

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

июль-август

2019, том 21

№ 4

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

Тотолян Арег Артемович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии и 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 10.10.2019 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 27,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 978

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

Халдояниди 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

Juli-August

2019, volume 21

No. 4

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

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

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

Vladimir 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 Rakitianskaia
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, Malyye ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 10.10.2019. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 27,5. 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

Попов С.В., Стуров Н.В., Воробьев Н.В., Хайдуков С.В. РОЛЬ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В ПРОГРЕССИРОВАНИИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	587
Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алёшкин В.А., Афанасьев С.С. ЗАВИСИМОЕ ОТ ЛЕКТИНОВ РАЗНООБРАЗИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ПРИРОДНЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК В КОММУНИКАЦИЯХ ПРОТИВ ОПУХОЛЕЙ И ВИРУСОВ	595
Бочкова М.С., Заморина С.А., Тимганова В.П., Храмов П.В., Раев М.Б. РОЛЬ ГЛИКОДЕЛИНА В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В КОНТЕКСТЕ РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ БЕРЕМЕННОСТИ.....	603
Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Жебрун Д.А., Васильева Е.В., Тополян Арег А. РОЛЬ ХЕМОКИНОВОГО РЕЦЕПТОРА CXCR3 И ЕГО ЛИГАНДОВ ПРИ НЕКОТОРЫХ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ.....	617
Учасова Е.Г., Груздева О.В., Дылева Ю., Белик Е.В. РОЛЬ ПЕРИВАСКУЛЯРНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В РАЗВИТИИ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ И НЕАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	633

Оригинальные статьи

Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В., Сладкопеевцев А.С. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИМУСА И СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ У САМОК КРЫС ВИСТАР С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ	643
Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Останин А.А. СИГНАЛИНГ ЧЕРЕЗ РЕЦЕПТОР К ФАКТОРУ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ 1-ГО ТИПА КАК НОВЫЙ МЕХАНИЗМ ПОДАВЛЕНИЯ Т-КЛЕТОК ПРИ ОПУХОЛЕВОМ НЕОАНГИОГЕНЕЗЕ.....	653
Шанин С.Н., Корнева Е.А. РЕАКЦИЯ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК НА РЕГУЛЯТОРНЫЙ СИГНАЛ ИНТЕРЛЕЙКИНА 1 КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ	661
Соколов Д.И., Маркова К.Л., Михайлова В.А., Вязьмина Л.П., Милютин Ю.П., Козырева А.Р., Жданова А.А., Малыгина Д.А., Онохин К.В., Иванова А.Н., Корневский А.В., Сельков С.А. ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОВЕЗИКУЛ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ НК-КЛЕТКАМИ.....	669
Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудряцев И.В., Мошев А.В. ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ОТ СОДЕРЖАНИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МОНОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ.....	689
Павлова А.А., Павлова И.Е., Бубнова Л.Н., Бессмельцев С.С., Карягина Е.В. ВЗАИМОСВЯЗЬ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ	703
Савлевич Е.Л., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНСИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОВОДИМОЙ ТЕРАПИИ	715
Криволапова И.М., Пашнина И.А., Черешнев В.А. КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ЮВЕНИЛЬНЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ	725

Краткие сообщения

Аутеншлюс А.И., Иванов И.Д., Голованова А.В., Студеникина А.А., Михайлова Е.С., Вавилин В.А., Вараксин Н.А., Ляхович В.В. СРАВНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ мРНК ЦИТОКИНОВ С ИХ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ В СУПЕРНАТАНТЕ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ U937 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА НЕЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ	737
Матвеева Л.В. ЦИТОКИНЫ КАК ПРЕДИКТОРЫ КИШЕЧНОЙ МЕТАПЛАЗИИ ЖЕЛУДКА	743
Федоренко Т.В., Колесникова Н.В., Пашкова И.А., Порханов В.А., Губарева Е.А., Куева Е.В. ХЕМОКИНОВЫЕ МАРКЕРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАННИМ ОТТОРЖЕНИЕМ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА ПОЧКИ.....	749
Прилуцкая И.А., Крюк Ю.Я. УРОВНИ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ А У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ.....	755
Саакян С.В., Балацкая Н.В., Катаргина Л.А., Куликова И.Г., Мякошина Е.Б. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЕ	765
Черемных Е.Г., Иванов П.А., Фактор М.И., Чикина Е.Ю., Никитина С.Г., Симашкова Н.В., Брусов О.С. СИСТЕМА КОМПЛЕМЕНТА КАК МАРКЕР ИММУННОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ РАССТРОЙСТВАХ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА У ДЕТЕЙ.....	773
Белоусов П.В., Бобровская Я.И., Боголюбова А.В., Сазыкин А.Ю., Шебзухов Ю.В., Шварц А.М., Ланцаков К.В., Ванушко В.Э., Купраш Д.В., Абросимов А.Ю. ВЫЯВЛЕНИЕ АУТОАНТИТЕЛ, РАСПОЗНАЮЩИХ РАКОВО-СЕТЧАТОЧНЫЙ АНТИГЕН РЕКОВЕРИН, В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НЕИНВАЗИВНЫМИ ФОЛЛИКУЛЯРНЫМИ ОПУХОЛЯМИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ЯДРАМИ ПАПИЛЛЯРНОГО ТИПА (NIFTR)	781
Серов Д.А., Кабанов Д.С., Косякова Н.И., Прохоренко И.Р. ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ НА ЛПС-ИНДУЦИРОВАННУЮ СЕКРЕЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ.....	789

Правила для авторов	797
---------------------------	-----

Авторский указатель	800
---------------------------	-----

Предметный указатель	800
----------------------------	-----

CONTENTS

Reviews

Popov S.V., Sturov N.V., Vorobyev N.V., Khaidukov S.V. ROLE OF THE REGULATORY T CELLS IN PROGRESSION OF PROSTATE CANCER	587
Lakhtin M.V., Lakhtin V.M., Alyoshkin V.A., Afanasiev S.S. LECTIN-DEPENDENT DIVERSITY OF NATURAL KILLER POPULATIONS AND COMMUNICATIONS AGAINST TUMORS AND VIRUSES	595
Bochkova M.S., Zamorina S.A., Timganova V.P., Khramtsov P.V., Rayev M.B. ROLE OF GLYCODELIN IN THE IMMUNE SYSTEM REGULATION IN THE CONTEXT OF DEVELOPING PREGNANCY	603
Arsentieva N.A., Semenov A.V., Zhebrun D.A., Vasilyeva E.V., Totolyan Areg A. ROLE OF CXCR3 CHEMOKINE RECEPTOR AND ITS LIGANDS IN CERTAIN DISEASES	617
Uchasova E.G., Gruzdeva O.V., Dyleva Yu.A., Belik E.V. ROLE OF PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE IN THE DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROTIC AND NONATHEROSCLEROTIC DISEASES	633

Original articles

Kosyreva A.M., Dzhililova D.Sh., Makarova O.V., Sladkopevtsev A.S. MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES OF THYMUS AND CONTENTS OF BLOOD LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN FEMALE WISTAR RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA IN SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE	643
Chernykh E.R., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Batorov E.V., Ostanin A.A. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-1 SIGNALING AS A NOVEL MECHANISM OF T CELL SUPPRESSION IN TUMOR NEOANGIOGENESIS	653
Shanin S.N., Korneva E.A. RESPONSE OF LYMPHOID CELLS TO REGULATORY SIGNAL OF INTERLEUKIN 1 AS AN INDEX OF LYMPHOCYTE ACTIVITY	661
Sokolov D.I., Markova K.L., Mikhailova V.A., Vyazmina L.P., Milyutina Yu.P., Kozyreva A.R., Zhdanova A.A., Malygina D.A., Onokhin K.V., Ivanova A.N., Korenevsky A.V., Selkov S.A. PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF MICROVESICLES PRODUCED BY NATURAL KILLER CELLS	669
Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V. INTERDEPENDENCE BETWEEN THE PHENOTYPE OF DENDRITIC CELLS AND AMOUNTS OF BLOOD PROINFLAMMATORY MONOCYTES IN PATIENTS WITH KIDNEY CANCER	689
Pavlova A.A., Pavlova I.E., Bubnova L.N., Bessmeltsev S.S., Karyagina E.V. RELATIONSHIP BETWEEN SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN CYTOKINE GENES AND CLINICAL LABORATORY PARAMETERS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA	703
Savlevich E.L., Zurochka A.V., Khaidukov S.V. CHARACTERISTICS OF CELLULAR COMPARTMENT CHANGES OF IMMUNE SYSTEM IN THE PATIENTS WITH CHRONIC POLYPOUS RHINOSINUSITIS DEPEND ON EFFICIENCY OF DRUG THERAPY	715
Krivolapova I.M., Pashnina I.A., Chereshev V.A. CONCENTRATION OF ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN CELL CULTURE SUPERNATANTS IN CHILDREN WITH JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS	725

Short communications

Autenshlyus A.I., Ivanov I.D., Golovanova A.V., Studenikina A.A., Mikhaylova E.S., Vavilin V.A., Varaksin N.A., Liakhovich V.V. EXPRESSION OF mRNA FOR CYTOKINES COMPARED TO THEIR CONCENTRATIONS IN CULTURE SUPERNATES OF U937 CELLS EXPOSED TO POLYCLONAL ACTIVATORS	737
Matveeva L.V. CYTOKINES AS PREDICTORS OF INTESTINAL METAPLASIA OF STOMACH	743
Fedorenko T.V., Kolesnikova N.V., Pashkova I.A., Porkhanov V.A., Gubareva E.A., Kuevda E.V. CHEMOKINE MARKERS ASSOCIATED WITH EARLY REJECTION OF KIDNEY ALLOGRAFT	749
Prilutskaya I.A., Kryuk Yu.Ya. LEVELS OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE	755
Saakyan S.V., Balatskaya N.V., Katargina L.A., Kulikova I.G., Myakoshina E.B. SUBPOPULATION PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN UVEAL MELANOMA	765
Cheremnykh E.G., Ivanov P.A., Factor M.I., Chikina E.Yu., Nikitina S.G., Simashkova N.V., Brusov O.S. COMPLEMENT SYSTEM AS A MARKER OF IMMUNE DYSFUNCTION IN CHILDREN AUTISM SPECTRUM DISORDERS	773
Belousov P.V., Bobrovskaya Ya.I., Bogolyubova A.V., Sazykin A.Yu., Shebzukhov Yu.V., Schwartz A.M., Lanshchakov K.V., Vanushko V.E., Kuprash D.V., Abrosimov A.Yu. DETECTION OF AUTOANTIBODIES RECOGNIZING CANCERRETINA ANTIGEN RECOVERIN IN BLOOD OF PATIENTS WITH NON-INVASIVE FOLLICULAR THYROID NEOPLASMS WITH PAPILLARY-LIKE NUCLEAR FEATURES (NIFTP)	781
Serov D.A., Kabanov D.S., Kosyakova N.I., Prokhorenko I.R. INFLUENCE OF THERAPY UPON LPS-INDUCED CYTOKINE SECRETION BY THE BLOOD-DERIVED INNATE IMMUNITY CELLS OF THE BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS	789

Instructions to Authors	797
-------------------------------	-----

Author index	800
--------------------	-----

Subject index	800
---------------------	-----

РОЛЬ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В ПРОГРЕССИРОВАНИИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Попов С.В.¹, Стуров Н.В.¹, Воробьев Н.В.², Хайдуков С.В.³

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Накопленные данные о регуляторных Т-клетках при раке предстательной железы позволяют предположить, что эти клетки проникают в опухолевую ткань предстательной железы, подавляют противоопухолевый иммунный ответ, вызывая агрессивное течение рака и низкую выживаемость. Детальная оценка субпопуляций Т-клеток в микроокружении опухоли показала, что количество CD4⁺Treg ухудшает прогноз. В частности, показано, что каждая дополнительная CD4⁺Treg-клетка вызывает статистически значимое увеличение смертности от рака простаты на 12%, независимо от других клинических факторов. Существует несколько возможных объяснений повышенной инфильтрации клеток Treg в ткани рака предстательной железы. Во-первых, опухолевые клетки или макрофаги в опухоли способны секретировать хемокин CCL22, который обладает сродством к рецептору CCR4, экспрессируемому на клетках Treg. Во-вторых, цитокины, секретируемые опухолями предстательной железы, такие как TGF-β, могут регулировать экспрессию FoxP3 и расширять популяцию Treg. TGF-β, в свою очередь, представляет собой многофункциональный цитокин, который увеличивает выживаемость и пролиферацию трансформированных клеток, в том числе эпителиальных клеток простаты, что было обнаружено в повышенных количествах у пациентов с метастазированием.

