8, VEGF, MCP-1 при этом статистически значимо превышали соответствующие показатели для лиц контрольной

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОКИНОВ В МОЧЕ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПИЕЛОНЕФРИТОМ, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

TABLE 1. RESULTS OF CYTOKINE DETERMINATION IN URINE OF PATIENTS WITH CHRONIC PYELONEPHRITIS, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Группа обследованных пациентов Group surveyed	Концентрация исследуемых биомаркеров в моче пациентов, пг/мл Concentration of the studied biomarkers in the urine of patients, pg/ml			
	MCP-1	VEGF	IL-8	IL-18
ГІ Group I n = 22	429,5* (363,9-452,5)	101,6* (65,6-180,15)	34,3* (21,4-71,9)	49,5* (47,1-61,3)
ГІІ Group II n = 22	306,5* (256,1-388,1)	65,3* (36,2-86,4)	18,7* (13,7-45,4)	39,3 (36,5-42,2)
КГ Control group n = 30	252,2 (156,2-287,6)	33,0 (19,0-40,8)	6,4 (4,6-16,3)	32,3 (24,1-38,9)

Примечание. * – $p < 0,05$ в сравнении с КГ.

Note. *, $p < 0.05$ compared to control group.

ТАБЛИЦА 2. СПИСОК БЕЛКОВ, ДЕМОНИСТРИРУЮЩИХ СТАТИСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ РАЗЛИЧИЯ ПРИ СРАВНЕНИИ БОЛЬНЫХ ГП И ГІ

TABLE 2. LIST OF PROTEINS DEMONSTRATING STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCES IN COMPARISON OF PATIENTS GROUPS ГП AND ГІ

Белок (Proteins)	P value
ENOA-HUMAN	0,005708122
KV201-HUMAN	0,017941503
GP2-HUMAN	0,01861632
BGAL-HUMAN	0,02458857
K1C27-HUMAN	0,02458857
KI13B-HUMAN	0,02458857
KV113-HUMAN	0,037242543
S10A9-HUMAN	0,037242543
RS27A-HUMAN	0,039351836
GRM1A-HUMAN	0,047624078

группы. Это может быть связано с тем, что у больных ХПН не произошло санации всех вовлеченных в воспалительный процесс клеток уротелия и почечного интерстиция, вероятно, из-за способности возбудителей инфекции «ускользать» от контроля иммунной системы. Повышенная экскреция MCP-1 с мочой свидетельствует о формировании инфильтратов в почечной паренхиме, ремоделировании почечного кровотока и развитии тканевой гипоксии, стимулирующей синтез VEGF. Сохранение высокой концентрации провоспалительного цитокина IL-8 и VEGF может быть также связано с включением в воспалительный процесс экстрацеллюлярного матрикса, усилением фиброгенеза, разрушением базальной мембраны канальцев и эпителиально-мезенхимальной трансформацией клеток уротелия [12].

Проведенный одновременно масс-спектрометрический анализ мочи подтвердил, что вместе с цитокинами и факторами роста у больных хроническим ПН в стадии обострения появляются специфические белки.

У пациентов ГП в моче определен 661 протеин. В образцах мочи пациентов с хроническим ПН в стадии обострения было идентифицировано 533 белка. Сравнение протеомных профилей мочи больных ГП и ГІ выявило достоверное различие белковых спектров. Период обострения и переход в хроническую форму ПН отличался статистически значимыми различиями ($p < 0,05$) для 10 белков в моче по частоте встречаемости. Среди них: 1 — альфа-енолаза [29]; 2 — KV201_HUMAN — переменная иммуноглобулина каппа 2D-40 [46, 49]; 3 — панкреатический секреторный гранулярный мембранный основной гликопротеин GP2 [47]; 4 — β -галактозидаза BGAL- [30,

32]; 5 — кератин I типа цитоскелета 27 [28]; 6-кинезин-подобный белок KIF13B [22]; 7 — KV113_HUMAN-иммуноглобулин каппа, переменная 1-13 (***) [26, 28, 33, 49]; 8 — белок S100-A9 [45]; 9 — рибосомальный убиквитин — 40S S27a [23]; 10 — GRAM-содержащий белок 1A (***) [44] (табл. 2).

Поиск информации по выявленным белкам, выполненный по открытым базам данных, показал, что пять из них связаны с процессами повреждения и последующей трансформацией метаболических и функциональных свойств клеток уротелия. α -енолаза обнаруживается почти во всех сегментах нефрона, особенно дистальных и собирательных канальцах [29, 43]. GP2-HUMAN относится к панкреатическим секреторным гранулярным мембранным основным гликопротеинам [47]. Нарастание экскреции с мочой BGAL-HUMAN — β -галактозидазы имеет место при введении повреждению почечной ткани нефротоксическими агентами [39]. K1C27-HUMAN-кератин I типа 27 нарастает при ремоделировании тканевых структур [28]; RS27A-HUMAN — рибосомальный белок убиквитин-40S S27a характеризует степень тубулоинтерстициального и клубочкового повреждения, приводящего к почечной недостаточности и гибели животных [40].

К участникам воспалительного процесса и нарушения локальной иммунной защиты уротелия канальцев почек могут быть отнесены еще пять выделенных белков: переменная иммуноглобулина каппа, 2D-40 [46], кинезин-подобный белок KIF13B [22], белок S100-A9 [48], иммуноглобулин каппа переменная 1-13 [24, 31, 33, 34], GRAM-содержащий белок 1A [44].

Все специфические белки, обнаруженные в моче у больных при обострении хронического ПН, можно считать биомаркерами деструктивных изменений стенок канальцев. В начальных стадиях заболевания повреждение структурно-функциональных свойств уроэпителиоцитов способствует развитию микробно-воспалительного процесса на уровне эпителиальной выстилки почечных канальцев. На стадии обострения хронического ПН они, по-видимому, становятся одной из характеристик нарушения структурно-функциональных свойств канальцевого эпителия почек.

Их различная присутствие в образцах больных хроническим ПН в период обострения заболевания и вне него позволяет рассматривать данные белки как потенциальные биомаркеры, которые могут быть полезны в непрерывном мониторинге состояния эпителиальной выстилки почечных канальцев и контроля степени нарушения механизмов иммунной защиты почечной паренхимы.

Вероятно, что дальнейшие исследования с целью определения чувствительности и специфичности белков α -енолаза, GP2-HUMAN; BGAL-HUMAN; K1C27-HUMAN-кератин I типа 27, RS27A-HUMAN) в оценке степени повреждения паренхимы почек, проведенные на большой выборке пациентов с заболеваниями почек, позволят выделить из этой группы наиболее перспективные новые биомаркеры. Для их исследования, очевидно, могут быть созданы более доступные для лабораторной диагностики методы ИФА или ИХЛА.

Выводы

1. Определение концентрации MPC-1, IL-8, VEGF и IL-18 в моче с помощью ИФА — доступ-

ным неинвазивным методом исследования, позволяющий оценить выраженность воспалительного процесса, тяжесть поражения почечной паренхимы у пациентов с хроническим пиелонефритом в период обострения заболевания и после проведенного лечения.

2. В результате масс-спектрометрического анализа образцов мочи больных ХПН выявлены пять белков, частота встречаемости которых значительно возрастает при обострении заболевания. При проведении дополнительных исследований эти белки, возможно, могут стать новыми биомаркерами повреждения и трансформации метаболических и функциональных свойств клеток уротелия у пациентов с заболеваниями почек.

Список литературы / References

1. Алексеев А.В., Гильманов А.Ж., Гатиятуллина Р.С., Ракипов И.Г. Современные биомаркеры острого повреждения почек // Вестник Татарстана, 2014. Т. 7, № 583. С. 22-27. [Alekseev A.V., Gilmanov A.Zh., Gatiyatullina R.S., Rakipov I.G. Modern biomarkers of sharp injury of kidneys. *Vestnik Tatarstana = Bulletin of Tatarstan*, 2014, Vol. 7, no. 583, pp. 22-27. (In Russ.)]
2. Аполихин О.И., Сивков А.В., Москалева Н.Г., Солнцева Т.В., Комарова В.А. Анализ уронефрологической заболеваемости и смертности в Российской Федерации за десятилетний период (2002-2012 гг.) по данным официальной статистики // Экспериментальная и клиническая урология, 2014. № 2. С. 3-12. [Apolikhin O.I., Sivkov A.V., Moskaleva N.G., Solntseva N.V., Komarova V.A. Analysis of the uronephrological morbidity and mortality in the Russian Federation during the 10-year period (2002-2012) according to the official statistics. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology*, 2014, no. 2, pp. 3-12. (In Russ.)]
3. Белохвостикова Т.С., Орлова Г.М., Фатахова О.А., Шеметова В.Г., Благовещенская Н.В., Козина О.А. Липокаин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, у больных с хронической болезнью почек: клинико-лабораторные взаимосвязи // Нефрология и диализ, 2011. Т. 13, № 3. С. 268-269. [Belokhvostikova T.S., Orlova G.M., Fatahova O.A., Shemetova V., Blagoveshchenskaya N.B., Kozina O.A. Lipocalin associated with neutrophil gelatinase in patients with chronic kidney disease: clinical and laboratory relationships. *Nefrologiya i dializ = Nephrology and Dialysis*, 2011, Vol. 13, no. 3, pp. 268-269. (In Russ.)]
4. Вараксин Н.А., Захарова Н.Б., Понукалин А.Н., Россоловский А.Н., Рябичева Т.Г., Офицеров В.И. Цитокины и С-реактивный белок при первичном пиелонефрите: сравнение диагностической значимости концентрации в моче и сыворотке крови // Новости «Вектор-Бест», 2012. Т. 2, № 64. С. 3-9. [Varaksin N.A., Zakharova N.B., Ponukalin A.N., Rossolovsky A.N., Ryabicheva T.G., Ofitserov V.I. Cytokines and C-reactive protein at primary pyelonephritis: comparison of the diagnostic importance of concentration in urine and serum of blood. *Novosti "Vektor-Best" = News of "Vektor-Best"*, 2012, Vol. 2, no. 64, pp. 3-9. (In Russ.)]
5. Вельков В.В., Резникова О.И. Новые возможности для лабораторной диагностики хронической и острой ренальной дисфункции // Научно-практический журнал «Клинико-лабораторный консилиум», 2011. № 3. С. 26-30. [Velkov V.V., Reznikova O.I. New opportunities for laboratory diagnosis of chronic and sharp renalny dysfunction. *Nauchno-prakticheskiy zhurnal "Kliniko-laboratornyy konsilium" = Scientific and Practical Journal "Clinical Laboratory Consultation"*, 2011, no. 3, pp. 26-30. (In Russ.)]
6. Глыбочко П.В., Захарова Н.Б., Понукалин А.Н., Гражданов Р.А., Россоловский А.Н., Вараксин Н.А., Полозов А.Б. Диагностическое значение подъема уровня провоспалительных цитокинов в моче при обострении хронического калькулезного пиелонефрита // Саратовский научно-медицинский журнал, 2011. Т. 7, № 2. прил. С. 143. [Glybochko P.V., Zakharova N.B., Ponukalin A.N., Grazhdanov R.A., Rossolovsky A.N., Varaksin N.A., Polozov A.B. Diagnostic value of rise in level of pro-inflammatory tsitokin in urine at an exacerbation of chronic kalkulezny pyelonephritis. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2011, Vol. 7, no. 2, Suppl., p. 143. (In Russ.)]
7. Добронравов В.А. Обзор патофизиологии острого повреждения почек // В: Смирнов А.В., Добронравов В.А., Румянцев А.Ш., Каюков И.Г. Острое повреждение почек. М.: МИА, 2015. С. 30-79. [Dobronravov V.A. Overview of the pathophysiology of acute kidney injury. In: Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Rumyantsev A.Sh., Kayukov I.G. Acute kidney injury]. Moscow: Medical Information Agency, 2015, pp. 30-79.
8. Захарова Н.Б., Долгов А.Б., Иноземцева Н.Д., Блюмберг Б.И. Биомаркеры инфекционно-воспалительных заболеваний почек и мочевыводящих путей // Справочник заведующего КДЛ, 2013. № 2. С. 48-59. [Zakharova N.B., Dolgov A.B., Inozemtseva N.D., Blyumberg B.I. Biomarkers infectious – inflammatory diseases

of kidneys and urinary tract. *Spravochnik zaveduyushchego KDL = Reference Book of the Head of Clinical Diagnostic Laboratory*, 2013, no. 2, pp. 48-59. (In Russ.)]

9. Захарова Н.Б., Пастушкова Л.Х., Ларина И.М., Каширина Д.Н., Лях Р.В., Попков В.М. Значение протеомного состава мочи при заболеваниях мочевыводящих путей (обзор литературы) // Экспериментальная и клиническая урология, 2017. № 1. С. 22-26. [Zakharova N.B., Pastushkova L.Kh., Larina I.M., Kashirina D.N., Lyakh R.V., Popkov V.M. The value of the proteomic composition of the urine in diseases of the urinary tract (review of literature). *Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology*, 2017, no. 1, pp. 22-26. (In Russ.)]

10. Земченков А.Ю., Томила Н.А. «К/ДОКИ» обращается к истокам хронической почечной недостаточности (О новом разделе Рекомендаций К/ДОКИ по диагностике, классификации и оценке тяжести хронических заболеваний почек) // Нефрология и диализ, 2004. Т. 6, № 3. С. 204-220. [Semchenkov A.Yu., Tomilina N.A. "DOQI" refers to the origins of chronic renal failure (On a new tab of the recommendations of K/DOQI for the diagnosis, classification and assessment of severity of chronic kidney disease). *Nefrologiya i dializ = Nephrology and Dialysis*, 2004, Vol. 6, no. 3, pp. 204-220. (In Russ.)]