Ключевые слова: Treg, FoxP3, CD127, CTLA-4, цитокины, рак простаты

ROLE OF THE REGULATORY T CELLS IN PROGRESSION OF PROSTATE CANCER

Popov S.V.^a, Sturov N.V.^a, Vorobyev N.V.^b, Khaidukov S.V.^c

^a Russian Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

^b National Medical Research Radiological Center, Moscow, Russian Federation

^c M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. The existing data on regulatory T cells (Tregs) in prostate cancer suggest that these cells may penetrate the prostate gland malignant tissue, suppressing antitumor immune response, thus promoting

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич
ФГБУН «Институт биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук
117997, Россия, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая,
16/10.
Тел.: 8 (985) 923-41-62.
E-mail: khsergey54@mail.ru

Address for correspondence:

Khaidukov Sergey V.
M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Russian Academy of Sciences
117997, Russian Federation, Moscow, GSP-7,
Miklukho-Maklay str., 16/10.
Phone: 7 (985) 923-41-62.
E-mail: khsergey54@mail.ru

Образец цитирования:

С.В. Попов, Н.В. Стуров, Н.В. Воробьев, С.В. Хайдуков
«Роль Т-регуляторных клеток в прогрессировании
рака предстательной железы» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 587-594.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-587-594
© Попов С.В. и соавт., 2019

For citation:

S.V. Popov, N.V. Sturov, N.V. Vorobyev, S.V. Khaidukov "Role
of the regulatory T cells in progression of prostate cancer",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 4, pp. 587-594.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-587-594
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-587-594

aggressive clinical course and low survival of the cancer patients. Evaluation of T cell subpopulations from the tumor microenvironment has shown that the number of CD4⁺Tregs is associated with inferior clinical prognosis. In particular, each additional CD4⁺Treg cell has been shown to cause a statistically significant increase in prostate cancer mortality by 12%, regardless of other clinical factors. There are several possible explanations for the increased infiltration of prostate cancer tissue with regulatory T cells. Firstly, malignant cells or tumor-associated macrophages are capable of secreting chemokine CCL22, which has an affinity for the CCR4 receptor expressed on Treg cells. Secondly, cytokines secreted by prostate tumors, such as TGF- β , may regulate the FoxP3 expression, thus expanding the Treg population. TGF- β , in turn, is a multifunctional cytokine that promotes survival and proliferation of transformed cells, including prostate epithelium, as evidenced by increased amounts in the patients with metastatic disease.

Keywords: Treg cells, FoxP3, CD127, CTLA-4, cytokines, prostate cancer

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) относится к числу распространенных злокачественных новообразований у мужчин. В Российской Федерации наблюдается постоянное увеличение распространенности РПЖ, которая составила в 2017 году 150,2 случая на 100 тысяч населения. Несмотря на применяющиеся методы диагностики данного заболевания и мониторинг уровня простатического специфического антигена (ПСА), летальность больных в течение года с момента установления РПЖ в России составила в 2017 году 8,1% [1]. Высокие показатели заболеваемости и смертности обуславливают необходимость совершенствования методов диагностики и лечения РПЖ. Актуальной проблемой в настоящее время является выявление потенциально смертельного РПЖ на момент постановки диагноза. Показатель Глисона, уровень ПСА представляют определенную прогностическую ценность для лечения РПЖ, но они не могут предсказать, каким окажется течение заболевания — индолентным или агрессивным. В связи с этим на сегодняшний день необходимо продолжение поиска дополнительных прогностических маркеров для более эффективного принятия клинических решений при лечении РПЖ [6].

Современные достижения молекулярной биологии, геной инженерии, иммунологии привели к возможности уточнения иммунопатогенеза онкологических заболеваний. Расширение возможностей проточной цитофлюориметрии определило современные представления о перечне популяций лимфоцитов, исследование которых целесообразно при оценке иммунного статуса. Исследования патогенеза различных онкологических заболеваний продемонстрировали роль активированных лимфоцитов, регуляторных Т-клеток, а также субпопуляций В- и НК-клеток. В связи с вышеизложенным на сегодняшний день особый интерес, в рамках оценки иммунного статуса при иммунофенотипировании лимфоцитов периферической крови, представляет анализ

малых субпопуляций лимфоцитов и пулов активированных клеток [2]. Регистрация динамики изменений субпопуляционного состава Т-клеток при ряде онкологических заболеваний важна для контроля эффективности терапии и прогноза течения заболевания.

Регуляторные Т-клетки: фенотип, идентификация, механизмы активности, роль в противоопухолевом иммунитете

Рядом недавних исследований установлено, что специфические иммунные клетки в опухолевом микроокружении играют значительную роль при онкологическом процессе. В связи с этим исследование прогностической ценности идентификации отдельных субпопуляций иммунных клеток, стимулирующих рост опухоли у пациентов с различными видами рака, в настоящее время особенно актуально [6].

Эффекты супрессии иммунного ответа при появлении первичных опухолей могут быть частично обусловлены их инфильтрацией регуляторными Т-клетками (Treg), которые принимают участие в подавлении иммунных реакций (регулируют Т-клеточный гомеостаз, предотвращают аутоиммунные заболевания, аллергии, гиперчувствительность, реакцию «трансплантат против хозяина», но при этом снижают иммунитет к инфекциям). Установлено, что Treg-клетки имеют определенный фенотип: CD3⁺CD4⁺CD25^{bright}CD45R0⁺CD95⁺, причем наиболее точным маркером для их идентификации является кодирующий фактор транскрипции скурфин (scurfin, FoxP3), который располагается внутриклеточно и является главным регулирующим геном для развития и функционирования CD4⁺CD25^{high} регуляторных Т-клеток. Однако идентификация этого маркера требует пермеабилзации клеток, что затрудняет работу по идентификации Treg [18]. Не так давно появились данные о рецепторе IL-7 (CD127) как возможном биомаркере для Treg у людей. В периферической крови комбинация CD4, CD25 и CD127 выявляет группу Т-клеток, которая обладает высокой су-

прессивной активностью и высокой экспрессией FoxP3 [14]. В свою очередь, эксперименты *in vitro* показали, что экспрессия CD127 после активации Т-клеток резко снижается. CD127 экспрессируется на тимоцитах, Т- и В-предшественниках, зрелых Т-клетках, моноцитах и некоторых других лимфоидных и миелоидных клетках. Показано, что IL-7R играет важную роль в пролиферации и дифференцировке зрелых Т-клеток [18]. Таким образом, окончательный фенотип Treg-клеток будет выглядеть следующим образом: $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{dim-to-neg}FoxP3^+$ и для их детектирования можно использовать данный фенотип Treg, без выявления FoxP3. Для более точной идентификации Treg-клеток предпочтительно использовать многоцветный анализ и многоэтапное «гейтирование» с использованием определенной комбинации моноклональных антител — CD45/CD4/CD25/CD127 (рис. 1А) [3]. Следует отметить, что плотность экспрессии на $CD4^+$ Treg несколько ниже, чем на основной популяции $CD4^+$ Т-клеток, о чем свидетельствует сдвиг максимума интенсивности флуоресценции влево у субпопуляции $CD4^+$ Treg на двухпараметрической гистограмме распределения CD4 против CD25 (рис. 1Б, собственные данные).

Регуляторные Т-клетки являются супрессорами и играют существенную роль во многих иммунологических процессах, в том числе снижают противоопухолевый иммунитет и иммунитет к инфекциям [19]. Первичный механизм супрессорной активности Treg связан с деструкцией метаболизма. В результате присутствия CD25

(альфа-цепь рецептора IL-2) Treg могут связывать IL-2, тем самым подавляя активацию других Т-клеток. Регуляторные Т-клетки экспрессируют транскрипционный фактор подавления — FoxP3, который участвует в ингибировании клеточной активности. Так, Treg могут потреблять IL-2 без активации иммунной функции и в то же самое время предотвращать активацию других Т-клеток. Вследствие наличия на клеточной поверхности Treg эктоэнзимов CD39 и CD73, они способны модулировать подавление клеток через продукцию внеклеточного аденозина (Ado) из АТФ (аденозин три фосфат), которые являются важными эндогенными сигнальными молекулами иммунитета и воспаления. Внеклеточный АТФ является сигналом опасности и хемоаттрактантом для лимфоцитов, активируя провоспалительный ответ, а также индуктором локальной боли [4]. Регуляторные Т-клетки регулируют созревание дендритных клеток, определяя взаимодействие через CD80/86 и CTLA-4. Установлено, что CTLA-4 (цитостатический антиген Т-лимфоцитов 4, CD152) экспрессируется в высокой плотности Treg-клетками и подавляет иммунный ответ [23]. Определено, что CTLA-4 связывает молекулы CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) с более высокой аффинностью, чем CD28, что приводит к ингибированию второго сигнала, необходимого для активации иммунного ответа [20]. Конститутивная экспрессия CTLA-4 среди $CD4^+$ клеток ограничена, прежде всего, Treg и вовлечена в их иммуносупрессорную функцию [17]. Еще одним важным механизмом су-

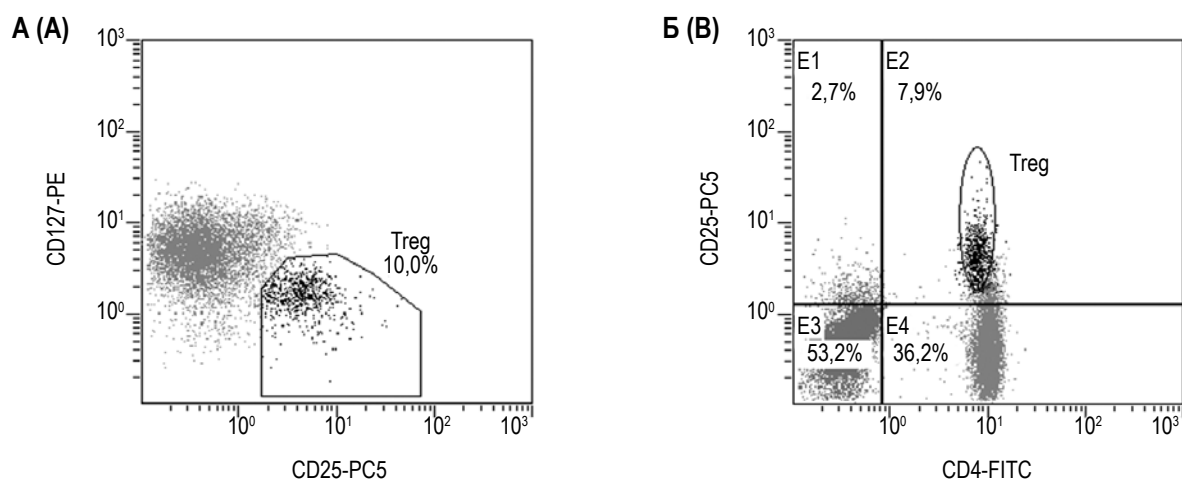


Рисунок 1. Идентификация Treg-клеток методом проточной цитофлуориметрии

Примечание. А – регуляторные клетки с фенотипом $CD4^+CD25^{bright}CD127^{dim-to-neg}$. Б – регуляторные клетки с фенотипом $CD4^+CD25^{bright}$. Treg-клетки выделены черными точками.

Figure 1. Identification of Treg cells by flow cytometry

Note. A, regulatory T cells with the phenotype $CD4^+CD25^{bright}CD127^{dim-to-neg}$. B, regulatory T cells with the $CD4^+CD25^{bright}$ phenotype. Treg cells are highlighted with black dots.

прессорной функции Treg является цитотоксический гранзим А. Известно, что Treg могут подавлять иммунный ответ, обуславливая апоптоз [16]. В этом случае механизмы апоптоза используются для регуляции развития тимоцитов, формирования репертуара Т-клеток, их селекции и для координации событий, ведущих к периферическому иммунному ответу [11]. Treg могут управлять иммунным ответом при помощи перфорин/гранзимных путей. Установлено, что адаптивные Treg в основном экспрессируют гранзим В и могут уничтожать аллогенные клетки мишени перфорин-зависимым путем. У людей активированные Treg экспрессируют гранзим А и небольшое количество гранзима В, что свидетельствует в пользу того, что Treg воплощают свою регулируемую способность через супрессию при помощи цитотоксической активности [12]. Treg способны также продуцировать ингибирующие цитокины: IL-10, TGF- β , IL-35 и вовлечены в регуляцию периферической толерантности к собственным антигенам [21].

Недавние исследования показали, что Treg (CD4⁺Treg и CD8⁺Treg) подавляют широкий спектр противоопухолевых иммунных реакций. Иммунное подавление может происходить при помощи секреции противовоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-10 и трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), или непосредственно через межклеточные контакты [10, 13]. В свою очередь, Treg модулируют агрессивность клеточной иммунной реакции и отношения между CD3⁺T-клетками и, таким образом, они ответственны за развитие иммунной реакции и иммунологической толерантности. Высокая инфильтрация Treg, по-видимому, способствует развитию рака из-за критической роли иммунной толерантности в процессе развития рака. Кроме того, повышенные уровни Treg определяют более высокую агрессивность опухоли при различных видах рака [15, 22].

Значение регуляторных Т-клеток при раке предстательной железы

Наличие и количественные характеристики регуляторных Т-клеток имеют определенное диагностическое значение при РПЖ. В ряде исследований повышенное количество (по сравнению с нормальной тканью простаты) Tregs было обнаружено в ткани рака предстательной железы, что определяло неблагоприятные клинические исходы [6, 15, 22].

Miller A.M. и соавт. изучили, увеличиваются ли CD4⁺CD25^{high} регуляторные Т-клетки в опухолевой ткани и периферической крови у пациентов с РПЖ, перенесших простатэктомию. Авторы показали, что инфильтрация CD4⁺CD25^{high}Т-клеток в предстательной железе была значительно выше в опухоли по срав-

нению с доброкачественной тканью из той же простаты. Уровень CD4⁺CD25^{high}Т-клеток в периферической крови оказался значительно выше у пациентов с РПЖ по сравнению со здоровыми мужчинами. В ходе исследования было выявлено, что часть CD4⁺CD25^{high}Т-клеток является глюкокортикоид-индуцированной TNF-рецептором, ICOS и FoxP3-позитивной. Кроме этого, CD4⁺CD25^{high}Т-клетки из крови и супернатанты из культивируемых образцов опухолевой ткани предстательной железы проявляли иммуносупрессивную функцию *in vitro*. Определено, что супернатанты из культивируемых образцов ткани предстательной железы и жидкости РПЖ индуцировали миграцию CD4⁺CD25^{high}Т-клеток, и было показано (с помощью ELISA), что они содержат регуляторный Т-клеточный хемокин CCL22. Полученные авторами результаты свидетельствуют в пользу того, что Treg являются важным клеточным компонентом опухолей предстательной железы на ранней стадии. При этом исследователи полагают, что новые терапевтические стратегии, направленные на ингибирование Treg, могут улучшить результаты иммунотерапии РПЖ. Несмотря на то что время наблюдения было ограниченным, авторы предположили наличие возможной связи между клетками Treg и выживаемостью у мужчин с РПЖ [15].

В другом исследовании, проведенном Valdman A. и соавт., изучали распределение FoxP3, CD4- и CD8-положительных клеток в доброкачественных тканях предстательной железы и РПЖ. Тканевые микрочипы были созданы из образцов, полученных в результате радикальной простатэктомии у 36 пациентов. От каждого пациента были получены шесть образцов: два от раковой ткани, по одному от доброкачественной ткани каждой из периферических, переходных и центральных зон и один из зоны атрофии предстательной железы. Установлено, что FoxP3 CD4- и CD8-позитивные клетки чаще встречались при раке, чем в неатрофической доброкачественной ткани ($p < 0,01$), а также чаще наблюдались при атрофии, чем в неатрофической периферической зоне, но достоверно не отличались между раком и атрофией. FoxP3, CD4-положительные клетки чаще обнаруживали в периферической и переходной зонах простаты. Инфильтрация Treg опухолевой ткани предстательной железы была более выраженной, чем доброкачественной ткани [22].

Известно, что ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3) является маркером CD4⁺Treg, способных подавлять противоопухолевую активность. В связи с этим представляет интерес исследование Camisaschi C. и соавт., которые продемонстрировали, что внутри супрессорной популяции CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺Т-клеток экспрессия LAG-3 идентифицировала дискретное количество кле-

ток, обладающих терминально-эффекторным фенотипом. Эти авторы также определили, что такое количество Treg оказалось повышенным в периферической крови у больных с различными видами рака, в том числе и РПЖ [5].

Davidsson S. и соавт. (2013) сообщили о результатах исследования «случай-контроль», проведенном в группе мужчин, перенесших трансуретральную резекцию предстательной железы, у которых был случайно диагностирован РПЖ. К группе случаев относили мужчин, умерших от рака простаты ($n = 261$), а контрольную группу составили пациенты, прожившие более 10 лет после установки диагноза ($n = 474$). В исследовании часто регистрировали инфильтрацию ткани РПЖ как Т-хелперами, так и Т-цитотоксическими клетками, наряду с $CD4^+$ Tregs. Исследователи обнаружили повышенный почти в два раза риск смертельного рака простаты при сравнении самого высокого с самым низким квартилем клеток $CD4^+$ Tregs (95% доверительный интервал: 1,3-2,9). Инфильтрация Т-хелперами или Т-цитотоксическими клетками ткани РПЖ не оказалась ассоциированной с летальным раком. Эти авторы пришли к выводу о том, что у мужчин с большим количеством $CD4^+$ Treg в микроокружении опухоли предстательной железы повышен риск смерти от рака простаты. Таким образом, идентификация $CD4^+$ Treg в опухолевой ткани простаты, по мнению исследователей, может предсказать клинически значимое заболевание, независимо от других факторов [6].

Исследование Flammiger A. и соавт. было посвящено оценке клинической значимости количественной плотности регуляторных Т-клеток при РПЖ с учетом ранее известных данных о том, что присутствие таких клеток в микроокружении опухоли было связано с клиническим исходом при других локализациях рака. Авторы идентифицировали Treg при помощи иммуногистохимического анализа FoxP3 в 88,8% образцов РПЖ 2002 года в формате тканевых микрочипов в большой когорте. Плотность распределения Treg в опухолевой ткани сравнивали с патологическими параметрами и клиническим исходом. Количество Treg, идентифицированных на 0,6 мм спота на ткани, варьировалось от 1 до 10 в норме и от 1 до 103 клеток FoxP3⁺ в образцах опухоли. Безрецидивная выживаемость оказалась значительно уменьшена у пациентов с более высоким числом Treg ($p = 0,0151$). Кроме того, повышенное количество внутриопухолевых FoxP3⁺Treg было связано с более поздней стадией опухоли ($p = 0,0355$) и более высоким индексом маркировки Ki67 ($p < 0,0001$). Плотность в ткани Treg не была ассоциирована с другими клиническими параметрами, такими как распространение на лимфатические узлы, уровень предопераци-

онного ПСА и показателем Глисона. Исследователи предположили, что присутствие в опухолевой ткани предстательной железы регуляторных Т-клеток может оказывать существенное влияние и вызывать неблагоприятное клиническое течение при РПЖ [9].

Davidsson S. и соавт. (2018) оценили распространенность популяций Treg в стромальных и эпителиальных компартментах нормальной, постатрофической гиперплазии, интраэпителиальной неоплазии предстательной железы (ПИН) и опухолевых тканях у мужчин с РПЖ и без него. Объектами исследования были 102 пациента с локализованным раком простаты, перенесшие радикальную простатэктомию, и 38 мужчин с раком мочевого пузыря, перенесшие цистпростатэктомию (без РПЖ при гистологическом исследовании). Целые срезы у всех пациентов исследовали на предмет эпителиальной и стромальной экспрессии $CD4^+$ Tregs и $CD8^+$ Tregs в норме, постатрофической гиперплазии, ПИН и опухолевого поражения. Тест Фридмана применяли для исследования различий в среднем количестве Tregs по гистологическим находкам. Логистическую регрессию использовали для оценки общего и скорректированного отношения шансов в отношении РПЖ для каждой гистологической области. При анализе полученных результатов оказалось, что у мужчин с РПЖ было выявлено значительное количество стромальных $CD4^+$ Tregs в ткани постатрофической гиперплазии и в опухолевой ткани, а инфильтрация $CD4^+$ Treg была менее выражена при ПИН. Повышенное количество эпителиальных $CD4^+$ Treg в нормальной ткани предстательной железы было ассоциировано как с показателем Глисона, так и со стадией РПЖ. Авторы выявили четырехкратное повышение риска РПЖ у мужчин с эпителиальным повышением $CD4^+$ Treg в нормальной ткани предстательной железы. Полученные исследователями данные свидетельствуют о том, что у мужчин с РПЖ инфильтрация $CD4^+$ FoxP3⁺Treg опухолевой ткани простаты более выражена по сравнению с нормальными тканями, но сопоставима с постатрофической гиперплазией. Небольшое количество $CD4^+$ Treg в ткани ПИН указывает, по мнению авторов, на возможность Treg-независимого пути от нормальной ткани до РПЖ через ПИН. Более того, это исследование демонстрирует, что $CD4^+$ FoxP3⁺Treg чаще встречаются в нормальных строме и эпителии, прилегающих к опухолевой ткани, и в ткани РПЖ по сравнению со здоровой тканью предстательной железы. Авторы предполагают, что для определения прогностической ценности $CD4^+$ FoxP3⁺Treg в будущих исследованиях следует установить: происходит инфильтрация до или после развития опухоли предстательной железы? Полученные результаты, по мнению

авторов, могут свидетельствовать о возможности перехода постатрофической гиперплазии в РПЖ в присутствии CD4⁺Treg и указывают на то, что трансформация противоопухолевого иммунного ответа может быть инициирована даже до обнаружения первичной опухоли. Полученные данные, с точки зрения исследователей, свидетельствуют о возможности химиопрофилактики, нацеленной на Treg, у пациентов с наследственным риском развития РПЖ или с наличием predisposing генетических изменений [7].