11. Крайдашенко О.В., Долиная М.А. Роль биомаркеров в оценке характера повреждений почек у больных с гипертонической болезнью // Клиническая нефрология, 2014. № 3. С. 23-25. [Kraydashenko O.V., Valley M.A. Rol of biomarkers in an assessment of nature of injuries of kidneys at patients with a hypertensive illness. *Klinicheskaya nefrologiya = Clinical Nephrology*, 2014, no. 3, pp. 23-25. (In Russ.)]

12. Морозов Д.А., Морозова О.Л., Захарова Н.Б., Лакомова Д.Ю. Патогенетические основы и современные проблемы диагностики хронического обструктивного пиелонефрита у детей // Урология, 2013. № 2. С. 129-134. [Morozov D.A., Morozova O.L., Zakharova N.B., Lakomova D.Yu. Pathogenetic bases and modern problems of diagnosis of chronic obstructive pyelonephritis at children. *Urologiya = Urology*, 2013, no. 2, pp. 129-134. (In Russ.)]

13. Новоселова О.В., Волынчик Е.П., Кононова С.В., Вельков В.В., Михайлов Ю.В. Клиническое значение качественного и количественного анализа белкового состава мочи // Лаборатория, 2006. № 1. С. 7-9. [Novoselova O.V., Volynchik E.P., Kononova S.V., Velkov V.V., Mikhaylov Yu.V. Clinical value of the qualitative and quantitative analysis of proteinaceous composition of urine. *Laboratoriya = Laboratory*, 2006, no. 1, pp. 7-9. (In Russ.)]

14. Попков В.М., Долгов А.Б., Захарова Н.Б., Понукалин А.Н., Вараксин Н.А. Мочевые биомаркеры при остром пиелонефрите // Саратовский научно-медицинский журнал, 2013. Т. 9, № 1. С. 110-115. [Popkov V.M., Dolgov A.B., Zakharova N.B., Ponukalin A.N., Varaksin N.A. Uric biomarkers at sharp pyelonephritis. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2013, Vol. 9, no. 1, pp. 110-115. (In Russ.)]

15. Пролетов Я.Ю., Саганова Е.С., Галкина О.В. Роль некоторых биомаркеров в оценке характера хронического повреждения почек у пациентов с первичными гломерулопатиями // Нефрология, 2013. № 1. С. 60-69. [Proletov Ya.Yu., Saganova E.S., Galkina O.V. [Proletov Ya. Yu., Saganova E. S., Galkina O. V. The role of several biomarkers in estimation of kidney injury in patients with primary glomerulopathies. *Nefrologiya = Nephrology*, 2013, no. 1, pp. 60-69. (In Russ.)]

16. Ребров А.П., Захарова Н.Б., Оксеньчук А.Н., Кароли О.Г., Патрикеева Д.А., Попыхова Э.Б. Диагностическое значение определения биомаркеров в сыворотке крови и моче больных системной красной волчанкой // Клиническая нефрология, 2014. Т. 1. С. 10-14. [Rebrov A.P., Zakharova N.B., Oksenchuk A.N., Karpova O.G., Patrikeeva D.A., Popykhova E.B. Diagnostic value of definition of biomarkers in serum of blood and urine of patients with a system red volchanka. *Klinicheskaya nefrologiya = Clinical Nephrology*, 2014, Vol. 1, pp. 10-14. (In Russ.)]

17. Сerezhenkov А.В., Горелов А.И. Цитокиновый профиль крови пациентов с хроническим пиелонефритом // Здоровье – основа человеческого потенциала – проблемы и пути их решения, 2013, Т. 8, № 1. С. 510-512. [Serezhenkov A.V., Gorelov A.I. Cytokines a profile of blood of patients with chronic pyelonephritis. *Zdorovye – osnova chelovecheskogo potentsiala – problemy i puti ikh resheniya = Health – a Basis of Human Potential – a Problem and a Way of Their Decision*, 2013, Vol. 8, no. 1, pp. 510-512. (In Russ.)]

18. Смирнов А.В., Добронравов В.А., Румянцев А.Ш., Шилов Е.М., Ватазин А.В., Каюков И.Г., Кучер А.Г., Есаян А.М. Национальные рекомендации. Острое повреждение почек: основные принципы диагностики, профилактики и терапии. Часть 1 // Нефрология. 2016. Т.20, № 1. С. 79-104. [Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Rumyantsev A.Sh., Shilov E.M., Vatazin A.V., Kayukov I. G., Kucher A.G., Yesayan A.M. National recommendations. Sharp injury of kidneys: basic principles of diagnostics, prevention and therapy. Part 1. *Nefrologiya = Nephrology*, 2016, Vol. 20, no. 1, pp. 79-104. (In Russ.)]

19. Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В. Молекулярные механизмы интерстициального фиброза при прогрессирующих заболеваниях почек // Нефрология и диализ, 2006. № 1. С. 26-35. [Chebotareva N.V., Bobkova I.N., Kozlovskaya L.V. Molecular mechanisms of interstitial fibrosis in progressive kidney diseases (literature Review). *Nefrologiya i dializ = Nephrology and Dialysis*, 2006, no. 1, pp. 26-35. (In Russ.)]

20. Швецов М.Ю., Чжен Аньтаи, Козловская Л.В., Серова Е.В. Мочевая экскреция факторов регуляции ангиогенеза и маркеров повреждения почек при хроническом гломерулонефрите: значение в оценке прогрессирования // Терапевтический архив, 2014. Т. 87, № 6. С. 75-82. [Shvetsov M.Yu., Zheng A., Kozlovskaya L.V., Serova A.G. Urinary excretion of angiogenesis regulatory factors and renal injury markers in chronic glomerulonephritis:

Significance in the assessment of progression]. [Article in Russian; Abstract available in Russian from the publisher. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2015, Vol. 87, no. 6, pp. 75-82. (In Russ.)]

21. Anderson G.P. Free immunoglobulin light chains in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2012, Vol. 185, no. 8, pp. 793-795.

22. Belgareh-Touzé N., Léon S., Erpapazoglou Z., Stawiecka-Mirota M., Urban-Grimal D., Haguenaue-Tsapis R. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008, Vol. 36 (Pt 5), pp. 791-796.

23. Champaboon C., Sappington K.J., Guenther B.D., Ross K.F., Herzberg M.C. Calprotectin S100A9 calciumbinding loops I and II are essential for keratinocyte resistance to bacterial invasion. *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284, no. 11, pp. 7078-7090.

24. Chiangjong W., Thongboonkerd V. Calcium oxalate crystals increased enolase-1 secretion from renal tubular cells that subsequently enhanced crystal and monocyte invasion through renal interstitium. *Sci. Rep.*, 2016, no. 6, 24064. doi: 10.1038/srep24064.

25. Cohen G., Rudnicki M., Hörl W.H. Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils. *Kidney Int.*, 2001, Vol. 59, pp. S48-52.

26. Damman K., Masson S., Hillege H.L., Voors A.A., van Veldhuisen D.J., Rossignol P., Proietti G., Barbuzzi S., Nicolosi G.L., Tavazzi L., Maggioni A.P., Latini R. Tubular damage and worsening renal function in chronic heart failure. *JACC Heart Fail.*, 2013, Vol. 1, no. 5, pp. 417-424.

27. Desjardins L., Liabeuf S., Lenglet A., Lemke H.-D., Vanholder R., Choukroun G., Massy Z.A., E.U.T.W. Group. Association between free light chain levels, and disease progression and mortality in chronic kidney disease. *Toxins*, 2013, Vol. 5, no. 11, pp. 2058-2073.

28. Eltoweissy M., Müller G.A., Bibi A., Nguye P.V., Dihazi G.H., Müller C.A., Dihazi H. Proteomics analysis identifies PARK7 as an important player for renal cell resistance and survival under oxidative stress. *Mol. Biosyst.*, 2011, Vol. 7, no. 4, pp. 1277-1288.

29. Esparvarinha M., Nickho H., Mohammadi H., Aghebati-Maleki L., Abdolalizadeh J., Majidi J. The role of free kappa and lambda light chains in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, Vol. 91, pp. 632-644.

30. Frosch M., Metze D., Foell D., Vogl T., Sorg C., Sunderkötter C., Roth J. Early activation of cutaneous vessels and epithelial cells is characteristic of acute systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Exp. Dermatol.*, 2005, Vol. 14, no. 4, pp. 259-265.

31. Hamed S.A. The effect of antiepileptic drugs on the kidney function and structure. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, 2017, Vol. 10, no. 9, pp. 993-1006.

32. Hutchison C.A., Harding S., Hewins P., Mead G.P., Townsend J., Bradwell A.R., Cockwell P. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2008, Vol. 3, no. 6, pp. 1684-1690.

33. Jia J., Arif A., Terenzi F., Willard B., Plow E.F., Hazen S.L., Fox P.L. Target-selective protein S-nitrosylation by sequence motif recognition. *Cell*, 2014, Vol. 159, pp. 623-634.

34. Jungbauer C.G., Birner C., Jung B., Buchner S., Lubnow M., von Bary C., Endemann D., Banas B., Mack M., Böger C.A., Riegger G., Luchner A. Kidney injury molecule-1 and N-acetyl- β -D-glucosaminidase in chronic heart failure: possible biomarkers of cardiorenal syndrome. *Eur. J. Heart Fail.*, 2011, Vol. 13, no. 10, pp. 1104-1110.

35. Ko G.J., Grigoryev D.N., Linfert D., Jang H.R., Watkins T., Cheadle C., Racusen L., Rabb H. Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI to CKD transition. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2010, Vol. 298, pp. 1472-1483.

36. Nejat M., Pickering J.W., Walker R.J., Endre Z.H. Rapid detection of acute kidney injury by plasma cystatin C in the intensive care unit. *Nephrol. Dial Transplant.*, 2010, Vol. 25, pp. 3283-3289.

37. Merchant M.L., Klein J.B. Proteomics and diabetic nephropathy. *Semin. Nephrol.*, 2007, Vol. 27, pp. 627-636.

38. Ossipova O., Chu C.W., Fillatre J., Brott B.K., Itoh K., Sokol S.Y. The involvement of PCP proteins in radial cell intercalations during *Xenopus* embryonic development. *Dev. Biol.*, 2015, Vol. 408, no. 2, pp. 316-327.

39. Rajan V., Mitch W.E. Ubiquitin, proteasomes and proteolytic mechanisms activated by kidney disease. *Biochim Biophys Acta.*, 2008, Vol. 1782, no. 12, pp. 795-799.

40. Shen S.J., Hu Z.X., Li Q.H. Implications of the changes in serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C in patients with chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*, 2014, Vol. 19, no. 3, pp. 29-35.

41. Schiepati A., Remuzzi G. Chronic renal disease as a public health problem: Epidemiology, social and economic implications. *Kidney Int.* 2005, Vol. 68, Suppl. 98, pp. S7-S10.

42. Schroeder H.W.Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 125, no. 2, Suppl. 2, pp. 41-52.

43. Thongboonkerd V. Study of diabetic nephropathy in the proteomic era. *Contrib. Nephrol.*, 2011, Vol. 170, pp. 172-183.

44. Turnbull A.P., Ioannidis S., Krajewski W.W., Pinto-Fernandez A., Heride C., Martin A.C.L., Tonkin L.M., Townsend E.C., Buker S.M., Lancia D.R., Caravella J.A., Toms A.V., Charlton T.M., Lahdenranta J., Wilker E., Follows B.C., Evans N.J., Stead L., Alli C., Zarayskiy V.V., Talbot A.C., Buckmelter A.J., Wang M., McKinnon C.L., Saab F., McGouran J.F., Century H., Gersch M., Pittman M.S., Marshall C.G., Raynham T.M., Simcox M., Stewart L.M.D., McLoughlin S.B., Escobedo J.A., Bair K.W., Dinsmore C.J., Hammonds T.R., Kim S., Urbé S.,

Clague M.J., Kessler B.M., Komander D. Molecular basis of USP7 inhibition by selective small-molecule inhibitors. *Nature*, 2017, Vol. 550, no. 7677, pp. 481-486.

45. Uchil P.D., Nagarajan A., Kumar P. β -Galactosidase. *Cold Spring Harb Protoc*, 2017, Vol. 10, pdb.top096198. doi: 10.1101/pdb.top096198

46. Verzola D., Gandolfo M.T., Gaetani G., Ferraris A., Mangerini R., Ferrario F., Villaggio B., Gianiorio F., Tosetti F., Weiss U., Traverso P., Mji M., Deferrari G., Garibotto G. Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2008, Vol. 295, no. 5, pp. 1563-1573.

47. Vogl T., Tenbrock K., Ludwig S., Leukert N., Ehrhardt C., van Zoelen M.A. Nacken W., Foell D., van der Poll T., Sorg C., Roth J. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 9, pp. 1042-1049.

48. Wang N.S., McHeyzer-Williams L.J., Okitsu S.L., Burris T.P., Reiner S.L., McHeyzer-Williams M.G. Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and ROR α . *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 6, pp. 604-611.

49. Zubowska M., Wyka K., Fendler W., Młynarski W., Zalewska-Szewczyk B. Interleukin-18 as a marker of chronic nephropathy in children after anticancer treatment. *Disease Markers*, 2013, Vol. 35, pp. 811-818.

Авторы:

Захарова Н.Б. — д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Пастушкова Л.Х. — д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН «ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН», Москва, Россия

Лях Р.В. — аспирант кафедры урологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Понукалин А.Н. — к.м.н., доцент кафедры урологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Вараксин Н.А. — заведующий лабораторией цитокинов АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Офицеров В.И. — д.б.н., заместитель генерального директора АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Кононихин А.С. — к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории масс-спектрометрии биомакромолекул ФГБУН «Институт энергетических проблем химической физики имени В.Л. Тальрозе РАН», Москва, Россия

Ларина И.М. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией ФГБУН «ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН», Москва, Россия

Николаев Е.Н. — д.ф.-м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий лабораторией масс-спектрометрии биомакромолекул ФГБУН «Институт энергетических проблем химической физики имени В.Л. Тальрозе РАН», Москва, Россия

Authors:

Zakharova N.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Saratov State V. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Pastushkova L.Kh., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Lyakh R.V., Postgraduate Student, Department of Urology, Saratov State V. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Ponukalin A.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Urology, Saratov State V. Razumovsky Medical University, Saratov, Russian Federation

Varaksin N.A., Chief, Laboratory of Cytokines, JSC "Vector-Best", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Ofitserov V.I., PhD, MD (Biology), Deputy General Director for Research, JSC "Vector-Best", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Kononikhin A.S., PhD (Physics and Mathematics), Leading Research Associate, Laboratory of Mass Spectrometry of Biomacromolecules, V. Talrose Institute of Energy Problems in Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Larina I.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Laboratory, Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Nikolaev E.N., PhD, MD (Physics and Mathematics), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Chief, Laboratory of Mass Spectrometry of Biomacromolecules, V. Talrose Institute of Energy Problems in Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 10.03.2018

Отправлена на доработку 13.03.2018

Принята к печати 22.10.2018

Received 10.03.2018

Revision received 13.03.2018

Accepted 22.10.2018

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Емельянова О.И., Гонтарь И.П., Русанова О.А., Зборовская И.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Резюме. Цель исследования: усовершенствование иммунологической диагностики системной склеродермии путем определения антител к церулоплазмину, его количества и ферментативной активности, а также контроля за эффективностью терапии с помощью иммобилизированной формы магнитоуправляемого иммуносорбента на основе церулоплазмина.

Было обследовано 30 практически здоровых лиц, 68 больных системной склеродермией. В исследование включались больные с направительным диагнозом системной склеродермией, давшие информированное согласие на участие. Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации пересмотра 2013 года (ACR / EULAR). Всем участникам обследования проводили исследование крови методом иммуноферментного анализа определения антител к церулоплазмину при поступлении в стационар и перед выпиской.

Было выявлено, что у больных системной склеродермией наблюдается снижение оксидазной активности церулоплазмина, увеличение его количества, а также повышение уровня антител к нему по сравнению с контрольной группой. Выявлена зависимость количества антител к изучаемому ферменту от активности, характера течения и стадии заболевания. Обнаружена достоверная обратная корреляция между содержанием антител к церулоплазмину и количеством эритроцитов, уровнем гемоглобина. Впервые для оценки активности патологического процесса при системной склеродермии применена комплексная оценка трех показателей: ферментативной активности, количества церулоплазмина и содержания антител к нему. Выявлено, что аутоантитела к церулоплазмину чаще обнаруживаются у больных системной склеродермией с высокой активностью болезни, подострым течением, при наличии поражения печени, легких и анемии. Обнаружено, что антитела к церулоплазмину выявляются на ранних стадиях развития системной склеродермии и могут быть использованы для своевременной диагностики заболевания. Показано, что динамика изученных показателей может быть использована для суждения об эффективности проводимой терапии.

Снижение ферментативной активности церулоплазмина, повышение количества его и уровня антител к нему могут быть использованы как дополнительный критерий диагностики активности системной склеродермии, способствуют более точному определению активности, характера течения патологического процесса и указывают на наличие разнообразных клинических форм заболевания. Применение этих показателей для мониторинга проводимой в условиях стационара терапии позволяет более точно оценить ее эффективность и коррекцию. Изучение антителообразования к церулоплазмину, а также его количества и биохимической активности расширяет имеющиеся представления о патогенезе ревматических заболеваний, намечает пути для дальнейших научных изысканий и отражает заинтересованность антиоксидантной системы при иммунологических заболеваниях.

Ключевые слова: церулоплазмин, системная склеродермия, антитела, магнитосорбенты, диагностика, антиоксидантная система

Адрес для переписки:

Емельянова Ольга Ивановна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского»
400138, Россия, г. Волгоград, ул. Землячки, 76.
Тел.: 8 (8442) 78-90-98.
Факс: 8 (8442) 54-32-01.
E-mail: emelyanova.vlg@mail.ru

Address for correspondence:

Emelyanova Olga I.
A. Zborovsky Research Institute for Clinical and Experimental
Rheumatology
400138, Russian Federation, Volgograd, Zemlyachki str., 76.
Phone: 7 (8442) 78-90-98.
Fax: 7 (8442) 54-32-01.
E-mail: emelyanova.vlg@mail.ru

Образец цитирования:

О.И. Емельянова, И.П. Гонтарь, О.А. Русанова,
И.А. Зборовская «Диагностическое значение
показателей церулоплазмина при системной
склеродермии» // Медицинская иммунология, 2019.
Т. 21, № 2. С. 351-358.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-351-358

© Емельянова О.И. и соавт., 2019

For citation:

O.I. Emelyanova, I.P. Gontar, O.A. Rusanova,
I.A. Zborovskaya "Diagnostic value of ceruloplasmin in
systemic scleroderma", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2,
pp. 351-358. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-351-358

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-351-358

DIAGNOSTIC VALUE OF CERULOPLASMIN IN SYSTEMIC SCLERODERMA

Emelyanova O.I., Gontar I.P., Rusanova O.A., Zborovskaya I.A.

A. Zborovsky Research Institute for Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Abstract. Objective of the present study was to refine immune diagnostics of systemic scleroderma by determining ceruloplasmin antibodies, their amounts and enzymatic activity, as well as control of effectiveness of therapy with ceruloplasmin-based immobilized magnet-controllable immunosorbents.

Thirty apparently healthy individuals and 68 patients with systemic scleroderma were examined. The study included patients with proven diagnosis of systemic scleroderma who signed an informed consent. The study was performed in accordance with the principles of World Medical Association Declaration of Helsinki rev. 2013 (ACR/EULAR). All participants had their blood tested by means of immunoenzyme detection method for antibodies to ceruloplasmin. The measurements were performed upon admission to the hospital and prior to discharge. The following results were obtained: it was established that the patients with systemic scleroderma showed a reduced oxidase activity of ceruloplasmin, increased ceruloplasmin levels, as well as elevated antibodies to ceruloplasmin compared with the control group. A link was established between the amounts of antibodies to the given enzyme, and activity, clinical course and stage of the disease. It was found that there is a reliable negative correlation between the level of ceruloplasmin antibodies, amount of RBCs, and hemoglobin level. For the first time, a complex assessment of three parameters was employed. The studied parameters were: enzymatic activity, ceruloplasmin amounts, and antibodies to ceruloplasmin. It was found that the autoantibodies to ceruloplasmin are more often found in systemic scleroderma patients who show a highly active disease, subacute clinical course with involvement of liver, lungs, and anemia. It was found that antibodies to ceruloplasmin are detected at early stages of systemic scleroderma development and may be used in timely diagnosis of the clinical condition. It was shown that the change of parameters under study over time can serve as a basis for evaluation of therapeutic effectiveness.

Conclusion: a decreased enzymatic activity of ceruloplasmin, its elevated amount and increased antibodies to ceruloplasmin can be approved as an additional diagnostic tool in evaluation of systemic scleroderma activity. These parameters promote a more accurate assessment of the disease activity and of the nature of the pathologic process; they can serve as an indication of a variety of clinical forms of the disease. Employing these parameters for monitoring of administered therapy in hospital settings permits a more accurate assessment of its effectiveness and making its adjustments. Studying ceruloplasmin antibody formation, amount of ceruloplasmin and its biochemical activity extends the existing concept of rheumatic disease pathogenesis, outlines a way towards further research and reflects involvement of antioxidant system in immune disorders.

Keywords: ceruloplasmin, systemic scleroderma, antibodies, magnet-controllable sorbents, diagnostics, antioxidant system

Системная склеродермия представляет собой хроническое полисиндромное заболевание с неуклонно прогрессирующим течением, характерными склеротическими изменениями кожи, опорно-двигательного аппарата, внутренних органов (легких, сердца, пищеварительного тракта, почек), каскадными нарушениями микроциркуляции и вазоспастическими нарушениями по типу синдрома Рейно.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в изучении этого тяжелого и, как правило, прогностически неблагоприятного заболевания, проблема эта еще далека от разрешения. Вариабельность клинической картины, полиморфизм проявлений затрудняют диагностику, а недостающие знания этиопатогенеза склеродермического процесса не позволяют выработать оптимальную терапевтическую тактику.

Согласно современным представлениям, важным звеном патогенеза ССД является развитие иммунопатологических реакций на антигены нуклеиновой, липидной и белковой природы (Гусева Н.Г., 2000). В последние годы пристальное внимание уделяют участию активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантной системы (АОС) в развитии ССД [1, 2, 3]. Обоснованием участия свободных радикалов в патогенезе ССД является способность повреждать белки, липиды, ДНК, РНК, придавая им свойства аутоантигенов и провоцируя выработку аутоантител. Недостаточность антиоксидантной защиты при ревматических заболеваниях (РЗ), выражающаяся в накоплении вторичных продуктов свободнорадикальных реакций, может быть связана с образованием антител (АТ) к ферментам-антиоксидантам [4], в том числе к основному внеклеточному энзиму анти-

окислительной защиты — церулоплазмину (ЦП). Выбор этого медьсодержащего гликопротеида плазмы крови, обладающего мультиферментными свойствами, в качестве объекта исследования не случаен. ЦП является одним из основных внеклеточных ферментов-антиоксидантов, он играет важную роль в патогенезе (РЗ). Данные о содержании и активности ЦП в крови больных ССД весьма противоречивы, что связано с различными подходами к отбору пациентов и разными методиками определения этих показателей. При ССД отмечено накопление вторичных токсичных продуктов свободнорадикальных реакций, таким образом, имеется дисбаланс между продукцией и утилизацией кислорода. Причины подобного дисбаланса до сих пор не ясны. Одной из причин функциональной недостаточности энзимов, в том числе ферментов-антиоксидантов, считают образование антител АТ к ним [5, 6, 10].

Цель исследования — усовершенствование иммунологической диагностики ССД путем определения АТ к ЦП, а также его количества и ферментативной активности.

Материалы и методы

Исследовалась сыворотка 30 практически здоровых лиц доноров областной станции переливания крови (г. Волгоград), 68 больных ССД в отделении ревматологии ГУЗ ГБ № 25 г. Волгограда. В исследование включались больные с направительным диагнозом ССД, давшие информированное согласие на участие. Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации 1996 г., пересмотренным в 2013 г. (ACR/EULAR).

Критерии включения в исследование: возраст старше 18 лет, наличие информированного согласия, достоверно подтвержденный диагноз ССД. В исследование не включали больных с тяжелыми сопутствующими заболеваниями, требовавшими активного лечения (сахарным диабетом 1 или 2 типа, ХСН III и IV ФК, хронической почечной недостаточностью в терминальной стадии, дыхательной недостаточностью 2-й и 3-й степени, злокачественными опухолями, вирусными гепатитами и ВИЧ-инфекцией, алкоголизмом и психическими расстройствами), а также беременных женщин.

АТ к ЦП определяли иммуноферментным методом в модификации И.П. Гонтаря с использованием гранулированных антигенных препаратов [7, 9, 10]. Полученные значения выражали в единицах оптической плотности (е.о.п.) и считали положительными при превышении величин экстинкции, найденных для здоровых лиц, более чем на 2σ . Определение количества ЦП прово-

дили иммуноферментным методом по И.С. Кузьминой и соавт. (1991) [8] с использованием коммерческого иммуноферментного диагностикума «Тест-систем иммуноферментных для определения церулоплазмينا ИФА-ЦП» производства НИИ вакцин сывороток им. И.И. Мечникова РАМН (Москва, Россия)

Обработка данных проводилась с применением программного пакета Statistica 6.0 for Windows. Выборочные характеристики выражались как среднее значение (M) и стандартное отклонение (σ). Связь между количественными признаками определяли методом корреляционного анализа (учитывали коэффициент корреляции r достоверность корреляции p). Статистически значимыми считали показатели при уровне $p < 0,05$.

Результаты

По данным иммуноферментного метода, средняя концентрация АТ к ЦП в донорских сыворотках составила $0,020 \pm 0,006$ е.о.п. Уровень нормальных показателей антител к ЦП, определяемый как $M \pm 2\sigma$, находился в интервале от 0 до $0,086$ е.о.п. Среднее значение оксидазной активности и количества ЦП у здоровых лиц составило $716 \pm 26,3$ и 921 ± 32 нг/мл соответственно. В процессе исследования в группе больных ССД в целом отмечено достоверное снижение ферментативной активности ЦП и увеличение содержания АТ к ЦП по сравнению с донорами ($p < 0,001$), общее количество фермента, определяемого иммуноферментным методом, практически не изменялось ($p > 0,05$). Количество АТ к ЦП достоверно зависело от активности патологического процесса ($p < 0,05$). У больных с I степенью активности ССД выявлен повышенный уровень АТ к ЦП, который достоверно отличался от значений у здоровых лиц ($t_{at} = 2,95$; $p < 0,01$). Показатели оксидазной активности были достоверно снижены по сравнению с донорами ($t_{акт} = 1,99$; $p < 0,05$), а общее количество ЦП увеличилось незначительно ($t_{кол} = 1,6$; $p > 0,1$) (табл. 1.)