В недавнем исследовании Erlandsson A. и соавт. исследовали взаимосвязь и взаимодействие M2-макрофагов и регуляторных Т-клеток в тканях предстательной железы. В этом исследовании «случай-контроль» изучали ткани простаты со случайно обнаруженным (после трансуретральной резекции) РПЖ. 225 мужчин (случай) умерли от РПЖ, контрольную группу составили 367 пациентов, которые прожили более 10 лет после установки диагноза РПЖ, без прогрессирования заболевания. Инфильтрацию в ткани РПЖ M2-макрофагов и FoxP3/CD4-положительных регуляторных Т-клеток определяли при помощи иммуногистохимического исследования. Корреляцию и взаимодействие M2-макрофагов и регуляторных Т-клеток оценивали с использованием ранговой корреляции Спирмена и теста вероятности соответственно. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что между количеством M2-макрофагов и регуляторных Т-клеток отмечена значительная корреляция ($p < 0,001$), но не было обнаружено их взаимодействия. Исследователи полагают, что у мужчин с большим числом M2-макрофагов в опухолевой ткани предстательной железы увеличивается возможность летального исхода от РПЖ. В ходе исследования также было продемонстрировано, что M2-макрофаги и регуляторные Т-клетки могут обуславливать иммуносупрессию у данной категории пациентов [8].

Таким образом, в настоящее время получены данные о том, что регуляторные Т-клетки могут способствовать прогрессированию РПЖ за счет подавления противоопухолевого иммунного ответа, и повышенное количество этих клеток у пациентов с раком простаты является предиктором его агрессивного течения и уменьшения выживаемости.

Заключение

Накопленные данные о регуляторных Т-клетках при РПЖ свидетельствуют о том, что эти клетки инфильтрируют опухолевую ткань простаты, подавляют противоопухолевый иммунный ответ и обуславливают агрессивное течение рака, низкую выживаемость. Проведенная в ряде исследований детальная оценка субпопуляций Т-клеток в опухолевом микроокружении показала, что на самом деле именно количество CD4⁺Treg ухудшает прогноз при РПЖ. В частности, в исследовании Davidsson S. и соавт. было показано, что каждая дополнительная CD4⁺Treg-клетка обуславливает статистически значимое увеличение смертности от РПЖ на 12%, независимо от других клинических факторов [7].

На сегодняшний день существует несколько возможных объяснений повышенной инфильтрации клеток Treg в ткань РПЖ. Во-первых, опухолевые клетки или макрофаги внутри опухоли способны секретировать хемокин CCL22, обладающий сродством к рецептору CCR4, экспрессируемому на клетках Treg. Во-вторых, цитокины, секретируемые опухолями предстательной железы, такими как TGF- β , могут регулировать экспрессию FoxP3 и расширять популяцию Treg. TGF- β , в свою очередь, является многофункциональным цитокином, увеличивающим выживаемость и пролиферацию трансформированных клеток, включая эпителиальные клетки простаты, который был обнаружен в повышенных количествах у пациентов с метастазами.

Особый интерес представляют также данные о клинической значимости числовой плотности регуляторных Т-клеток при РПЖ. Установлено, что у мужчин повышенное количество внутриопухолевых FoxP3⁺Treg было связано с более поздней стадией РПЖ и более высоким индексом Ki67, независимо от других прогностических факторов: уровня предоперационного ПСА и показателя Глисона.

Можно предположить, что определение возможности трансформации противоопухолевого иммунного ответа до обнаружения первичной опухоли и ее ранняя идентификация могут создать предпосылки для применения адресной химиопрофилактики, направленной на Treg, прежде всего у пациентов с наследственным риском развития РПЖ.

Список литературы / References

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году // Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 236 с. [The state of cancer care for the population of Russia in 2017. Ed. Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V.] Moscow: Herzen Moscow Research Institute – a Branch of the Federal Research Center of Radiology Research Center of the Ministry of Health of Russia, 2018. 236 p.

2. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 2-3. С. 227-238. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Totolian Areg A., Chereshev V.A. Major and lymphocyte populations of human peripheral blood lymphocytes and their reference values, as assayed by multi-colour cytometry. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 2-3, pp. 227-238. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-2-3-227-238.
3. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 1. С. 7-16. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V. Analysis of t helper subpopulations (Th1, Th2, Treg, Th17, activated T-helpers) by means of flow cytometry. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, Vol. 13, no. 1, pp. 7-16. (In Russ.)]. doi: 10.15789/1563-0625-2011-1-7-16.
4. Bours M.J., Swennen E.L.R., di Virgilio F., Cronstein B.N., Dagnelie P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology. Therapeutics*, 2006, Vol. 112, no. 2, pp. 358-404.
5. Camisaschi C., Casati C., Rini F., Perego M., de Filippo A., Triebel F., Parmiani G., Belli F., Rivoltini L., Castelli C. LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high) Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, pp. 6545-6551.
6. Davidsson S., Ohlson A.L., Andersson S.O., Fall K., Meisner A., Fiorentino M., Andrén O., Rider J.R. CD4 helper T cells, CD8 cytotoxic T cells, and FOXP3(+) regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer. *Mod. Pathol.*, 2013, Vol. 26, pp. 448-455.
7. Davidsson S., Andren O., Ohlson A.L., Carlsson J., Andersson S.O., Giunchi F., Rider J.R., Fiorentino M. FOXP3+ regulatory T cells in normal prostate tissue, postatrophic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, and tumor histological lesions in men with and without prostate cancer. *Prostate*, 2018, Vol. 78, no. 1, pp. 40-47.
8. Erlandsson A., Carlsson J., Lundholm M., Fält A., Andersson S.O., Andrén O., Davidsson S. M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer. *Prostate*, 2019, Vol. 79, no. 4, pp. 363-369.
9. Flammiger A., Weisbach L., Huland H., Tennstedt P., Simon R., Minner S., Bokemeyer C., Sauter G., Schlomm T., Trepel M. High tissue density of FOXP3+ T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer. *Eur. J. Cancer.*, 2013, Vol. 49, pp. 1273-1279.
10. Fox S.B., Launchbury R., Bates G.J., Han C., Shaida N., Malone P.R., Harris A.L., Banham A.H. The number of regulatory T cells in prostate cancer is associated with the androgen receptor and hypoxia-inducible factor (HIF)-2alpha but not HIF-1alpha. *Prostate*, 2007, Vol. 67, pp. 623-629.
11. Giovannetti A., Pierdominici M., di Iorio A., Cianci R., Murdaca G., Puppo F., Pandolfi F., Paganelli R. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. *Curr. Pharm. Des.*, 2008, Vol. 14, no. 3, pp. 253-268.
12. Grossman W.J., Verbsky J.W., Barchet W., Colonna M., Atkinson J.P., Ley T.J. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 2004, Vol. 21, no. 4, pp. 589-601.
13. Kuniwa Y., Miyahara Y., Wang H.Y., Peng W., Peng G., Wheeler T.M., Thompson T.C., Old L.J., Wang R.F. CD8+Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin. Cancer. Res.*, 2007, Vol. 13, pp. 6947-6958.
14. Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S., Gottlieb P.A., Kapranov P., Gingeras T.R., Fazekas de St. Groth B., Clayberger C., Soper D.M., Ziegler S.F., Bluestone J.A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+T-reg cells. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, no. 7, pp. 1701-1711.
15. Miller A.M., Lundberg K., Ozenci V., Banham A.H., Hellström M., Egevad L., Pisa P. CD4+CD25^{high} T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 10, pp. 7398-7405.
16. Pandiyan P., Zheng L., Ishihara S., Reed J., Lenardo M.J. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 12, pp. 1353-1362.
17. Read S., Malmstrom V., Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 2, pp. 295-302.
18. Schubert L.A., Jeffery E., Zhang Y., Ramsdell F., Ziegler S.F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, no. 40, pp. 37672-37679.
19. Shevach E.M. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 2, no. 6, pp. 389-400.
20. Shevach E.M. Mechanisms of FoxP3+ T regulatory cell mediated suppression. *Immunity*, 2009, Vol. 30, no. 5, pp. 636-645.
21. Shevach E.M. Immunology: regulating suppression. *Science*, 2008, Vol. 322, no. 5899, pp. 202-203.

22. Valdman A., Jaraj S.J., Comperat E., Charlotte F., Roupert M., Pisa P., Egevad L. Distribution of Foxp3-, CD4-, and CD8-positive lymphocytic cells in benign and malignant prostate tissue. *APMIS*, 2010, Vol. 118, pp. 360-365.

23. Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., Fehervari Z., Nomura T., Sakaguchi S. CTLA-4 control over FoxP3⁺ regulatory T cell function. *Science*, 2008, Vol. 322, no. 5899, pp. 271-275.

Авторы:

Попов С.В. — д.м.н., профессор, врач-уролог, кафедра общей врачебной практики Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Стуров Н.В. — к.м.н., доцент, заведующий кафедрой общей врачебной практики Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Воробьев Н.В. — к.м.н., заведующий урологическим отделением отдела опухолей репродуктивных и мочевыводящих органов МНИОИ им. П.А. Герцена — ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

Authors:

Popov S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Clinical Urologist, Department of General Medical Practice, Medical Institute at the Russian Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Sturov N.V., PhD (Medicine), Head, Department of General Medical Practice, Medical Institute at the Russian Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Vorobyev N.V., PhD (Medicine), Head, Urology Unit, Department of Reproductive and Urological Malignancies, P. Herzen Research Institute of Oncology, National Medical Research Radiological Center, Moscow, Russian Federation

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

Поступила 28.12.2018
Отправлена на доработку 04.01.2019
Принята к печати 05.03.2019

Received 28.12.2018
Revision received 04.01.2019
Accepted 05.03.2019

ЗАВИСИМОЕ ОТ ЛЕКТИНОВ РАЗНООБРАЗИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ПРИРОДНЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК В КОММУНИКАЦИЯХ ПРОТИВ ОПУХОЛЕЙ И ВИРУСОВ

Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алёшкин В.А., Афанасьев С.С.

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Резюме. Популяции природных киллерных клеток человека (ППККЧ) против опухолей в присутствии вирусов оценены как сильно варьирующие и рано адаптированные к патологическим сигналам в организме, мобильные и избирательно действующие, способные к комбинированию агентов. ППККЧ осуществляют различные действия в результате кофункционирования рецепторных лектинов (РЛ), распознающих гликопаттерны (РЛ как триггеры, инициаторы и базисные агенты для надстроечных реакций), и Ig-подобных, цитотоксических и прочих вспомогательных коммуникативных и эффекторных рецепторов (роль РЛ как инструментов тонкой настройки мозаики поверхностноклеточных рецепторов в направлении необходимой функциональной ориентации ППККЧ), а также их лигандов (модуляторов созданных конечных рецепторных мозаик). Такие наученные и переобученные ППККЧ играют важную роль в перераспределении ППККЧ-индуцированных противоопухолевых и противовирусных цитокиновых наборов в организме. Межклеточный коммуникативный потенциал ППККЧ также учитывает другие клетки врожденного иммунитета и адаптированные для врожденного иммунитета клетки, что может служить перспективным и универсальным ресурсом защиты человека. ППККЧ должны учитываться при разработке новых маневренных и надежных, сбалансированных профилактических и иммунотерапевтических, противоопухолевых/противовирусных систем и вакцинных стратегий. Открыты пути к алгоритмам тонкой настройки (RL-KIR/NCR/CD/ их комбинации) РЛ-базисного конструирования веера противоопухолевых/противовирусных ППККЧ с дальнейшим потенциалом инициирования. Ключевую важность приобретает скрининг спектра ППККЧ у индивидуума и потенциального пациента для дополнительной оценки защитного статуса и выработки персонализированных коммуникативных противоопухолевых/противовирусных стратегий. Установленный статус NK (natural killers)-компартамента будет характеризовать резистентность индивидуума/контингента индивидуумов против вирусных инфекций эпидемиологической значимости, играть важную роль при оценке противоэпидемической защиты региона.