У больных ССД со II степенью активности происходило дальнейшее увеличение содержания исследуемых антител ($t_{ат} = 4,12$; $p < 0,001$) и значительное падение ферментативной активности ЦП ($t_{акт} = 2,09$; $p < 0,05$). Это, очевидно, происходит вследствие того, что у здоровых людей неактивный ЦП в основном представлен фракцией белка, не обладающего оксидазной активностью, а у больных ССД одной из причин угнетения активности энзима может являться блокировка части активного центра оксидазной активности имеющегося в организме ЦП антителами к нему. Общее количество фермента воз-

росло по сравнению с активностью I степени незначительно ($t_{\text{кол}} = 1,79$; $p > 0,05$), но различия с донорами стали достоверными.

Все больные получали комплексную терапию, включавшую глюкокортикостероидные препараты, НПВП, иммуносупрессивные препараты (цитостатики), экстракорпоральные методы лечения, симптоматические гипотензивные и обезболивающие препараты, средства, улучшающие микроциркуляцию. У 98,4% больных требовалось назначение глюкокортикостероидных препаратов. Медиана дозы в пересчете на преднизолон составила 20 мг/сут. Средняя продолжительность госпитализации – 21 день.

Повторное обследование пациентов проводили перед выпиской из стационара.

В процессе лечения наблюдалось клиническое улучшение состояния больных. Однако перед выпиской из стационара, в группе больных ССД с I степенью активности заболевания не происходило достоверного изменения активности, количества ЦП и уровня АТ к нему по сравнению с исходными данными (активность ЦП $708 \pm 28,2$, количество ЦП – $896 \pm 49,7$, АТ к ЦП – $0,047 \pm 0,007$) ($t_{\text{акт}} = 1,63$; $p > 0,1$; $t_{\text{кол}} = 1,66$; $p > 0,05$; $t_{\text{ат}} = 0,35$; $p > 0,1$). Концентрация АТ к ЦП при выписке значительно превосходила показатели здоровых лиц ($t_{\text{ат}} = 2,95$; $p < 0,01$). По окончании курса лечения у больных ССД со II степенью активности процесса отмечена заметная положительная динамика изучаемых показателей: снижение АТ к ЦП $0,089 \pm 0,015$ ($t_{\text{ат}} = 3,06$; $p < 0,01$) и увеличение ферментативной активности ЦП – $688 \pm 27,9$ ($t_{\text{акт}} = 3,2$; $p < 0,002$). Общее количество ЦП после

проведенного лечения практически не изменялось $896 \pm 49,7$ ($t_{\text{кол}} = 0,31$; $p > 0,1$).

Одним из основных факторов, определяющих прогноз ССД, является характер течения склеродермического процесса. Исследование ЦП и антител к нему у больных с различным характером течения ССД позволило выявить достоверные различия у больных с хроническим и подострым вариантами течения заболевания в уровне антител и суммарном содержании ЦП. Статистически значимых различий при определении ферментативной активности ЦП у больных с различным течением ССД выявлено не было, хотя уровень ее был значительно снижен и в том и в другом случае и достоверно отличался от показаний доноров (табл. 2).

У больных ССД с хроническим течением, по сравнению со здоровыми лицами, отмечены достоверное повышение общего количества ЦП и уровня АТ к нему ($t_{\text{кол}} = 2,05$; $p < 0,05$; $t_{\text{ат}} = 4,26$; $p < 0,001$), более низкая ферментативная активность ЦП ($t_{\text{акт}} = 3,37$; $p < 0,001$) (табл. 2). При подостром течении ССД уровень АТ ЦП и общее количество ЦП значительно превосходили показатели доноров ($t_{\text{ат}} = 7,45$, $t_{\text{кол}} = 4,66$; $p < 0,001$) и больных с хроническим течением ССД ($t_{\text{ат}} = 4,93$; $p < 0,001$; $t_{\text{кол}} = 2,41$; $p < 0,02$). Ферментативная активность ЦП при подостром варианте течения ССД была значительно снижена по сравнению со здоровыми лицами ($t_{\text{акт}} = 4,66$, $p < 0,001$) и недостоверно отличалась от показателей лиц с хроническим вариантом течения ССД ($t_{\text{акт}} = 1,91$; $p > 0,05$). При исследовании динамики изменения количества антител к ЦП на фоне

ТАБЛИЦА 1. ОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ, КОЛИЧЕСТВО ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА И УРОВЕНЬ АНТИТЕЛ К НЕМУ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ АКТИВНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПРИ ПЕРВИЧНОМ ОБСЛЕДОВАНИИ ($M \pm m$)

TABLE 1. OXIDASE ACTIVITY, AMOUNT OF CERULOPLASMIN AND ANTIBODIES TO IT IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLERODERMA OF VARYING ACTIVITY, AT INITIAL EXAMINATION ($M \pm m$)

Контингент обследуемых Examined individuals	N	Антитела к ЦП (е.о.п.) Ceruloplasmin antibodies (absorbance units)	Оксидазная активность ЦП (нг/мл) Oxidase activity of ceruloplasmin (ng/ml)	Количество ЦП (мг/мл) Ceruloplasmin amount (mg/ml)
Здоровые Healthy individuals	30	$0,020 \pm 0,006$	$716 \pm 26,3$	$921 \pm 32,0$
Больные с I степенью активности Patients with I degree activity of disease	25	$0,051 \pm 0,009$	$645 \pm 22,8$	$1018 \pm 54,3$
Больные со II степенью активности Patients with II degree activity of disease	43	$0,168 \pm 0,021^*$	$572 \pm 23,1$	$1195 \pm 68,2$

Примечание. * – $p < 0,001$ (по сравнению с донорами).

Note. *, $p < 0.001$ (compared with donors).

ТАБЛИЦА 2. ОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ, КОЛИЧЕСТВО ЦП И УРОВЕНЬ АНТИТЕЛ К НЕМУ У БОЛЬНЫХ ССД С РАЗЛИЧНЫМ ХАРАКТЕРОМ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ (M±m)

TABLE 2. OXIDASE ACTIVITY, AMOUNT OF CERULOPLASMIN AND ANTIBODIES TO IT IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLERODERMA WITH DIFFERENT NATURE OF THE COURSE OF DISEASE (M±m)

Контингент обследуемых Examined individuals	N	Активность ЦП (нг/мл) Ceruloplasmin activity (ng/ml)	Количество ЦП (мг/мл) Ceruloplasmin amount (mg/ml)	АТ к ЦП (е.о.п.) Ceruloplasmin antibodies (absorbance units)
Здоровые Healthy individuals	30	716±26,3	921±32,0	0,020±0,006
Больные с хроническим течением Patients with chronic condition	41	602±21,6	1085±64,3	0,079±0,011
Больные с подострым течением Patients with subacute condition	27	542±20,5	1342±88,4*	0,196±0,024**

Примечание. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$ (по сравнению с донорами).

Note. *, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$ (compared with donors).

проводимой терапии обнаружено достоверное снижение их уровня перед выпиской при подостром течении процесса, не достигшее значений здоровых лиц (АТ к ЦП – $0,103 \pm 0,017$; $p < 0,05$) и лишь тенденция к уменьшению этого показателя у больных с хронической вариант течением ССД (АТ к ЦП – $0,056 \pm 0,008$; $p > 0,05$).

На иммунологические и ферментативные показатели оказывают влияние и клинические варианты заболевания. В ходе исследования выявлена достоверная зависимость между количеством АТ к ЦП, содержанием ферментативно-активного и иммунореактивного ЦП и стадией заболевания. Начальная стадия (I) характеризовалась достоверным увеличением содержания АТ к ЦП и незначительным ростом активности и количества фермента по сравнению с донорами (АТ к ЦП при ССД – $0,063 \pm 0,012$; АТ к ЦП у здоровых лиц – $0,020 \pm 0,006$). Более высокие значения изучаемых показателей (АТ к ЦП при ССД – $0,165 \pm 0,023$; у здоровых лиц – $0,020 \pm 0,006$) у больных со II стадией ССД, очевидно, это связано с большей выраженностью иммунновоспалительных реакций.

Так как при системной склеродермии имеет место множественное поражение внутренних органов, нам представилась возможность провести иммунологическое исследование данных показателей (табл. 3). Анализ корреляционных связей исследуемых показателей не позволил выявить устойчивых сильных связей с теми или иными клиническими проявлениями ССД, кроме больных с признаками поражения печени. У больных ССД с клинико-лабораторными проявлениями гепато-биллиарной патологии антитела к ЦП вы-

являлись в 92% случаев. Уровень АТ к ЦП у этих пациентов были значительно выше, чем у остальных больных. Очевидно, это связано с процессом поражения и разрушения гепатоцитов с последующим выходом ЦП в кровеносное русло и активного антителообразования к данному ферменту. Выявлено также значительное увеличение содержания антител к ЦП у больных с поражением легких и сердца. В основе поражения сердца при ССД лежат характерные для заболевания процессы фиброобразования и нарушения циркуляции в связи с поражением мелких сосудов и внутрисосудистой патологией. Сосудистый компонент легочной патологии при ССД наряду с интерстициальным фиброзом также часто выступает на первый план у больных с поражением легких, очевидно, это связано в основном с поражением кровеносных сосудов.

Механизмы связанные с образованием АТ к ЦП и сосудистой патологией не совсем ясны, но, однако, основываясь на анализе литературных данных, можно предположить, что ЦП является ингибитором миелопероксидазы-фермента, содержащегося в азурофильных гранулах нейтрофилов, активация которого и приводит к стимуляции ПОЛ и повышенной продукции этими клетками кислородных радикалов, а это и ведет к непосредственному повреждению сосудистой стенки. Еще одним фактором, приводящим к развитию сосудистой патологии при наличии АТ к ЦП, может являться накопление АФК, оказывающих повреждающее действие на липиды, белки и другие компоненты сосудистой стенки, в результате чего они приобретают свойства ауто-

ТАБЛИЦА 3. ОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ, КОЛИЧЕСТВО ЦП, УРОВЕНЬ АНТИТЕЛ К НЕМУ У БОЛЬНЫХ ССД В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ (M±m)

TABLE 3. OXIDASE ACTIVITY, CERULOPLASMIN AMOUNT, ANTIBODIES TO IT IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLERODERMA ACCORDING TO VISCERAL INVOLVEMENT (M±m)

Преимущественное поражение Predominant involvement	N	Активность ЦП (биохим. тест) Ceruloplasmin activity (biochemistry test)	Количество ЦП (ИФА) Ceruloplasmin amount (enzyme immunoassay)	АТ к ЦП (ИФА с МС) Ceruloplasmin antibodies (enzyme immunoassay with magnetic sorbents)
Здоровые Healthy individuals	30	716±263	921±32,0	0,020±0,006
Кожи Skin	14	682±34,6*	1143±768***	0,122±0,024****
Сердца Heart	10	483±28,2****	1098±79,3***	0,169±0,028****
Легких Lungs	12	451±37,1****	1253±89,5****	0,188±0,026****
Печени Liver	25	739±25,4*	1118±56,5***	0,185±0,026****

Примечание.* – $p > 0,1$; *** – $p < 0,05$; **** – $p < 0,001$ (по сравнению с донорами).

Note. *, $p > 0.1$; ***, $p < 0.05$; ****, $p < 0.001$ (compared with donors).

ТАБЛИЦА 4. ОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ, КОЛИЧЕСТВО ЦП И УРОВЕНЬ АНТИТЕЛ К ЦП У БОЛЬНЫХ ССД С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ГЕМОГЛОБИНА (M±m)

TABLE 4. OXIDASE ACTIVITY, AMOUNT OF CERULOPLASMIN AND ANTIBODIES TO IT IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLERODERMA WITH VARYING HEMOGLOBIN CONTENT (M±m)

Группа обследуемых Examined individuals	N	Активность ЦП (биохим. тест) Ceruloplasmin activity (biochemistry test)	Количество ЦП (ИФА) Ceruloplasmin amount (enzyme immunoassay)	Антитела к ЦП (ИФА с МС) Ceruloplasmin antibodies (enzyme immunoassay with magnetic sorbents)
Здоровые Healthy individuals	30	716±26,3	921±32,0	0,020±0,006
I (больные без анемии) I (patients without anemia)	50	630 ± 26,9*	1126±52,8**	0,106±0,011***
II (больные с Hb < 115 г/л) II (patients with Hb < 115 g/l)	10	552±42,8***	1259±81,9***	0,162±0,026***
III (больные с Hb < 90 г/л) III (patients with Hb < 90 g/l)	8	426±37,2***	1298±93,5***	0,177±0,032***

Примечание.* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (по сравнению с донорами).

Note. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (compared with donors).

антигенов и стимулируют выработку АТ, имеющих вторичное повреждающее действие.