Ключевые слова: популяции киллерных клеток, рецепторные лектины, гликоконъюгаты, цитокины, врожденный иммунитет, мукозальный иммунитет, дисбиозы, пробиотические лектины, противоопухолевые стратегии, противовирусные стратегии

Адрес для переписки:

Лахтин Михаил Владимирович
ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.
Тел.: 8 (495) 452-18-16.
E-mail: info@gabrigh.com

Address for correspondence:

Lakhtin Mikhail V.
G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology
125212, Russian Federation, Moscow, Adm. Makarov str., 10.
Phone: 7 (495) 452-18-16.
E-mail: info@gabrigh.com

Образец цитирования:

М.В. Лахтин, В.М. Лахтин, В.А. Алёшкин, С.С. Афанасьев «Зависимое от лектинов разнообразие популяций природных киллерных клеток в коммуникациях против опухолей и вирусов» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 595-602. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-595-602
© Лахтин М.В. и соавт., 2019

For citation:

M.V. Lakhtin, V.M. Lakhtin, V.A. Alyoshkin, S.S. Afanasiev "Lectin-dependent diversity of natural killer populations and communications against tumors and viruses", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 595-602.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-595-602
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-595-602

LECTIN-DEPENDENT DIVERSITY OF NATURAL KILLER POPULATIONS AND COMMUNICATIONS AGAINST TUMORS AND VIRUSES

Lakhtin M.V., Lakhtin V.M., Alyoshkin V.A., Afanasiev S.S.

G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Response of human natural killer (NK) cell populations (NKP) against tumors in the presence of viruses was evaluated as a quite variable, early adapting for the pathological signals in organism, mobile and selective combination agents. NKP act as a result of co-functioning between the receptor lectins (RL) recognizing glycopatterns (RL as triggers, initiators and basic agents for coupled activities), and Ig-like, cytotoxic and other additional communicative and effector receptors (superstructural, tuning for achievement of final effector-type NKP constructions required), and their ligands (modulators of final cell surface receptor mosaics). Such NKP created play important role in redistribution of NKP-induced antitumor/antiviral cytokines in organism. Intercellular communicative potential of NKP also involves other innate and innate-like cells. Such extended communications of NKP provide a prospective and universal resource of human protection. NKP must be under consideration upon development of new manoeuvre and reliable prophylactic and immunotherapeutic antitumor/antiviral systems and vaccine strategies. The ways for the fine tuning (RL-KIR/NCR/CD/their combinations) algorithms of RL-based creation of antitumor/antiviral NKP are revealed. Key role is given to screening spectrum of patient NKP for development of communicative anticancer/antiviral strategies. The status of NK compartment will characterize resistance of individuum/contingent of individuaums to viral infections of epidemiological significance, will play important role in anti-epidemic protection of regional population.

Keywords: NK cells, NK cell populations, receptor lectins, glycoconjugates, cytokines, innate immunity, mucosal immunity, dysbioses, probiotic lectins, antitumor strategies, antiviral strategies

During last few years the interest of investigators with respect of innate immunity cell populations was significantly increased [2, 13, 16, 30]. NK (natural killers) compartment of innate immunity plays important role especially in childhood when formation of antibody immunity takes place [4, 28]. Receptor lectins (RL) recognizing carbohydrates, glycoconjugates (GC) or glycopatterns play important roles in immunity [1, 2]. There are notable cases of tumors which are influencing by viral infections. Up to 2% of world tumor diseases involve the presence of Epstein–Barr virus (EBV), functionally coupled to EBV infection [31]. However, the role of cell NK-populations (NKP) in connection to tumor processes accompanied with viral infections is still scantily explored.

The present overview evaluates key potential of lectin NKP against tumors which are under influence by infectious viruses (also viruses of epidemiological significance).

Viruses and tumors (which are functionally coupled to viruses; tumors under influencing by viruses)

There are limited number of examples of viral infections studied in accepted in review aspect: arenaviruses (lymphocyte virus of choriomeningitis, LCMV), herpesviruses (cytomegalovirus, CMV, in connection to acute leukemia and B cell lymphomas; EBV, in connection to mononucleoses and Burkitt lymphomas [6, 31], papovaviruses (human papilloma virus, HPV; in connection to cervical cancer), poxviruses (the viruses of smallpox cows and

mice, orthopoxvirus of smallpox, VACV) [16, 30], retroviruses (human immunodeficiency virus, HIV-1; in connection to lymphomas), flaviviruses (hepatitis-C-virus, HCV; in connection to hepatocellular carcinomas, HCC); hepatitis-B-virus [HBV] and hepatitis- δ -virus [HDV]) [26].

Diversity of NK cells and NKP

Subfamily of lectin NKG2-receptors reveals transmembrane glycoproteins of type II which are encoded in human chromosome 12. Genes CD94 and NKG2 are observed within gene cluster 12p12-p13 participating in functioning heterodimeric CD94NKG2-receptors and coding lectin extracellular and cytoplasmic domains for initiation of communications of NK cells and sets of T cell populations. NKG2D-receptors are expressed on protective human cells including NK cells, NK-T cells (NKT), subpopulations of $\gamma\delta$ -T cells, activated CD8⁺ T cells (the latter as cofunctioning to human complement system), some autoreactive CD4⁺ T cells [18, 24, 49]. Initiation of organism responses against tumors and viruses involves MHC-class-I-molecules of myeloid cells, monocytes and NK cells. NK cells possessing NKG2-receptors are represented by lectin cell populations NKG2A⁺/B⁺/C⁺/D⁺/E⁺/H⁺: A⁺/B⁺, D⁺ – inhibitors of intercellular pathways (also through ITIM-motifs in RL influencing SHP-1-Tyr-phosphatase); C⁺, F⁺, E⁺/H⁺-activators of other intercellular pathways (also through ITAM-carrying adaptor proteins DAP-12 or

DAP-10, also signaling through protein-Tyr-kinase depending pathways) [1, 8, 10, 13, 30].

Diversity of lectin NKP is influenced by not only combinations of co-expression of genes NKG2, KIR (killer Ig-like receptors), NKp (natural cytotoxic receptors, NCR) and CD on cells, but also by varying phenotypes of interacted molecules (also within di- and oligomeric homo/heterostructures such as CD94NKG, tetrameric HLA-E) and genetic variants of RL (multiallelic like NKG2C1/2/3; phenotype NKG2E as two alternatively splicing forms NKG2E and NKG2H [30]); upon constructing genetic chimeric products (truncated [like NKG2Ce – C-terminal limited form – NKG2C3]; extracellular, transmembrane and cytoplasmic/intracellular domains of RL [like NKG2F expressing as intracellular form], products of genetic map contacts like CD94-NKG2, others) [10, 30, 46, 47].

Ontogenesis of NKP contributes to their diversity. Development of NK cells from common lymphoid ancestor passes few steps. Appearance of CD122 (β -chain of receptor of IL-15) indicates the beginning of differentiation of ancestor in direction of NK cell forming. NK cell development is accompanied with progressive exhibition of CD161; CD56, CD94/NKG2A, NKp46 (NCR1, CD335), NKp44 (NCR2, CD336); NKG2D (expressed on all human NK cells, participate in Cross-Talk between innate immunity lymphoid and myeloid cells [41, 48]); and finally CD16 and KIR [24]. An increase of CD56^{dim} NK cells (mainly observed in the CD16⁺ subsets) was registered when synbiotic induces response of human to viral infection (on example of influenza virus) [37]. Among aforementioned steps of NK cell development, the last steps are characterized with appearance of CD56^{bright} or CD56^{dim}. CD56^{bright} NKP is characterized with high level of expression of CD94. CD56^{dim} NK cells represent KIR and CD16 populations as mostly mature ones and transforming into cytotoxic cells which are become terminally differentiated and express CD57.

NKG2-receptors also occur among varying populations of T-lymphocytes that simplify communicative Cross-Talk cofunctioning NKP and cytotoxic T lymphocytes in direction NK cells – T cells [10, 23]. NKG2H is expressed on small part of periphery blood monocytes but, in more extent, are revealed on T cells stimulated with anti-CD3-antibodies [10].

Expression of RL and distribution of RL types between NKP are influenced by current status of organism (heredity, age, gender, state of immune system, the presence of pathologic processes, viral infection and tumor types, others) [7, 9, 37, 42].

In modulation of HLA-class-I participate preferentially receptors NKG2 and KIR and their ligands [30, 49]. Signals, induced upon interactions between receptors CD94⁺NKG2⁺/KIR⁺ and MHC-class-I-glycoproteins in response of appearance of anormal pattern ligands, redistribute activities of NKP. Realization of NK cell memory is genetically determined. Genome is characterized with moderate

diversity of genes NKG2 against the background of increased diversity of genes of KIR [46]. Polymorphism of gene NKG2D provides modulation of NK cell cytotoxicity. It is of importance for example in connection to organism sensitivity to HPV-induced cancer [12]. In whole, in case of human development of limited immunological functions of the system MHC-E/NKG2 progresses against the background of broadening of functions of the system MHC-I/KIR [46]. Elevated HLA-A expression provides enhanced levels of an HLA-A-derived signal peptide that influence expression of HLA-E (the ligand for the inhibitory NKG2A) [39]. HLA-B haplotypes, in their turn, support NKG2A-mediated NK cell licensing/education (NKG2A-mediated inhibition impairing NK cell clearance of HIV-infected targets). As a result, therapeutic blockade of interaction between HLA-E and NKG2A may help in treatment of HIV disease. [39]. In cells infected with viruses (as in case of CMV) expression of HLA-class-I is strongly decreased involving KIR, while expression of HLA-E (can be as a ligand for RL) is more resistant and supported with activator NKG2-receptors [9, 10, 30, 46].

NKP (and their combinations together with other type protective cell populations of Cross-Talk) are functionally and significantly different and directed towards different viral and cell targets. There is mammal intraspecie accordance within NKP (accordance to final tuning panels of lectin and other type receptors). For examples, it is observed a specie adequacy of interaction of murine lectin Ly49H⁺ NKP against murine CMV [30], lectin NKP of human or macaques depending on HIV-1 or SIV (simian immunodeficiency virus), respectively [46]. Age dependent differentiation of NK cells is observed [24]. Expression levels of CD94⁺NKG2C⁻/NKG2A⁺, NKG2D, NKp30 (NCR3, CD337) and NKp46 at NK cells are decreased upon age increase [35, 42]. There are differences between phenotypes of NKP in connection to gender [35]. Systems of RL and RL-exposing NK cells and other myeloid cells (monocytes and macrophages) vary depending on age [4, 7, 24, 30, 35, 42]. NKP are determined with not only compositions of lectin, Ig-like, cytotoxic and other receptors markers (NKG2, KIR, NKp and CD), but also by their relative compactness/density (on cells and within NKP), developmental stages, maturity states (the level of differentiation and cytotoxicity).

CD – additional indicators within NKP

CD cofunction to RL of both individual NK cells and within compositions of interacting RL of NKP in combinations of CD is identified as combinative markers of NKP [1, 2].

Below some key CD are presented.

*CD3 and CD20 (markers of T and B cells) – their absence on NK cells.

*CD11b⁻CD27⁺; CD11b⁻CD27⁺ – markers of decreased level of differentiation of NK cells (the presence of immature forms) [16].

*CD56^{bright}NKG2C⁺ population which is capable to expansion in CMV-seropositive individuals; cells

reveal inhibiting Ig-like RL (KIR and leukocyte Ig-like receptor [LILRB1]) which are specific to HLA-class-I-molecules against the background of low levels of activating receptors NKp46 and NKp30 [30]; CD56^{bright} – marker of immature NK cells (more than 90% NK cells capable for further adaptation to converse into mature forms [8]); CD56^{bright} NKP express chemokine receptors CCR1, CCR5 and CCR6, which are involved in intercellular Cross-Talk depending on inflammation [23].

*CD56^{dim}/CD57⁺NKG2C⁺ populations were found in lymphoma patient [8, 32]; NKP of males are characterized with increased frequencies of CD56^{dim} and CD57⁺ [35]; CD56^{dim} populations express CD94NKG2A⁺ or co-express CD94NKG2C⁺ and KIR⁺ [8].

*CD57 – marker of terminally differentiation of NK cells [34].

*CD57⁺⁺NKG2C⁺CD56^{dim} (terminally differentiated NK cells); NKP extensively proliferate in response to ligation of receptor [23].

*CD69 – marker of activation of NK cell differentiation [16].

*CD94⁺NKG2⁺ – synergistical cofunctioning NKP CD94/NKG2A and CD94/NKG2C [8, 24, 30], CD94 – important factor of antiviral protection [8, 30, 34, 46].

*CD94⁺NKG2A⁺, NKG2D⁺ and NKp46⁺ as cofunctioning populations of NKP [24, 41].

*CD158a, CD158b – markers of restoration and increase of NKP producing perforin together with granzymes [21].

*CD161 (C-type lectin receptor [CLR] expressed on the majority of NK cells) defines a functionally distinct subset of pro-inflammatory NKP; reduced CD161 expression in acute HCV infection (as a result of viral clearance); blocking LIT1 (CLEC2D, OCIL)-NKRPIA (CD161) interaction enhances natural killer cell-mediated lysis of triple-negative breast cancer cells [22, 27].

Cytokines and NKP

Antitumor action of innate immunity is realized through modulation of production and delivery of panels of cytokines needed in tumor localizations within organism (as in cases of NKP- and CD8⁺ T cells inducing cytotoxicities). Antitumor NK-production of IFN γ [4, 13, 14, 17, 19, 24, 32, 37] or TNF α [13, 24, 32] are induced. Control of NK cells materialized by IL-2, IL-5, IL-12, IL-13, IL-15 and IL-18 [13, 24, 33] and involves participation of colonie-stimulating factor (CSF-1) [43]. IL-15 reveals domination in NK cell maturation, differentiation and survival; potentiates cytotoxicity of NKG2-populations [4, 24, 33]. Transforming growth factor (TGF- β) of tumor origin influences suppression of NKP functions [7, 47]. CSF-1 induces on infiltrating tumor macrophages the appearance of specific ligand RAE-1-delta – regulator of NKG2D-populations [43].

Capability of NKP to produce cytokines is associated with steps of development of NK cells. TNF α is produced by NK cells during their differentiation while IFN γ is produced later (against

the background of CD56 expression and decrease of production of IL-5 and IL-13 [24]. CD56^{bright} NKP effectively produces cytokines in responses to stimuli. CD56^{bright} NK cells secrete little IFN γ compared to CD56^{dim} NK cells [24, 23]. CD56^{dim} NK cells are the earliest and dominant IFN γ ⁺ cells in responses to activating receptor ligation [23].

Cytotoxic factors of NKP

As a result of phenotype NKP-transformations into cytotoxic cell populations, granzymes A, B, K, perforin and other antitumor agents are released [4, 16, 21]. These factors are systemly opposite to separate tumor factors (lactatedehydrogenases, TGF- β , CSF-1, or others) [7, 43, 47]. CD56^{bright} NK cells are poorly cytotoxic, and CD56^{dim} NK cells are highly cytotoxic (lyse virus-infected and tumor cell lines) [23].

NKP possessing antitumor/antiviral activities

(*NKP; tumor targets coupled to viral infections; effects of NKP).

*NKG2A⁺ from healthy donors (HLA-C1⁺C2⁺Bw4⁺) and activated with IL-2; multiple myeloma cells, K562 cells; addition of daratumumab, an anti-CD38 to trigger antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, improved the antitumor response for all subsets of NKP [25].

*NKG2A⁺; immunodeficient mice, co-infused with human primary leukemia or EBV cell lines and NKG2A⁺ NKP; animals pre-treated with anti-human NKG2A were rescued from disease progression [40].

*NKG2A⁺CD56^{bright}; “humanized” murine B cell lymphoma; release of IFN-gamma by NKP, cooperation to NKp44-receptors for inhibition of B cell transformation coupled to EBV [19].

*NKG2A⁺; population is stronger expressed in the presence of VACV [16].

*NKG2A⁺ against EBV [8].

*NKG2A⁺KIR⁺; populations influence lytic EBV-replication [31].

*NKG2C⁺; U266 (human multiple myeloma cells) from CMV-seropositive donors, K562 (human leukemia cells); stimulation of population expansion within organism [4, 9], the presence of latent CMV in healthy donors results in increasing NK-cytotoxicity [4].

*NKG2C⁺CD57⁺; lymphomas; expansion of population in response to CMV [34].

*NKG2C⁺CD57⁺⁺; primary CMV infection or reactivation (CD161 expression on these cells is reduced) [22].

*NKG2C⁺ (mainly); murine lymphoma; the action of population after allogenic transplantation depended of the presence of CMV [33].

*NKG2C⁺; antitumor use of ligands for NKG2C [38].

*NKG2C⁺; CMV-infected endothelial cells; the character of modulation of population depends on type of CMV-infected cells [9].

*NKG2C⁺NKG2A⁺; 221.AEH (transfected HLA-E⁺ cells of human lymphoma); NK-cytotoxicity is 3 times higher than in case of non-transfected cells,

221.AEH and IL-15 help for population expansion within organism [4, 38].

*NKG2C⁺CD94⁺; Burkitt lymphoma; population participates in protective cooperation to $\gamma\delta$ -T cells [8].

*NKG2C⁺NKG2A⁺KIR⁺; co-infection EBV and CMV; stimulation of NKP [8].

*NKG2C⁺CD56^{dim}/CD57⁺ (mature, cytotoxic); leukemic T cell lymphoma; after blood transplantation and reactivation of CMV, population in 2 years is increased up to 33% of all lymphocytes; produce TNF α and IFN γ against leukemia T cell lymphoma cells [32].

*NKG2D⁺; patients with anogenital cancer (HPV is detected); increase of NKG2D-modulated cytotoxicity, decrease of sensitivity to cancer [12]; in humans, only the NKG2D-L isoform is expressed (receptor exclusively signals through DAP-10) [48]; NKG2D receptor is equally expressed by CD56^{bright} and CD56^{dim} cells and is able to synergistically activate human NK cells when they were simultaneously stimulated through CD16, Nkp46 and 2B4 [23].

*NKG2D⁺; patients with HCV-induced HCC; increase of NKG2D expression on monocytes upon action using ligands for NKG2D [7].

NKG2D⁺ (NK92 – chimeric TN cells); xenografts of HCV-induced HCC; population expressing NKG2D, producing IFN γ and effective against TGF- β -producing tumor cells [47].

Aformentioned data indicate that mostly significant and studied NKP are mainly characterized such RL as multifunctional NKG2A⁺, NKG2C⁺ and NKG2D⁺. They act as glycoproteins recognizing agents, initiators (in reactions of modulation/choice/switching pathways of intercellular communications) and as the basis for further NK cell education (increasing selectivity in intercellular chain action towards final target when additional steps of current NK cell development through additional tuning receptors is needed). There are known other combination of receptors within NKP [8, 10, 23, 25, 42, 46, 48]. In whole, set of NKP acts as a network (at the levels of: own NKP spectrum; NKP in combinations with DC [according to NK-DC Cross-Talk], monocytes, macrophages and other innate immunity cells [innate like cells]; or NKP Cross-Talking to T and B cell populations of antibodies-producing system) within total protective network of organism.

Strategies using antitumor NKP

Protective NKP are synergistic together with other protective cells (CD8⁺ T cells, blood cells, macrophages, DC) and supercellular immunity systems. Accumulation and expansion of antitumor/antiviral circulating monocytes into extended surroundings in organism are important for further their delivery to tumor/tumor microenvironment (infiltration of tumor space with selected NKP is achieved).

Multifunctionality of silent inclusions into human genome is still lowly studied as in case of inclusions similar to retroviral type (around 8% of repeats in human genome [15]. There are cases of close co-localization of some protective genes together with

silent gene regions (for example, human complement subcomponents of C4B interacting to GC) that can provide their cofunctioning in directions needed [15]. As expected events of such protection, initiation and prolongation of the presence of specific control/supervisor spectra of NKP holding back viral (for extended panel of viruses) expansion in organism could be taken place. For example, there are known latent CMV-infections (for CMV-seropositive healthy contingents of individuals. Besides, more than 90% of adults are characterized with asymptomatic EBV [6]. Thus, the status of NK compartment characterizes resistance of individual (contingent of individuals) to viral infections, plays important role in anti-epidemic protection of the region population. More over, adaptive repertoire of prophylactical and therapeutic varying NKP opens the prospects of their applications against active epidemiologically significant viral infections as well as against initiations and progressive developments of of tumors.

NKG2-receptors and their ligands form metabolic supervisor axis of communications between lymphoid and myeloid immune cells; co-stimulate cytotoxic Nkp46-receptors of NK cells and cytotoxic receptors of T cells (NKG2D [CD314] and Nkp46 [CD335] as functionally coupled receptors [44]); induce sets of antitumor/antiviral cytokines; support proliferation and survival of effector cells [41]. It may be used upon search the ways and strategies of fight against tumors (also through antiviral action). As a result, increase of a number of effective NK cells and NKP and their intratumor-tissue expansion (expansion of needed NK cell types and complex NKP combinations) take place [8, 11, 13, 30]. Actions of NKP are in the synergistic accordance to protective actions of the complement system [18].

Below some perspective possibilities of using NKP are presented.

*NKG2⁺ populations for creation of new antiviral strategies (as in cases of HIV-1) [34, 46].

*Directed using NKG2D⁺ populations against tumors through NKG2D-receptors of NK cells which perform on duty monitoring of revealing/initiation of tumor cell ligands (tumor indicators) on stress cells [7, 11]. During these events the cells exposing NKG2D-ligands (as in case of superexpressed complexes on intestinal mucosal stress cells) are recognized and eliminated by supervising cells that is in final result may be directed in prevention of carcinogenesis as in case of rectum cancer [11].

*CD56^{bright}NKG2A⁺ population in correction of EBV-associated lymphomas [19].

*Therapy of acute lymphoblast leukemia by recovery and expansion of NKP followed by expression of CD158a, CD158b, perforin and granzyme K [21].

*Using blood transplantation of therapeutic NKP (NKP selected from healthy donors can be additionally activated with IL-2) against hematological tumors for; eradication of cancer cells (there are known phase I/II clinical trials of adoptive infusion of either selected or ex vivo-activated NKP from family or non-family donors) [25, 29, 33].

*Directed regulation of NKP type needed in special interactions involving adaptor DAP-12 or DAP-10 [10, 30, 38, 48].

*Using NKP on the basis of ortologs and paralogs of mammals for therapy [46].

*Constructing and application of antitumor genetically modified chimeric NKP such as CAR-T cells (forexample, expressed chimeric receptor TN including extracellular and transmembrane domains of TGF- β -type-II-receptor and intracellular domain of activator NK cell receptor NKG2D [47]).

*Soluble lectins as ligands for RL-exposing NK cells (on example of CD161) wich are become to increase lysis of cancer cells [27].

Synbiotics (as in case of *Bifidobacterium longum* bv. *infantis* CCUG 52486 plus gluco-oligosaccharide) influence NKP responses to viral infections that can be of vaccine aspect significance [37]. Probiotic cell surface proteins (adhesins, factors of aggregation, ensemble proteins, mucin- and peptidoglycan-binding, lectins, other lectin-like ligands) are capable to increase human antiinfectious potential of NKP of mucosal immunity [5, 36]. Prophylactic and therapeutic possibilities of prevention of transformation of dysbiotic states of human open cavity mucosal biotopes into tumor states are new and of great potential (for example, with participation of activator DDR-pathway (DNA damage response) of the system NKG2D/NKG2D-ligands of NKP; or action of system probiotic lectins (PL) imitating probiotics and possessing cytokines-like activities [3, 11, 12]. As upon microbial-viral dysbioses PL can be selectively directed to relative pathogens (also changed microorganisms during prolonged inflammation) and can carry out functions of probiotics when probiotics and probiotic like microflora is absent in pathological biotopes against the background the presence of HPV – potential inducers of vaginal cancer, it is

possible to expect anticancer/antiviral synergism between PL (as ligands for RL, agents cofunctioning to enzymes) and NKG2D-depended cytotoxicity decreasing sensitivity to cancer [11, 12, 45].