Особый интерес представляет анализ содержания АТ к ЦП у больных ССД с явлениями анемии, при которой развивается гипоксия тканей. Была выявлена обратная корреляционная связь между уровнем АТ к ЦП и количеством эритроцитов в крови ($r = 0,34$; $p < 0,05$), содержанием гемоглобина ($r = 0,45$; $p < 0,02$). Наличие анемии у находившихся под нашим наблюдением боль-

ных констатировали, руководствуясь данными ВОЗ. Все больные были разделены в зависимости от уровня гемоглобина и количества эритроцитов на три группы: I – без анемии (50 человек); II – с анемией Hb < 115 г/л (10 человек); III – с выраженной анемией, Hb < 90 г/л (8 человек). В таблице 4 представлены данные о содержании изучаемых антител, активности и количества ЦП у больных ССД с различной выраженностью анемии и без нее.

Из таблицы 4 видно, что ферментативная активность ЦП у больных с ярковыраженными явлениями анемии ($Hb < 90$ г/л) самая низкая ($p < 0,05$). Уровень антител к ЦП у больных с признаками анемии выше, чем у больных без анемии и у доноров ($p < 0,01$).

По данным литературы, основной причиной анемии при ССД являются непосредственная кровопотеря, нарушения всасывания или недостаточного высвобождения железа из клеток ретикулоэндотелиальной системы, а также иммунные нарушения. Очевидно, у больных ССД чаще всего, по нашему мнению, увеличенная потеря крови при изъязвлении пищевода и при телеангиэктазиях обуславливает развитие истинной железодефицитной анемии, а другие случаи гипохромии вызваны не уменьшением общего количества железа в организме, а его задержкой в макрофагальной системе, либо снижением катализа окисления Fe_2 , Fe_3 вследствие блокировки АТ фероксидазной активности ЦП с последующим нарушением присоединения железа к трансферрину.

Таким образом, при генерализации склеродермического процесса отмечается не только снижение в крови оксидазной активности ЦП, но и нарастание уровня антител к нему, причем у больных с поражением легких и печени определяются наивысшие значения этого показателя. Выраженность анемии при ССД коррелирует с уровнем антител к ЦП, активностью изучаемого фермента и отражает, по-видимому, тяжесть заболевания.

Заключение

При системной склеродермии отмечается снижение ферментативной активности ЦП, повышение количества его и уровня антител к нему, что может быть использовано как дополнительный критерий диагностики активности ССД и отражает заинтересованность антиоксидантной системы при иммунологических заболеваниях. Изучение антителообразования к ЦП, а также его активности и количества расширяет имеющиеся представления о патогенезе ревматических заболеваний и намечает пути для дальнейших научных изысканий.

Список литературы / References

1. Александров А.В., Шилова Л.Н., Емельянов Н.Н., Алехина И.Ю., Новикова О.В., Макарова Т.С., Емельянов Н.И., Курбанова Р.Д., Парамонова О.В., Емельянова О.И. Иммунологические аспекты современной лабораторной диагностики системной красной волчанки, системной склеродермии и ювенильного ревматоидного артрита // *International Journal on Immunorehabilitation* (Международный журнал по иммунореабилитации), 2010. Т. 12, № 12. С. 150. [Aleksandrov A.V., Shilova L.N., Emelyanov N.N., Alehina I.Yu., Novikova O.V., Makarova T.S., Emelyanov N.I., Kurbanova R.D., Paramonova O.V., Emelyanova O.I. Immunopathogenetic aspects of modern laboratory diagnostics of systemic lupus erythematosus, systemic scleroderma and juvenile rheumatoid arthritis. *Mezhdunarodnyy Zhurnal po immunoreabilitatsii = International Journal on Immunorehabilitation*, 2010, Vol. 12, no. 12, p. 150 a. (In Russ.)]
2. Гонтарь И.П., Сычева Г.Ф., Александров А.В., Шилова Л.Н., Симакова Е.С., Емельянов Н.Н., Матасова Н.Н., Маслакова Л.А., Зборовский А.Б. Эмульсионная полимеризация как метод, модифицирующий ферменты с сохранением биологических свойств их наноструктур // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2010. Т. 150, № 12. С. 715-719. [Gontar I.P., Sycheva G.F., Aleksandrov A.V., Shilova L.N., Simakova E.S., Emelyanov N.N., Matasova N.A., Maslakova L.A., Zborovskiy A.B. Emulsion polymerization as a method to modify enzymes preserving the biological properties of their nano-structures. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2010, Vol. 150, no. 12, pp. 715-719. (In Russ.)]
3. Гусева Н.Г. Системная склеродермия: ранняя диагностика и прогноз // *Научно-практическая ревматология*, 2007. № 1. С. 39-45. [Guseva N.G. Systemic scleroderma: early diagnostics and prognosis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2007, no. 1, pp. 39-45. (In Russ.)]
4. Зборовская И.А. Ревматические болезни и антиоксидантная система. М.: Медицина, 2005. 128 с. [Zborovskaya I.A. Rheumatic disease and antioxidant system]. Moscow: Medicine, 2005. 128 p.
5. Зборовский А.Б., Гонтарь И.П., Александров А.В., Алехина И.Ю., Трофименко А.С. Возможности использования иммобилизованных наносистем в ревматологии // *Доктор Ру*, 2009. Т. 47, № 3. С. 53-57. [Zborovskiy A.B., Gontar I.P., Aleksandrov A.V., Alehina I.Yu., Trofimenko A.S. Possibilities of immobilized nano-systems in rheumatology. *Doktor Ru*, 2009, no. 3, pp. 53-57. (In Russ.)]
6. Кузьмина Н.С., Османов С.К., Назаренко А.А., Лымарь С.С., Волошук А.М., Яковлева С.А. Коммерческий иммуноферментный диагностический набор для определения церулоплазмينا // *Лабораторное дело*, 1991. № 4. С. 21-23. [Kuzmina N.S., Osmanov S.K., Nazarenko A.A., Lyman S.S., Voloshuk A.M., Yakovleva S.A. Commercial immunoenzyme diagnostic agent for ceruloplasmin determination. *Laboratornoe delo = Laboratory Case*, 1991, no. 4, pp. 21-23. (In Russ.)]
7. Шилова Л.Н., Гонтарь И.П., Зборовская И.А., Новикова О.В., Емельянов Н.Н. Клинико-патогенетическое значение наличия антител к ферментам антиоксидантной системы при синдроме Рейно // *Клиническая медицина*, 2010. Т. 88, № 2. С. 43-46. [Shilova L.N., Gontar I.P., Zborovskaya I.A., Novikova O.V.,

Emelyanov N.N. Clinical and pathogenetic significance of antibodies to enzymes of antioxidant system in Reynaud's syndrome. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine (Russian Journal)*, 2010, Vol. 88, no. 2, pp. 43-46. (In Russ.)]

8. Шилова Л.Н., Гонтарь И.П., Зборовская И.А., Новикова О.В., Емельянов Н.Н. Взаимосвязь между антителами к ферментам антиоксидантной системы и поражением сердца у больных системной склеродермией // Кардиология, 2010. Т. 50, № 12. С. 64-67. [Shilova L.N., Gontar I.P., Zborovskaya I.A., Novikova O.V., Emelyanov N.N. Interrelation between antibodies to enzymes of antioxidant system and involvement of the heart in patients with systemic scleroderma. *Kardiologiya = Cardiology*, 2010, Vol. 50, no. 12, pp. 64-67. (In Russ.)]

9. ACR Ad Hoc Committee on neuropsychiatric lupus nomenclature. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum.*, 1999, Vol. 4, pp. 599-608.

10. Sitar M.E., Aydin S., Cakatay U. Human serum albumin and its relation with oxidative stress. *Clin. Lab.*, 2013, Vol. 59, no. 9-10, pp. 945-952.

Авторы:

Емельянова О.И. — к.м.н., ведущий научный сотрудник
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Гонтарь И.П. — д.м.н., профессор, заведующий
лабораторией клинической иммунологии ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Русанова О.А. — к.м.н., младший научный сотрудник
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Зборовская И.А. — д.м.н., профессор, директор
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Authors:

Emelyanova O.I., PhD (Medicine), Leading Research
Associate, A. Zborovsky Research Institute for Clinical and
Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Gontar I.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head,
Laboratory of Clinical Immunology, A. Zborovsky Research
Institute for Clinical and Experimental Rheumatology,
Volgograd, Russian Federation

Rusanova O.A., PhD (Medicine), Junior Research Associate,
A. Zborovsky Research Institute for Clinical and Experimental
Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Zborovskaya I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Director,
A. Zborovsky Research Institute for Clinical and Experimental
Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Поступила 19.06.2018

Отправлена на доработку 22.06.2018

Принята к печати 19.09.2018

Received 19.06.2018

Revision received 22.06.2018

Accepted 19.09.2018

X ВСЕРОССИЙСКАЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ» 3 – 9 ФЕВРАЛЯ 2019 г.



X Всероссийская с международным участием школа-конференция по клинической иммунологии «Иммунология для врачей» прошла 3 – 9 февраля 2019 года в заповеднике «Пушкинские Горы» Псковской области и была посвящена проблемам инфекционной иммунологии.

Школа проходила под эгидой Российской академии наук, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Министерства здравоохранения Российской Федерации и Правительства Санкт-Петербурга в лице Комитета по здравоохранению и Комитета по науке и высшей школе при поддержке Администрации Псковской области. Основными организаторами Школы выступили: ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России; Институт экспериментальной медицины; Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова; Российское научное общество иммунологов; Российская Ассоциация Аллергологов и Клинических Иммунологов; Российское цитокиновое общество; Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов; Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины»; Санкт-Петербургское региональное отделение Всероссийской общественной организации – Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов. Председатели оргкомитета: академики РАН Черешнев Валерий Александрович (Екатеринбург) и Тотолян Арег Артемович (директор ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург); заместители председателя: академик РАН Хайтов Рахим Мусаевич (Москва) и академик РАН Козлов Владимир Александрович (Новосибирск); координаторы научной программы: член-корреспондент РАН Фрейдлин Ирина Соломоновна (Санкт-Петербург) и профессор Козлов Иван Генрихович (Москва).

На церемонии торжественного открытия было отмечено, что X юбилейная Школа традиционно проводится под эгидой Российской академии наук, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Министерства здравоохранения РФ при поддержке профессиональных организаций: Российского научного общества иммунологов и Российской Ас-

социации Аллергологов и Клинических Иммунологов. После приветствий председателя Комитета по здравоохранению администрации Псковской области Потапова Игоря Ивановича и администрации Пушкиногорского района академик РАН Недоспасов Сергей Артурович выступил с лекцией, посвященной лауреатам-иммунологам Нобелевской премии 2018 г. Далее академик РАН Черешнев Валерий Александрович (Екатеринбург) выступил с лекцией «Пастер и Мечников: становление иммунологии».

В рамках первого дня после торжественного открытия прозвучали доклады академика РАН Тотоляна Арега Артемовича (Санкт-Петербург) «Система хемокинов в иммунопатогенезе инфекционных заболеваний»; академика РАН Караулова Александра Викторовича (Москва) «Мукозальный иммунитет и иммунокоррекция»; профессора Гариба Фируза Юсуфовича (Москва) «К механизмам регуляции Т-супрессоров патогенами»; профессора Ганковской Людмилы Викторовны (Москва) «Молекулярные механизмы врожденного иммунитета при вирусной инфекции»; профессора Замориной Светланы Анатольевны (Пермь) «Toll-подобные рецепторы в распознавании молекулярных структур инфекционных патогенных агентов»; профессора Киселевой Екатерины Прохоровны (Санкт-Петербург) «Особенности иммунологической защиты от грибов»; профессора Суслова Анатолия Петровича (Москва) «Бета-глюканы: структура, синтез, иммунопотенцирующие свойства и механизмы действия»; профессора Нестеровой Ирины Вадимовны (Москва) «Многоликость нейтрофильных гранулоцитов в противоинфекционной защите»; к.м.н. Демидова Олега Николаевича (Дижон, Франция) «Нетоз в инфекционной патологии».

В последующие дни на юбилейной Школе обсуждались фундаментальные вопросы инфекционной: основные заболевания современного человека (академик РАН Козлов В.А.); изучении инфекционной патологии у детей (академик РАН Лобзин Ю.В.); микробные технологии (член-корреспондент РАН Суворов А.Н.); формирование инфламмасом (профессор Гариб Ф.Ю.); цитокины в иммунопатогенезе (член-корреспондент РАН Симбирцев А.С., профессор Калинина Н.М.).

Особенностям диагностики и терапии иммунитета кожи были посвящены доклады: член-корреспондент РАН Иванова А.М. и профессоров: Топтыгиной А.П., Калюжина О.В., Пампура А.Н., Егоровой М.О., Продеуса А.П.

Сложная и многогранная проблема иммунотерапии при иммунодефицитных состояниях была детально обсуждена в лекциях профессора Козлова Ивана Генриховича (Москва); к.м.н. Кузнецовой Раисы Николаевны (Санкт-Петербург); к.м.н. Корсунского Ильи Анатольевича (Москва); профессора Латышевой Татьяны Васильевны (Москва); профессора Продеуса Андрея Петровича (Москва); Гусевой Марины Николаевны (Санкт-Петербург).

На симпозиуме «Интерфероны — одно из выдающихся открытий медицины XX века», посвященном 60-летию открытия интерферонов, освещались вопросы: дифференцированные подходы к таргетной терапии (Нестерова И.В.); механизмы интерферопатии (Исаков В.А.); возможности использования интерферонов при вирусных инфекциях (Исаков Д.В.); интерфероновые ответы при ОРВИ (Калюжин О.В.).