RL (on example of NKG2D) act like multipotent key messengers (after HLA-A/B/E-signalling [39]) recognizing panels of GC-pattern-targets ordered/ ranked on RL-specificity/affinity and availability/ minimal distance as in case of NK cell surface receptor mosaics [20]. Extended panels of receptors of NK cell surface are perspective for RL-depended directed sequential tuning (RL-KIR/NCR/CD/ their combinations) to initiate further support and enhancement of human antitumor/antiviral protection.

Conclusion

The controlled influence of network of NKP containing dynamic panels of lectin, Ig-like, cytotoxic and known CD-receptors and receptor ligands takes place in organism. It is of reason to perform preliminary diagnostics of patient current spektrum of some key types of NKP to create the mostly acceptable immunotherapeutic strategies for antitumor/antiviral treatments (infusions of NKP, the use of special constructs of chimeric NKP). It seems, diversity and ordering of protective NKP impair active destructive actions of epidemiologically significant viruses all over the organism, hold back and prophylactically prevent initiation or further progression of tumors. The data indicate new potential and new resources in development of new antitumor/antiviral and vaccine preparations and strategies. In this context, PL will serve perspective ligands cofunctioning to the NKP network.

Список литературы / References

1. Лактин М.В., Лактин В.М., Алёшкин В.А., Афанасьев М.С., Афанасьев С.С. Лектины в антираковых стратегиях // *Acta Biomedica Scientifica*, 2018. Т. 3, № 4. С. 69-77. [Lakhtin M.V., Lakhtin V.M., Alyoshkin V.A., Afanasiev M.S., Afanasiev S.S. Lectins in anticancer strategies. *Acta Biomedica Scientifica*, 2018, Vol. 3, no. 4, pp. 69-77. (In Russ.)]
2. Лактин М.В., Лактин В.М., Алёшкин В.А., Афанасьев С.С. Лектиновые рецепторы в коммуникациях // *News of Science and Education*, 2018. Т. 2, № 3. С. 76-98. [Lakhtin M.V., Lakhtin V.M., Alyoshkin V.A., Afanasiev S.S. Lectin receptors in communications. *News of Science and Education*, 2018, Vol. 2, no. 3, pp. 76-98. (In Russ.)]
3. Лактин М.В., Лактин В.М., Афанасьев С.С., Байракова А.Л., Алёшкин В.А., Афанасьев М.С. Кандидные маркеры болезней урогенитальных биотопов: реактивность к лектинам пробиотиков // *Acta Biomedica Scientifica*, 2018. Т. 3, № 1. С. 49-53. [Lakhtin M.V., Lakhtin V.M., Afanasiev S.S., Bayrakova A.L., Aleshkin V.A., Afanasiev M.S. *Candida* markers of diseases of urogenital biotopes: Reactivity to lectins of probiotics. *Acta Biomedica Scientifica*, 2018, Vol. 3, no. 1, pp. 49-53. (In Russ.)]
4. Bigley A.B., Rezvani K., Shah N., Sekine T., Balneger N., Pistillo M., Agha N., Kunz H., O'Connor D.P., Bollard C.M., Simpson R.J. Latent cytomegalovirus infection enhances anti-tumour cytotoxicity through accumulation of NKG2C⁺ NK cells in healthy humans. *Clin. Exp. Immunol.*, 2016, Vol. 185, no. 2, pp. 239-251.
5. do Carmo F.L.R., Rabah H., de Oliveira Carvalho R.D., Gaucher F., Cordeiro B.F., da Silva S.H., le Loir Y., Azevedo V., Jan G. Extractable bacterial surface proteins in probiotic-host interaction. *Front. Microbiol.*, 2018, Vol. 9, p. 645.
6. Chijioke O., Landtwin V., Münz C. NK cell influence on the outcome of primary Epstein–Barr virus infection. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 323.
7. Crane C.A., Austgen K., Habether K., Hofmann C., Moyes K.W., Avanesyan L., Fong L., Campbell M.J., Cooper S., Oakes S.A., Parsa A.T., Lanier L.L. Immune evasion mediated by tumor-derived lactate dehydrogenase induction of NKG2D ligands on myeloid cells in glioblastoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, no. 35, pp. 12823-12828.

8. Djaoud Z., Guethlein L.A., Horowitz A., Azzi T., Nemat-Gorgani N., Olive D., Nadal D., Norman P.J., Münz C., Parham P. Two alternate strategies for innate immunity to Epstein–Barr virus: One using NK cells and the other NK cells and gamma-delta T cells. *J. Exp. Med.*, 2017, Vol. 214, no. 6, pp. 1827–1841.
9. Djaoud Z., Riou R., Gavlovsky P.J., Mehral S., Bressollette C., Gérard N., Gagne K., Charreau B., Retière C. Cytomegalovirus-infected primary endothelial cells trigger NKG2C⁺ natural killer cells. *J. Innate Immun.*, 2016, Vol. 8, no. 4, pp. 374–385.
10. Dukovska D., Fernández-Soto D., Valés-Gómez M., Reyburn H.T. NKG2H-expressing T cells negatively regulate immune responses. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, p. 390.
11. Espinoza J.L., Minami M. Sensing bacterial-induced DNA damaging effects via natural killer group 2 member D immune receptor: From dysbiosis to autoimmunity and carcinogenesis. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, p. 52.
12. Espinoza J.L., Nguyen V.H., Ichimura H., Pham T.T., Nguyen C.H., Pham T.V., Elbadry M.I., Yoshioka K., Tanaka J., Trung L.Q., Takami A., Nakao S. A functional polymorphism in the NKG2D gene modulates NK-cell cytotoxicity and is associated with susceptibility to Human Papilloma Virus-related cancers. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 39231. doi: 10.1038/srep39231.
13. Fehniger T.A., Cooper M.A. Harnessing NK cell memory for cancer immunotherapy. *Trends Immunol.*, 2016, Vol. 37, no. 12, pp. 877–888.
14. Georgountzou A., Papadopoulos N.G. Postnatal innate immune development: From birth to adulthood. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 957. doi: 10.3389/fimmu.2017.00957.
15. Grandi N., Cadeddu M., Pisano M.P., Esposito F., Blomberg J., Tramontano E. Identification of a novel HERV-K(HML10): Comprehensive characterization and comparative analysis in non-human primates provide insights about HML10 proviruses structure and diffusion. *Mob. DNA*, 2017, Vol. 8, p. 15.
16. Hatfield S.D., Daniels K.A., O'Donnell C.L., Waggoner S.N., Welsh R.M. Weak vaccinia virus-induced NK cell regulation of CD4 T cells is associated with reduced NK cell differentiation and cytolytic activity. *Virology*, 2018, Vol. 519, pp. 131–144.
17. Heiberg I.L., Pallett L.J., Winther T.N., Høgh B., Maini M.K., Peppas D. Defective natural killer cell anti-viral capacity in paediatric HBV infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 2015, Vol. 179, no. 3, pp. 466–476.
18. Janelle V., Langlois M.P., Tarrab E., Lapiere P., Poliquin L., Lamarre A. Transient complement inhibition promotes a tumor-specific immune response through the implication of natural killer cells. *Cancer Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2, no. 3, pp. 200–206.
19. Jud A., Kotur M., Berger C., Gysin C., Nadal D., Lünemann A. Tonsillar CD56^{bright}NKG2A⁺ NK cells restrict primary Epstein–Barr virus infection in B cells via IFN-gamma. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 4, pp. 6130–6141.
20. Keydar Y., le Saux G., Pandey A., Avishay E., Bar-Hanin N., Esti T., Bhingardive V., Hadad U., Porgador A., Schwartzman M. Natural killer cells' immune response requires a minimal nanoscale distribution of activating antigens. *Nanoscale*, 2018, Vol. 10, no. 30, pp. 14651–14659.
21. Koltan S., Debski R., Koltan A., Grzesek E., Tejza B., Eljaszewicz A., Gackowska L., Kubicka M., Kolodziej B., Kurylo-Rafinska B., Kubiszewska I., Wiese M., Januszewska M., Michalkiewicz J., Wysocki M., Styczynski J., Grzesek G. Phenotype of NK cells determined on the basis of selected immunological parameters in children treated due to acute lymphoblastic leukemia. *Medicine (Baltimore)*, 2015, Vol. 94, no. 52, e2369. doi: 10.1097/MD.0000000000002369.
22. Kurioka A., Cosgrove C., Simoni Y., van Wilgenburg B., Geremia A., Björkander S., Sverremark-Ekström E., Thurnheer C., Günthard H.F., Khanna N., Walker L.J., Arancibia-Carcamo C.V., Newell E.W., Willberg C.B., Klennerman P. CD161 defines a functionally distinct subset of pro-inflammatory natural killer cells. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 486. doi: 10.3389/fimmu.2018.00486.
23. Kurioka A., Klennerman P., Willberg C.B. Innate-like CD8⁺ T-cells and NK cells: converging functions and phenotypes. *Immunology*, 2018. doi: 10.1111/imm.12925.
24. Mahapatra S., Mace E.M., Minard C.G., Forbes L.R., Vargas-Hernandez A., Duryea T.K., Makedonas G., Banerjee P.P., Shearer W.T., Orange J.S. High-resolution phenotyping identifies NK cell subsets that distinguish healthy children from adults. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 8, e0181134. doi: 10.1371/journal.pone.0181134.
25. Mahaweni N.M., Ehlers F.A.I., Sarkar S., Janssen J.W.H., Tilanus M.G.J., Bos G.M.J., Wieten L. NKG2A expression is not *per se* detrimental for the anti-multiple myeloma activity of activated natural killer cells in an *in vitro* system mimicking the tumor microenvironment. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1415. doi: 10.3389/fimmu.2018.01415.
26. Malone D.F.G., Lunemann S., Hengst J., Ljunggren H.G., Manns M.P., Sandberg J.K., Cornberg M., Wedemeyer H., Björkström N.K. Cytomegalovirus-driven adaptive-like natural killer cell expansions are unaffected by concurrent chronic hepatitis virus infections. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 525. doi: 10.3389/fimmu.2017.00525.
27. Marrufo A.M., Mathew S.O., Chaudhary P., Malaer J.D., Vishwanatha J.K., Mathew P.A. Blocking LLT1 (CLEC2D, OCIL)-NKR1A (CD161) interaction enhances natural killer cell-mediated lysis of triple-negative breast cancer cells. *Am. J. Cancer Res.*, 2018, Vol. 8, no. 6, pp. 1050–1063.
28. Martinez D.R., Permar S.R., Fouda G.G. Contrasting adult and infant immune responses to HIV infection and vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2015, Vol. 23, no. 2, pp. 84–94.
29. Mavers M., Bertina A. High-risk leukemia: Past, present, and future role of NK cells. *J. Immunol. Res.*, 2018. Vol. 2018, 1586905. doi: 10.1155/2018/1586905.
30. Muntasell A., Vilches C., Angulo A., López-Botet M. Adaptive reconfiguration of the human NK-cell compartment in response to cytomegalovirus: A different perspective of the host-pathogen interaction. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, no. 5, pp. 1133–1141.
31. Münz C. Epstein–Barr virus-specific immune control by innate lymphocytes. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1658. doi: 10.3389/fimmu.2017.01658.
32. Muta T., Yoshihiro T., Jinnouchi F., Aoki K., Kochi Y., Shima T., Takenaka K., Ogawa R., Akashi K., Oshima K. Expansion of NKG2C-expressing natural killer cells after umbilical cord blood transplantation in a patient with peripheral T-cell lymphoma with cytotoxic molecules. *Intern. Med.*, 2018, Vol. 57, no. 6, pp. 861–866.