«Актуальные вопросы диагностики и лечения НАО» были освещены на симпозиуме компании Shire докладчиками Козловой Я.И., Кузнецовой Р.Н., Гусевой М.Н., Пампура А.Н.

Симпозиум компаний MERCK и LUMINEX рассмотрел «Современные методы исследования иммунопатологических состояний».

Вопросы диагностики, лечения, профилактики ПИД НАО были рассмотрены на симпозиуме компании CSL BEHRING «Современные аспекты диагностики, терапии и организации лечебной помощи пациентам с ПИД и НАО».

Мастер-класс «Иммунологическая трактовка показателей гематологических анализаторов» (проводимый профессором Семикиной Е.Л.) и мастер-класс «Часто длительно болеющие пациенты. Как изменить ситуацию?» (проводимый профессором Федосковой Татьяной Германовной) были очень востребованы аудиторией Школы.

Лабораторным технологиям, которые также применяются для мониторинга и оценки течения инфекционных процессов, были посвящены симпозиум и мастер-классы компании «Бекман Культер».

Необходимо отметить, что все лекции сопровождались очень активной дискуссией. Эти дискуссии не обошлись без острых столкновений мнений участников.

Школа вполне оправдала название Всероссийской с международным участием, т. к. в ее работе приняли участие 186 представителей из Астаны (Казахстан), Могилева (Беларусь), Еревана (Армения), Дижона (Франция), Тель-Авива (Израиль), Риги (Латвия) а также из 27 регионов Российской Федерации: Алтайский край, г. Белокуриха, Астрахань, Абакан, Великий Новгород, Волгоград, Екатеринбург, Ижевск, Калуга, Краснодар, Красноярск, Москва, Московская область, г. Пушкино, Мурманск, Набережные Челны, Нижний Новгород, Новосибирск, Омск, Пермский край, г. Кунгур, Пермь, Саранск, Республика Тыва, г. Кызыл, Санкт-Петербург, Саратов, Сочи, Сыктывкар, Томск, Челябинск.

Многие участники отмечали теплую, дружескую атмосферу Школы, на которой интересная лекционная программа сочеталась с полезной культурной программой, включившей вечернюю экскур-

сию в Михайловское, дневные экскурсии в Тригорское, Петровское, Дом Сергея Довлатова в Березино. Доброжелательная и неформальная обстановка, царившая на Школе, и та добрая ирония, которая звучала в публикуемом нами девятом томе «Конспектов лекций», составленном лекторами Школы — профессором Семикиной Еленой Леонидовной и д.м.н. Топтыгиной Анной Павловной — свидетельствуют о необходимости проведения данной Школы. На церемонии закрытия Школы прозвучало много слов благодарности, а также и обоснованные пожелания в адрес Оргкомитета, которые будут учтены при подготовке очередной Школы.

Оргкомитет считает своим приятным долгом от имени всех участников Школы выразить особую благодарность Администрации Псковской области и Пушкиногорского района, Генеральному спонсору — «Бекман Культер», Главному спонсору — компании «ПетроваксФарм», а также всем официальным спонсорам, финансовая поддержка которых сделала возможной организацию и проведение Школы.

Конспекты лекций, составленные слушателями
X Всероссийской школы по клинической иммунологии
«Иммунология для врачей»
03 – 09 февраля 2019 г.
Семикиной Е.Л. и Топтыгиной А.П.

У Святогорья лес зеленый,
И база отдыха в лесу.
Туда для всех десант ученых
Крупницы знания несут.

И как обычно, песнь заводят
Про TOLLы, PAMPы и Treg,
Пути, как хемокины, бродят...
Им все равно, хоть дождь, хоть снег.

В темнице там В-клетка тужит,
Т-хелпер ей усердно служит.
Т-клетка там упрямо в бой
Идет-бредет сама собой.

Там нейтрофилы мимоходом
Пленяют в НЕТ стафилококк...
В проточник клетки хороводом
Влетают, преградив поток.

Там все микробиотой полно,
Там цитокиновые волны
Инфекций изменяют ход...
Там модуляторы и МАБы,
И глобулины там не слабы,
И вакцинация цветет...

И я там был, чай-кофе пил,
И в зале видел всех ученых,
Конспекты вел я увлеченно,
Чтоб ничего я не забыл.

Параграф первый МЕТОДОЛОГИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ:

Недоспасов С.А. *начинает*: «Для меня большая честь открыть школу, я сам напросился, не скрою...»

Суворов А.Н. *добавляет*: «Вопрос: кто главный — он в определенной степени риторический, но он очень важен».

Свитич О.А. *поддерживает*: «Вот вопрос: кто главней и кто первой».

Недоспасов С.А. *уверен*: «Само по себе распознавание отсутствия есть глубоко нетривиальный момент».

Свитич О.А.: «Хотелось сказать несколько слов чисто философских».

Недоспасов С.А. *поддерживает*: «Никогда нет причин не напомнить».

Суворов А.Н. *благодарит*: «Я бы хотел поклониться организаторам этой конференции».

Заморина С.А. *согласна*: «Ничего лучшего за 10 лет найти не удалось, потому что это очень логично».

Недоспасов С.А. *предлагает*: «Я расскажу врачам, чем занимаются ученые, чтобы понять, интересно ли это врачам».

Гариб Ф.Ю. *поддерживает*: «Поскольку много ученых стали изучать иммунологию, нужно понять, как это все называть».

Недоспасов С.А. *предостерегает*: «Хочу призвать вас не пользоваться идиотской номенклатурой».

Раев М.Б. *утешает*: «Это совсем не для того, чтобы задушить вас обилием своих знаний».

Козлов В.А. *заявляет*: «У нас есть свои тараканы НОУ-ХАУ».

Недоспасов С.А. *одобряет этот* «дополнительный взвизг технологий».

Продеус А.П. *восхищается*: «Они написали сюда почти всю таблицу Менделеева этих штук».

Тотолян А.А. *призывает*: «И теперь дело за малым — тиражировать на всю страну»

Козлов В.А. *сомневается*: «Я не знаю, кто бы в стране мерил эти дела».

Недоспасов С.А. *волнуется*: «Вопрос в том: то, что мы делаем, имеет отношение к жизни?»

Тотолян А.А. *резюмирует*: «Дальше мы немного притормозились и стали анализировать ситуацию».

Караулов А.В. *предостерегает*: «Центральный иммунитет изучать не стоит, эти работы носят спекулятивный характер».

Семикина Е.Л. *одобряет*: «Идея замечательная, элегантная и чрезвычайно информативная».

Продеус А.П. *восклицает*: «Я больше к теоретикам и лабораторщикам обращаюсь...»

Тотолян А.А. *соглашается*: «Все зависит от целевой аудитории».

Раев М.Б. *призывает*: «Надо достаточно гуманно относиться к здоровью слушателей».

Гариб Ф.Ю. *согласен*: «Мы все дружно поддержим это предложение, если нас спросят, конечно».

Суворов А.Н. *сомневается*: «Тут у меня больше у самого вопросов, чем ответов».

Продеус А.П. *колеблется*: «Я сегодня не то чтобы хочу дать много ответов».

Раев М.Б. *сообщает*: «И вот на этом сайте я что-то нашел, но удовольствия не получил».

Недоспасов С.А. *сокрушается*: «Есть много статей, их не удастся скачать, но на них все время ссылаются».

Козлов И.Г. *поясняет*: «Была сделана одна работа, на которую не обратили внимания, потому что сделали ее биохимики».

Недоспасов С.А. *радуется*: «Вот кусочек сегодня с утра я выдрал из этой статьи».

Харит С.М. *предупреждает*: «Это полужелтая пресса».

Продеус А.П. *обнадеживает*: «Люди в одном обзоре, я не помню в каком, но у меня есть ссылка».

Суворов А.Н. *вмешивается*: «Не затрудняя столь выдающуюся аудиторию терминами, все же скажу...»

Козлов И.Г. *формулирует*: «Классификация — вещь коварная, если она создана для ученых, значит будет бардак во врачебной среде».

Заморина С.А. *поддерживает*: «Если в квартире какой-то бардак или динамический беспорядок, они тоже начинают работать».

Козлов И.Г. *наблюдает*: «Вот как иммунологи рисуют свои схемы, а потом сами в них запутываются».

Недоспасов С.А. *сообщает*: «В Москве развелось неслыханное количество редакторов, т. к. ожидается деление больших денег».

Свитич О.А. *интересуется*: «В чем же здесь может быть проблема наоборот?»

Продеус А.П. *поясняет*: «Когда я читаю педиатрам, я стараюсь эти картинки вообще не показывать, но здесь можно, потому что здесь эти картинки уже кто-то видел».

Недоспасов С.А. *уточняет*: «Еще один момент (при полном к нему уважении) — он очень плохой лектор».

Свитич О.А. *размышляет*: «Двоякость этой роли здесь используется в полной мере».

Зверев В.В. *скромничает*: «Вы уж простите, что я вам такие слайды показываю».

Недоспасов С.А. *объявляет*: «У меня есть своя группа картинок неизвестного художника».

Продеус А.П. *восхищается*: «Красивые картинки, безумно непонятные, но красивые».

Недоспасов С.А. *оправдывается*: «Если бы картинок не было — вообще ничего невозможно было бы понять, но картинки тоже очень плохие».

Зверев В.В. *продолжает*: «Мы все показываем эти картинки, а я не буду, я просто пролистну».

Тотолян А.А. *поясняет*: «Этот слайд специально для Сергея Артуровича — Вы начали с Арарата, а я заканчиваю Араратом».

Продеус А.П. *утешает*: «А теперь более сложный слайд, но следующий будет более простой».

Нестерова И.В. *сокрушается*: «У нас есть хороший слайд, но он всегда теряется».

Демидов О.Н. *поддерживает*: «И вот слайд съедается».

Продеус А.П. *признается*: «Я эти картинки цинично взял и свистнул».

Недоспасов С.А. *надеется*: «Через 25 лет они откроют архивы, и можно будет узнать, кто гадил».

Симбирцев А.С. *соглашается*: «Есть ведь такие личности, это правда».

Недоспасов С.А. *уточняет*: «Он классик и переоткрыватель».

Зверев В.В. *поясняет*: «Я хотел вам показать и рассказать, что не мы одни такие умные».

Симбирцев А.С. *предупреждает*: «Эта схема только на первый взгляд такая сложная, на самом деле все хуже».

Демидов О.Н. *соглашается*: «Схема Монтавани, а Попадопулос ее стащил и опубликовал».

Недоспасов С.А. *поясняет*: «Несмотря на то, что они оба фундаменталисты, они открыли два вида тормозов».

Киселева Е.П. *знает*: «И Бог сказал очень красивую речь и объяснил, кто есть кто».

Семикина Е.Л. *предполагает*, что «ужасно хотелось задвинуть конкурентов».

Козлов В.А. *сообщает*: «В конце лекции — несколько слов во славу иммунологии».

Гариб Ф.Ю. *поддерживает*: «В моем сознании иммунология стала иной, одна — классическая, а другая — фактическая».

Параграф второй ВОЕННО-ПОЛЕВАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Черешнев В.А. *формулирует*: «Вот, что такое воспаление — поле битвы».

Недоспасов С.А. *поясняет*: «Если открыть окно и начать орать — сигнал пройдет неправильно».

Гариб Ф.Ю. *поддерживает*: «Обнаружив, что кто-то не слушается, Трег может стать киллером и превратить клетки в кучу апоптотических тел».

Нестерова И.В. *наблюдает*: «Нейтрофил мирно погибает через апоптоз».

Гариб Ф.Ю. *считает*, что *должна быть* «активация макрофагов до такой степени, чтобы патоген остался жив».

Калюжин О.В. *знает*: это «главный и самый отъявленный патоген».

Суворов А.Н. *предлагает* «использование бактерий в качестве самонаводящихся ракет».

Гариб Ф.Ю. *радуется*: «Таким путем мы все время готовимся к выстрелу против патогенов».

Козлов И.Г. *согласен*: «На фоне этих открытий возникла большая граната, и в этом виноваты кефиры».

Суворов А.Н. *признается*: «Это уже мои криминальные мысли».

Киселева Е.П. *наблюдает*: «Вблизи ворсинок находится демилитаризованная зона».

Козлов И.Г. *знает*: «В нашей стране эта безопасность разделяется на 2 этажа».

Зверев В.В. *поддерживает*: «У нас есть две слабые позиции, по которым нас все время бьют».

Недоспасов С.А. *объясняет*: «Атоиммунитет — это когда курсант приходит и на доске почета видит фоторобот, за которым охотится».

Суслов А.П. *считает*, что «этот часовой должен не спать в одном сапоге, а постоянно быть активным».

Недоспасов С.А. *соглашается*: «Он полностью готов осуществлять эффекторную функцию — у него есть ружье и штык примкнут».

Тотоян А.А. *наблюдает*: «Эта структура напоминает связку гранат. Ну, под танк когда кидали — очень похоже».

Суворов А.Н. *сокрушается*: «За бессмертие надо чем-то платить».

Параграф третий КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Продеус А.П. *постулирует*: «Без критериев мы не имеем права ничего назначить».

Тотоян А.А. *наблюдает*: «Первичные иммунодефициты, извините за каламбур, на первом месте».

Недоспасов С.А. *восклицает*: «Страна просит кандидатов на починку!»

Черешнев В.А. *предлагает*: «Может, поползть по земле?»

Недоспасов С.А. *размышляет*: «Придется ползать миллионы лет».

Продеус А.П. *делится*: «Я за последние лет 10 или 15 не видел ни одного руководства, которое говорит, зачем это надо».

Заморина С.А. *радуется*: «Все так устроено, чтобы человек, который чем-то болеет, мог бы как-то вылечиться».

Продеус А.П. *сомневается*: «Поверх инфекции его невозможно лечить».

Суворов А.Н. *предлагает*: «И будем лечить микробиоту».

Близнецов К.Ю. *подчеркивает*: «При работе с персонифицированной медициной во главе угла стоит стерильность».

Продеус А.П. *интересуется*: «Кто будет развивать эти характеристики так криво, что разовьет септический ответ?»

Федоскова Т.Г. *объясняет*: «Их спасти нельзя, их нужно любяще вовлекать».

Продеус А.П. *не унимается*: «Септический шок подвержен абсолютно статистической зависимости».

Федоскова Т.Г. *согласна*: «Он болеет долго, нудно, глубоко».

Продеус А.П. *наблюдает*: «Когда эту детскую педиатрическую историю выделили».

Зверев В.В. *радуется*: «Этих детей можно поймать и тут же их провакцинировать».

Харит С.М. *предупреждает*: «Если мы откажемся от вакцинации, мы вернемся к естественному отбору и немного проредим человечество».

Продеус А.П. *волнуется*: «Какие лица могут колоться?»

Суворов А.Н. *уточняет*: «Если мы начнем вакцинировать таким компотом».

Федоскова Т.Г. *призывает*: «Болезнь нужно, болезнь важно! Вопрос — сколько?»

Козлов И.Г. *предостерегает*: «Когда мы даем антибиотик, мы делаем дырки в одеяле микробиоты».

Суворов А.Н. *знает*: «Если у лабораторных животных использовать антибиотики, их микробиота сваливается в угол».

Федоскова Т.Г. *видит*: «Заигрываясь в эти игры болезни, он болеет постоянно».

Суворов А.Н. *предлагает*: «Давайте посмотрим на это с точки зрения микробиоты».

Тотоян А.А. *соглашается*: «Напрашивается связь с микробиотой, потому что она у нас разная».

Суворов А.Н. *предупреждает*: «Любой пробиотик является гетерогенным нашему организму».

Козлов И.Г. *уверен*: «У каждого — своя микробиота и ее понимание».

Черешнев В.А. *восклицает*: «Вот что такое — вселенная микробиома».

Суворов А.Н. *знает*: «Бактерии рассматривают 2 выхода из нас. Не буду уточнять, какие, врачи знают».

Семикина Е.Л. *наблюдает*: «Врач напишет или не напишет, но оставит следы».

Суворов А.Н. *сомневается*: «Наивно думать, что вы употребили на букву Б или Л и решили все проблемы пациента».

Латышеву Т. В. *беспокоит*: «Низкая информативность пульмонологов».

Суворов А.Н. *добавляет*: «Дисбиоз — позор отечественной гастроэнтерологии».

Козлов И.Г. *наблюдает, как хирурги* «только что по-живому разрезали иммунную систему».

Черешнев В.А. *удивляется*: «И вся иммунология у него — роботизированный кабинет».

Продеус А.П. *видит последствия*: «Пациент был не сильно адекватен».

Латышева Т.В. *соглашается*: «Это недовыявленные больные, которые существуют».

Продеус А.П. *подчеркивает*: «Маркеры воспаления важны, но я хочу взять крайний вариант».

Караулов А.В. *вступает в дискуссию*: «Я хотел немножко про нос сказать — здесь тоже несколько сот участников».

Федоскова Т.Г. *поддерживает*: «Рождаемся — нос вылезает, и это визитная карточка».
Козлов И.Г. *удивляется*: «Никто из них не подозревал, что называется мукозальным иммунитетом».
Федоскова Т.Г. *видит*: «От клеточки до соплей — это пути и пути...»
Козлов И.Г. *анализирует*: «Он пришел с насморком, а проблема в урогенитальном тракте».
Зверев В. В. *поддерживает*: «Лечим одно — получаем другое, лечим другое — получаем третье».
Топтыгина А.П. *наблюдает*: «Случались кардиоваскулярные ишемические неприятности».
Саядян Х.С. *поясняет*: «Смертность 1% при адекватном лечении, но самого адекватного лечения не существует».
Топтыгина А.П. *предлагает пролить* «три капли бальзама на хемокиновое сердце Арега Артемовича».
Семикина Е.Л. *сокрушается*: «Точного состава никто не рассказывает, потому что это наиболее интересно».
Федоскова Т.Г. *видит, как* «во все дырки быстро что-то суется, потому что срочно надо».
Корсунский И.А. *делится опытом*: «По тендеру идут разные препараты, и даже очень разные препараты».
Федоскова Т.Г. *поддерживает*: «Отсюда мы видим все иммуномодуляторы во всех дырках».
Корсунский И.А. *поясняет*: «Препараты, которые мы должны использовать у наших пациентов, чтобы они были здоровы, а вы были на свободе».
Козлов В.А. *уверен*: «Нет такой среды, чтобы всем было хорошо».

Параграф четвертый МЫШИ, ЛЮДИ И ДРУГИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ

Заморина С.А. *наблюдает*: «Муха, пораженная грибком, не такая красивая».
Недоспасов С.А. *пропагандирует*: «Часть большого зоопарка отредактированных мышей».
Зверев В.В. *уточняет*: «И животные, если вы обратили внимание, на пятые сутки все-таки погибают».
Козлов И.Г. *обнадеживает*: «Мышь помучилась, но выздоровела».
Ганковская Л.В. *понимает*: «Все хотят жить долго, хорошо и быть здоровыми».
Суворов А.Н. *радуется*: «Теперь мы знаем, что с мышами мы правильно делаем».
Зверев В.В. *считает*: «Мыши должны нам памятник поставить, мы их от всего вылечили».
Продеев А.П. *волнуется*: «Это пугает, особенно людей».
Зверев В.В. *поясняет*: «Это смертельная инфекция, поэтому очень удачная модель».
Продеев А.П. *продолжает*: «Я скажу одну вещь, которая поразила самих исследователей».
Козлов В.А. *уточняет*: «В экспериментах есть антиген и есть тело, в которое его можно ввести».
Зверев В.В. *радуется результату*: «Мы к концу года получили более-менее здоровых детей».
Петричук С.В. *соглашается*: «Десять пациентов детей условно здоровых».
Киселева Е.П. *считает, что* «они индифферентные или бесполезные».
Тотоян А.А. *объясняет*: «Эти практически здоровые лица были не только из Петербурга, но и из Гвинеи».
Продеев А.П. *соглашается*: «Нам надо понимать определенный бэкграунд этого человека».
Гариб Ф.Ю. *уверен*: «Их совершенство им тоже не нужно».

Параграф пятый КЛЕТКИ КАК ЛЮДИ

Суворов А.Н. *провозглашает*: «В силу своего антропоцентризма мы считаем, что мы — главные, но бактерии-то так не считают».
Семикина Е.Л. *поясняет*: «Нам было интересно понять, как жизнь устроена».
Суворов А.Н. *рассказывает*: «Наша кишечная трубка подобна космической станции с большим количеством шлюзов, разным газовым составом».
Киселева Е.П. *не согласна*: «Грибы любят свежий воздух и внутрь к нам не очень стремятся».
Суворов А.Н. *настаивает*: «Бактерии нас придумали таким образом, чтобы мы выкачивали лишний кислород... создавали для них условия...»
Гариб Ф.Ю. *восхищается*: «С тех пор микробы стали такими мудрыми, что мне до них далеко».
Суворов А.Н. *поддерживает*: «Они прекрасно строят города на поверхностях».

Киселева Е.П. *сомневается*: «Трудно представить, чтобы организм заботился о патогенах и строил домики, где им жить».

Суворов А.Н. *уточняет*: «Мы являемся средством транспорта — эдакие ходячие термостаты».

Гариб Ф.Ю. *считает, что* «опухолевые клетки тоже разумно поступают».

Семикина Е.Л. *комментирует*: «Не скажу, каким словом это назвать, но такая красота редко в жизни случается».

Калинина Н.М. *радуется*: «Вот наша работа, я ею горжусь, потому что в те времена не проводили таких исследований».

Топтыгина А.П. *вспоминает*: «Ты был привязан к клеточным линиям, как к грудному младенцу. Их надо было растить, кормить».

Суворов А.Н. *предупреждает*: микробы «могут поедать наши антитела и использовать их как собственные завтраки».

Калюжин О.В. *поясняет*: «Чтобы печень наша не удивилась от обилия липопротеидов».

Топтыгина А.П. *наблюдает*: «Сальные железы выделяют им пищу, и им хорошо».

Суворов А.Н. *поддерживает*: «Мы не успели конфетку в рот положить — первые захватчики глюкозы — бактерии».

Калюжин О.В. *подчеркивает*: «Всеядность NOD1 и NOD2-агонистов».

Недоспасов С.А. *предлагает*: «Для гурманов — любителей Т-регуляторных клеток».

Киселева Е.П. *считает*: «Т-клетки вообще ничего не распознают, они ужасно глупые».

Козлов И.Г. *полагает*: «Th2 оказались самыми флегматичными».

Топтыгина А.П. *заявляет*: «За все лимфоциты я не отвечаю».

Суслов А.П. *поясняет*: «Эта гидроксильная группа — основная часть их языка».

Суворов А.Н. *уверен*: «Бактериям совершенно безразлично, как их называют, они решают свои задачи».

Гариб Ф.Ю. *знает*: «Клетка, как компьютерная система, выбирает ответ».

Козлов И.Г. *наблюдает*: «Эпителий достаточно истеричен, с ним неприятно общаться».

Топтыгина А.П. *полагает*: «Клетки Лангерганса умеют расстегивать эти боковые контакты».

Гариб Ф.Ю. *сочувствует*: «Обиженные макрофаги собираются в одном месте и образуют гранулему».

Федоскова Т.Г. *видит, как* «вирус дает пинок по клеткам».

Гариб Ф.Ю. *пропагандирует*: «Вирокины — вот вам аптека».

Козлов И.Г. *оценивает*: «Врожденный иммунитет настроен достаточно пессимистично».

Топтыгина А.П. *полагает*: «Клетки Лангерганса были записаны в предатели совершенно напрасно».

Козлов И.Г. *не согласен*: «Дендритная клетка по-любому предатель, потому что каждый, кто тянет в нас что-то чужое, — предатель».

Зверев В.В. *дискутирует*: «Дендритные клетки — двойные агенты, работающие под прикрытием: для кого-то шпионы, для кого-то разведчики».

Гариб Ф.Ю. *подводит итог*: «Это дендритная клетка, я ее называю любопытной, но это еще и мудрая клетка».

Параграф шестой МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Киселева Е.П. *обозначает проблему*: «Эта молекула есть и у нас с вами, и у грибов».

Гариб Ф.Ю. *наблюдает*: «Молекулы поступают в мясорубку. Интересно задумано!»

Федоскова Т.Г. *интересуется*: «Зачем это все надо, эти сопли-вопли?»

Киселева Е.П. *поддерживает*: «Лизоцим не только в слезах и всяких соплях».

Суслов А.П. *видит*: «Вместо хилого ручейка, который у нас, там река, потом море, океан».

Ганковская Л.В. *поправляет*: «Не шторм у нас цитокиновый, а цитокиновый бум».

Калинина Н.М. *соглашается*: «Возникла мода на цитокины».

Тотолян А.А. *объясняет*: «Я, как всякий кулик, естественно, буду нахваливать свои хемокины».

Заморина С.А. *сокрушается*: «Структура TLR, для врачей это всегда грустно».

Тотолян А.А. *уверен*: «Мы пляшем от рецепторов».

Козлов И.Г. *наблюдает*: «РАМРы стали МАМРами».

Тотолян А.А. *уточняет*: «Если детализировать до генетического уровня».

Демидов О.Н. *знает*: «Хроматин, как елка, увешан бактерицидными гранулами».

Суворов А.Н. *видит*: «Идет постоянная и очень запутанная игра разных метаболитов».

Свитич О.А. *сокрушается*: «Полностью очистить одну нуклеинку от другой нуклеинки невозможно».

Тотолян А.А. *подытоживает*: «Мимолетное увлечение генетическими технологиями закончилось, и все остались при своих».

Параграф седьмой ИММУНОЛОГИЯ ЛИЧНОЙ ЖИЗНИ

Караулов А.В. *знает*, что «исторически очень важны условия для миграции сперматозоидов».

Заморина С.А. *читала*, что «Дженевей очень много обсуждал это со своей женой».

Недоспасов С.А. *считает*, что «язык и ухо находятся в определенном месте».

Караулов А.В. *наблюдает*: «При применении сублингвально все меняется не только в респираторном, но и в урогенитальном тракте».

Нестерова И.В. *уточняет*: «После того, как произошел воспалительный акт».

Федоскова Т.Г. *уверена*: «Каждого человека соображают на троих».

Караулов А.В. *поясняет*: «Все наши коллеги, которые занимаются репродуктивной инфекцией».

Суворов А.Н. *не сомневается*: «При заболевании это оголенные бактерии, и если присматриваться — их уже видно».

Караулов А.В. *детализирует*: «И вагина, и если мы дальше посмотрим снизу вверх».

Топтыгина А.П. *видит*: «Они никуда не деваются, они сидят и контролируют это самое место».

Федоскова Т.Г. *сообщает*: «Вирус хочет найти кого-то рядом, кого можно возбудить».

Калинина Н.М. *огорчается*: «Ни один из них не может удовлетворить нас полноценностью своей».

Федоскова Т.Г. *предполагает*: «Все игры генов плюс то, что в него засунули».

Суворов А.Н. *наблюдает*: «Он руку-то убрал, а вот это-таки торчит. И тут мы его настигнем».

Козлов И.Г. *не сомневается*: «Он стоит и всегда готов».

Федоскова Т.Г. *знает*: «Вирусы и бактерии взаимоотношаются между собой, и при этом чтобы макроорганизм не прибить».

Заморина С.А. *волнуется*: «Во время беременности постоянно возникают какие-то странные состояния».

Федоскова Т.Г. *провозглашает*: «Попа рулит. Это наш главный орган, и мы его должны держать в порядке».

Параграф восьмой ПСИХОИММУННЫЙ АНАЛИЗ

Козлов И.Г. *предполагает*: «Моя задача, видимо, сказка на ночь».

Недоспасов С.А. *пытается запугать*: «У всех присутствующих, в том числе представителей администрации, а не только у врачей, в клетках есть такая мясорубочка».

Продеев А.П. *сознается*: «Вот тут мы ничего не понимаем, я про себя говорю».

Козлов И.Г. *беспокоится*: «Если оно дообсудится, а оно дообсудится, то будет шок».

Недоспасов С.А. *гнет свою линию*: «Есть шанс, что эта машинка вас тоже нарежет».

Козлов И.Г. *поясняет*: «Если этот человек нормальный, то постарается забыть».

Топтыгина А.П. *уточняет*: «Вот эти наши бледно-розовые достижения».

Козлов И.Г. *видит*: «Они удачно прорываются, и мы не только красной мордой отделаемся».

Топтыгина А.П. *удивляется*: «Самыми живописными у нас оказались пятки».

Козлов И.Г. *наблюдает*: «Эпителий разъезжается».

Гариб Ф.Ю. *пугает*: «У патогенов появляются новые головы».

Козлов И.Г. *утешает*: «Мы — еще мало пострадавшая сторона».

Черешнев В.А. *объясняет*: «И вот оно воспаление: может быть корявое, может быть развернутое».

Козлов И.Г. *поддерживает*: «У каждого есть свое самостоятельное звучание и своя персональная ответственность».

Корсунский И.А. *заявляет*: «Если это произойдет, мы их поубиваем, конечно, и перестанем ходить».

Топтыгина А.П. *поясняет*: «С нулем работать невозможно, сами понимаете».

Харит С.М. *настаивает*: «Все неживое должно быть сделано».

Козлов И.Г. *медитирует*: «Когда вы пьете кота в мешке».

Семикина Е.Л. *считает*: «Это меню, много тут чудесного и волшебного».

Продеус А.П. *волнуется*: «Я когда это определение читаю, то не совсем понимаю, о чем мы говорим».

Близнецов К.Ю. *считает важным* «отсутствие необходимости в глубоко погруженном операторе».

По мнению Продеуса А.П.: «Они — не они».

Козлов И.Г. *делает общее заключение*: «Когда никто не понимает, что происходит, Нобелевский комитет вручает Нобелевскую премию».

Законспектировали:

Семикина Елена Леонидовна: Москва, ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, заведующая ЦКДЛ; РНИМУ им. Н.И. Пирогова, профессор кафедры факультетской педиатрии, д.м.н.

Топтыгина Анна Павловна: Москва, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, лаборатория цитокинов, ведущий научный сотрудник, профессор кафедры иммунологии биологического факультета МГУ, д.м.н.

03 — 09 февраля 2019 г., Псковская область, Пушкинские горы

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

Альшеевская А.А.	209	Зборовская И.А.	351	Мучукова О.М.	293	Сенников С.В.	209
Аляхнович Н.С.	313	Зинченко Ю.С.	269	Мячикова В.Ю.	333	Сизякина Л.П.	323
Беломестнова И.А.	209	Зозуля С.А.	257	Назаренко М.М.	269	Старшинова А.А.	269
Беляева Е.Н.	269	Иванова Н.Е.	333	Непомнящих Т.С.	221	Ткаченко О.Ю.	333
Блинова Т.В.	333	Истомина Е.В.	269	Николаев Е.Н.	341	Тотолян Арег А.	333
Борисова Л.В.	293	Казарян Г.С.	251	Новиков Д.К.	313	Филатов М.В.	269
Бурдаков В.С.	269	Калиновская Н.Ю.	231	Новичков Д.А.	239	Филиппова Ю.Ю.	303
Бурмистрова А.Л.	303	Караулов А.В.	209	Нохрин Д.Ю.	303	Хворостухина Н.Ф.	239
Вараксин Н.А.	341	Карзакова Л.М.	293	Овсепян Л.М.	251	Чистякова Г.Н.	279
Васильева Е.Ф.	257	Клюшник Т.П.	257	Омельченко М.А.	257	Чурюкина Э.В.	323
Гаврилова Е.В.	221	Кононихин А.С.	341	Офицеров В.И.	341	Чухловин А.Б.	333
Ганковская Л.В.	201	Кудряшов С.И.	293	Пастушкова Л.Х.	341	Шабалдин А.В.	279
Гонтарь И.П.	351	Ланда С.Б.	269	Понасенко О.А.	201	Шабалдина Е.В.	279
Горшкова С.В.	279	Лапин С.В.	333	Понукалин А.Н.	341	Ширинский В.С.	231
Гусева В.И.	333	Ларина И.М.	341	Ремизова И.И.	279	Ширинский И.В.	231
Емельянова О.И.	351	Лопатникова Ю.А.	209	Русанова О.А.	351	Шмулевич С.А.	279
Жукова Ю.В.	209	Лукоянычева Е.Б.	279	Сапожникова Н.В.	269	Шнайдер М.А.	231
Зангинян А.В.	251	Лях Р.В.	341	Сарманова З.В.	257	Яблонский П.К.	269
Захарова Н.Б.	341	Максютов Р.А.	221	Свитич О.А.	201		
Захарян Г.В.	251	Маслянский А.Л.	333	Секирина Т.П.	257		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

α1-протеиназный ингибитор	258	иммунопатология	209	CD14 ⁺ /CD16 ⁺	258
адеметионин	231	иммунорегуляция	209	протеомика	341
активация базофилов	313	иммуносигнатура	304	противораковые вакцины	221
аллографтные модели	221	иммунотерапия	209, 221	рак	221
антиоксидантная система	351	инсульт	251	расстройства аутистического спектра	304
антитела	351	интерлейкин-17	313	реактивность антител	304
антитела к циклическому цитруллинированному пептиду	333	интерлейкины	209	ревматоидный артрит	231, 333
артериальная гипертензия	201	интерфероны	209	репродуктивные потери	279
атеросклероз	201	«классические» моноциты CD14 ⁺⁺ /CD16 ⁻	258	рецепторы	209
белок теплового шока	201	ксенографтные модели	221	сердечно-сосудистые заболевания	201
беременность	240	курение	333	системная склеродермия	351
биоинформатика	304	лабораторные животные	221	системная энзимотерапия	323
бронхиальная астма	323	латентная туберкулезная инфекция	270	смешанная культура лимфоцитов	279
вобэнзим	323	лейкоцитарная эластаза	258	тартазин	313
воспаление	201	магнитосорбенты	351	тест с аллергеном туберкулезным рекомбинантным	270
врожденные пороки сердца	279	масс-спектрометрия	341	титана диоксид	313
генистеин	231	метилование ДНК	231	туберкулез	270
гидралазин	231	метод динамического светорассеяния	270	фактор некроза опухоли	209
глутатион	251	мочевые биомаркеры	341	факторы роста	209
гормонозависимость	323	общий эпипот	333	фибробластоподобные синовиальные клетки	231
дети	304	окислительная модификация белков	251	хроническая обструктивная болезнь легких	294
диагностика	351	онколитические вирусы	221	церулоплазмин	351
дифференциальная диагностика	304	острый панкреатит	240	цитокины	209, 231, 240, 341
доплерометрия	240	перинатальные потери	240	экспрессия генов	251
иммунная сеть	304	пероксидазная активность	313	юношеские депрессии	258
иммунное воспаление	258	пиелонефрит	341	HLA-DR	279
иммунные механизмы	201	плацентарная дисфункция	240	HLA-DRB1	333
иммунные ответ	221	провоспалительные моноциты		HLA-гаплотипы	294
иммунологические тесты	270				
иммуномодуляторы	313				

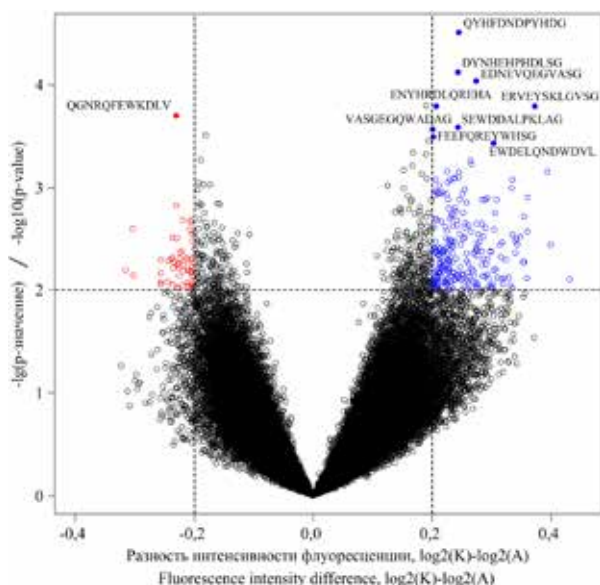


Рисунок 3. Вулканная диаграмма различий между группами детей с аутизмом (А) и типично развивающимися детьми (К) по 122 926 антигенным миметикам (пояснения – в тексте)

Примечание. На рисунке подписаны последовательности аминокислотных остатков 10 антигенных миметиков, по которым наблюдаются наиболее значимые различия. Красным цветом отмечены значения показателей реактивности АТ, значимо повышенные у детей с РАС, синим – у ТРД.

Figure 3. Volcano diagram of the differences between groups of children with autism (A) and typically developing children (K) in 122 926 antigenic mimetics (explanations – in the text)

Note. In the figure, the sequences of amino acid residues of 10 antigenic mimetics are signed, according to which the most significant differences are observed. Red values of the antibodies reactivity, significantly increased in children with ASD, and blue – in TD children.

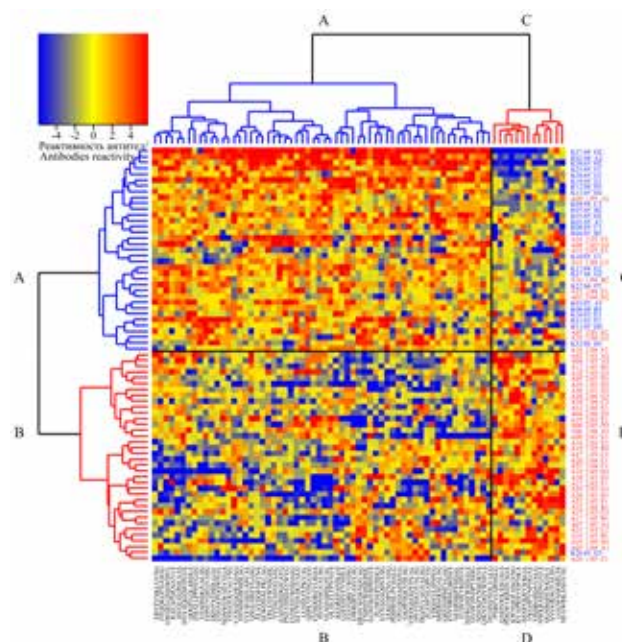


Рисунок 4. Тепловая карта различий между группами детей с РАС и ТРД

Примечание. Тепловая карта представляет собой таблицу из ячеек, отражающих индивидуальные значения показателей реактивности 73 АТ (ось Х, подписи соответствуют аминокислотным последовательностям антигенных миметиков, с которыми взаимодействуют АТ плазмы крови) для каждого ребенка (ось У, К – ТРД, А – дети с РАС). Синий цвет ячейки указывает на низкую реактивность АТ, желтый и красный цвета ячеек указывают на среднюю и высокую реактивность АТ соответственно. На левом поле тепловой карты представлена дендрограмма сходства объектов исследования, которая делит группы обследованных детей на два больших кластера. На верхнем поле тепловой карты представлена кластеризация показателей реактивности 73 АТ, отобранных для дифференциальной диагностики групп. Для наглядности поле тепловой карты расчерчено черными линиями по границам кластеров, образуя 4 квадрата: А, В, С, D.

Figure 4. Heatmap of the differences between groups of children with ASD and TD children

Note. The heatmap is a table of cells reflecting individual values of the reactivity parameters of 73 antibodies (X axis, the signatures correspond to the amino acid sequences of antigenic mimetics with which the blood plasma antibodies interacts) for each child (Y axis, K – TD children, A – children with ASD). The blue color of the cell indicates the low antibodies reactivity, the yellow and red colors of the cells indicate the average and high antibodies reactivity, respectively. In the left field of the heatmap, a dendrogram of the similarity of the research objects is presented, which divides the groups of the children surveyed into two large clusters. On the upper field of the heatmap, clusterization of reactivity parameters of 73 antibodies selected for differential diagnostics of groups is presented. For clarity, the heatmap field is drawn with black lines along the boundaries of clusters, forming 4 squares: A, B, C, D.

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