33. Peled J.U., Jenq R.R. Not just leukemia: CMV may protect against lymphoma recurrence after allogeneic transplant. *Leuk. Lymphoma*, 2017, Vol. 58, no. 4, pp. 759-761.
34. Peppas D. Natural killer cells in human immunodeficiency virus-1 infection: Spotlight on the impact of human cytomegalovirus. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1322. doi: 10.3389/fimmu.2017.01322.
35. Phan M.T., Chun S., Kim S.H., Ali A.K., Lee S.H., Kim S., Kim S.H., Cho D. Natural killer cell subsets and receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of a healthy Korean population: Reference range, influence of age and sex, and correlation between NK cell receptors and cytotoxicity. *Hum. Immunol.*, 2017, Vol. 78, no. 2, pp. 103-112.
36. Prado Acosta M., Ruzal S.M., Cordo S.M. S-layer proteins from *Lactobacillus* sp. inhibit bacterial infection by blockage of DC-SIGN cell receptor. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, Vol. 92, pp. 998-1005.
37. Przemska-Kosicka A., Childs C.E., Maidens C., Dong H., Todd S., Gosney M.A., Tuohy K.M., Yaqoob P. Age-related changes in the natural killer cell response to seasonal influenza vaccination are not influenced by a synbiotic: A randomised controlled trial. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 591. doi: 10.3389/fimmu.2018.00591.
38. Pupuleku A., Costa-García M., Farré D., Hengel H., Angulo A., Muntasell A., López-Botet M. Elusive role of the CD94/NKG2C NK cell receptor in the response to cytomegalovirus: Novel experimental observations in a reporter cell system. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1317. doi: 10.3389/fimmu.2017.01317.
39. Ramsuran V., Naranbhai V., Horowitz A., Qi Y., Martin M.P., Yuki Y., Gao X., Walker-Sperling V., del Prete G.Q., Schneider D.K., Lifson J.D., Fellay J., Deeks S.G., Martin J.N., Goedert J.J., Wolinsky S.M., Michael N.L., Kirk G.D., Buchbinder S., Haas D., Ndung'u T., Goulder P., Parham P., Walker B.D., Carlson J.M., Carrington M. Elevated HLA-A expression impairs HIV control through inhibition of NKG2A-expressing cells. *Science*, 2018, Vol. 359, no. 6371, pp. 86-90.
40. Ruggeri L., Urbani E., André P., Mancusi A., Tosti A., Topini F., Bléry M., Animobono L., Romagné F., Wagtmann N., Velardi A. Effects of anti-NKG2A antibody administration on leukemia and normal hematopoietic cells. *Haematologica*, 2016, Vol. 101, no. 5, pp. 626-633.
41. Stojanovic A., Correia M.P., Cerwenka A. The NKG2D/NKG2DL axis in the crosstalk between lymphoid and myeloid cells in health and disease. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 827. doi: 10.3389/fimmu.2018.00827.
42. Sundström Y., Nilsson C., Lilja G., Kärre K., Troye-Blomberg M., Berg L. The expression of human natural killer cell receptors in early life. *Scand. J. Immunol.*, 2007, Vol. 66, no. 2-3, pp. 335-344.
43. Thompson T.W., Jackson B.T., Li P.J., Wang J., Kim A.B., Huang K.T.H., Zhang L., Raulet D.H. Tumor-derived CSF-1 induces the NKG2D ligand RAE-1- δ on tumor-infiltrating macrophages. *Elife*, 2018, Vol. 7, pii: e32919. doi: 10.7554/eLife.32919.
44. Uemura Y., Isobe Y., Uchida A., Asano J., Nishio Y., Sakai H., Hoshikawa M., Takagi M., Nakamura N., Miura I. Expression of activating natural killer-cell receptors is a hallmark of the innate-like T-cell neoplasm in peripheral T-cell lymphomas. *Cancer Sci.*, 2018, Vol. 109, no. 4, pp. 1254-1262.
45. Uppendahl L.D., Dahl C.M., Miller J.S., Felices M., Geller M.A. Natural killer cell-based immunotherapy in gynecologic malignancy: A review. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 8, 1825. doi: 10.3389/fimmu.2017.01825.
46. Walter L., Petersen B. Diversification of both KIR and NKG2 natural killer cell receptor genes in macaques – implications for highly complex MHC-dependent regulation of natural killer cells. *Immunology*, 2017, Vol. 150, no. 2, pp. 139-145.
47. Wang Z., Guo L., Song Y., Zhang Y., Lin D., Hu B., Mei Y., Sandikin D., Liu H. Augmented anti-tumor activity of NK-92 cells expressing chimeric receptors of TGF- β -R II and NKG2D. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2017, Vol. 66, no. 4, pp. 537-548.
48. Wensveen F.M., Jelenčić V., Polić B. NKG2D: A master regulator of immune cell responsiveness. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 441. doi: 10.3389/fimmu.2018.00441.
49. Zingoni A., Molfetta R., Fionda C., Soriani A., Paolini R., Cipitelli M., Cerboni C., Santoni A. NKG2D and its ligands: "One for all, all for one". *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 476. doi: 10.3389/fimmu.2018.00476.

Авторы:

Лахтин М.В. — к.б.н., старший научный сотрудник
ФБУН «Московский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии имени
Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Лахтин В.М. — д.б.н., главный научный сотрудник
ФБУН «Московский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии имени
Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Алёшкин В.А. — д.б.н., профессор, научный руководитель
ФБУН «Московский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии имени
Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Афанасьев С.С. — д.м.н., профессор, главный
научный сотрудник ФБУН «Московский научно-
исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Г.Н. Габричевского»
Роспотребнадзора, Москва, Россия

Authors:

Lakhtin M.V., PhD (Biology), Senior Research Associate,
G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and
Microbiology, Moscow, Russian Federation

Lakhtin V.M., PhD, MD (Biology), Chief Research Associate,
G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and
Microbiology, Moscow, Russian Federation

Alyoshkin V.A., PhD, MD (Biology), Professor, Research
Director, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology
and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Afanasiev S.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief
Research Associate, G. Gabrichevsky Research Institute for
Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 31.08.2018

Отправлена на доработку 19.09.2018

Принята к печати 17.10.2018

Received 31.08.2018

Revision received 19.09.2018

Accepted 17.10.2018

РОЛЬ ГЛИКОДЕЛИНА В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В КОНТЕКСТЕ РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Бочкова М.С.¹, Заморина С.А.^{1,2}, Тимганова В.П.¹, Храмцов П.В.^{1,2},
Раев М.Б.^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

² ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Резюме. В обзоре представлены данные о роли гликоделина А (GdA, PP14, α 2-PEG, EP15, PER, AUP, PAEP) в регуляции функций иммунной системы в контексте формирования иммунной толерантности во время беременности.

Гликоделин был впервые выделен и идентифицирован в 1976 году Петруниным Д.Д. и Татаринным Ю.С. с коллегами как новый антиген плаценты, который был назван хорионическим α 2-микроглобулином. С тех пор получено огромное количество научных данных о структуре, свойствах и биологических эффектах этого гликопротеина. Данный белок имеет четыре дифференциально гликозилированные изоформы, а именно GdA, GdF, GdC и GdS, которые секретируются в различных частях репродуктивного тракта.

Наиболее изученная изоформа, гликоделин А (GdA), секретируется децидуальным железистым эпителием и в процессе беременности накапливается в амниотической жидкости и материнской сыноворотке. Уровень GdA служит признаком фертильной функции эндометрия. GdA обладает разнонаправленными биологическими эффектами, в частности модулирует эндокринную функцию и дифференцировку клеток трофобласта.

Роль GdA в регуляции иммунной системы заключается в ингибировании пролиферации Т- и В-лимфоцитов, подавлении цитотоксичности NK-клеток, индукции апоптоза активированных CD4⁺ клеток, моноцитов и NK-клеток, угнетении активности цитотоксических Т-лимфоцитов и подавлении функциональной активности макрофагов и дендритных клеток. Помимо этого, GdA повышает уровень регуляторных Т-лимфоцитов, сдвигает баланс Th1/Th2 в сторону Th2 и индуцирует толерантный фенотип в дендритных клетках.

Иммуномодулирующая активность GdA зависит от степени его гликозилирования, которая, в свою очередь, связана со способом получения препарата. Поэтому в обзоре проанализированы особенности иммуномодулирующего действия нативного и рекомбинантного типов гликоделина на клетки иммунной системы.

Тем не менее суммарные эффекты GdA на клетки иммунной системы позволяют рассматривать его как один из основных факторов, формирующих иммунную толерантность организма матери к разви-

Адрес для переписки:

Раев Михаил Борисович
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: mraev@iegm.ru

Address for correspondence:

Rayev Mikhail B.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural
Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Goleva str., 13.
Phone: 7 (342) 280-77-94.
Fax: 7 (342) 280-92-11.
E-mail: mraev@iegm.ru

Образец цитирования:

М.С. Бочкова, С.А. Заморина, В.П. Тимганова,
П.В. Храмцов, М.Б. Раев «Роль гликоделина в регуляции
иммунной системы в контексте развивающейся
беременности» // Медицинская иммунология, 2019.
Т. 21, № 4. С. 603–616.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-603-616
© Бочкова М.С. и соавт., 2019

For citation:

M.S. Bochkova, S.A. Zamorina, V.P. Timganova,
P.V. Khramtsov, M.B. Rayev "Role of glycodelin in the immune
system regulation in the context of developing pregnancy",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 4, pp. 603–616.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-603-616
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-603-616

вающемуся эмбриону. Важно также отметить, что клинические исследования выявили корреляцию между низким уровнем циркулирующего GdA с повторяющимися спонтанными абортами, что подтверждает важность этого белка в фетопротекции.

В целом, очевидно, что GdA имеет перспективы применения в биомедицине в качестве фармакологического препарата для лечения аутоиммунных заболеваний, посттрансплантационных осложнений и «перепрограммирования» аутореактивных клонов Т-лимфоцитов *in vitro* для дальнейшей точной иммунотерапии.

Ключевые слова: нативный гликоделин А, рекомбинантный гликоделин А, иммунная система, иммунная толерантность при беременности, иммуномодуляция

ROLE OF GLYCODELIN IN THE IMMUNE SYSTEM REGULATION IN THE CONTEXT OF DEVELOPING PREGNANCY

Bochkova M.S.^a, Zamorina S.A.^{a, b}, Timganova V.P.^a, Khramtsov P.V.^{a, b}, Rayev M.B.^{a, b}

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

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

Abstract. The review presents data on the role of glycodelin A (GdA, PP14, α 2-PEG, EP15, PEP, AUP, PAEP) in regulation of immune system functions in the context of evolving feto-maternal immune tolerance during pregnancy. Glycodelin was first isolated and identified in 1976 by Petrunin D.D. and Tatarinov Yu.S. with colleagues as a new placental antigen, which was called chorionic α 2-microglobulin. Since then, a huge amount of scientific data has been obtained on the structure, properties, and biological effects of this glycoprotein. This protein has four differentially glycosylated isoforms, namely GdA, GdF, GdC, and GdS, which are secreted in different compartments of reproductive system.

The most studied isoform, glycodelin A (GdA), is secreted by decidual glandular epithelium and accumulates in the amniotic fluid and maternal serum during pregnancy. GdA level is a marker of endometrial fertile function. GdA has diverse biological effects, in particular, as modulator of endocrine function and trophoblastic cell differentiation. The role of GdA in regulation of immune system is to inhibit T and B lymphocyte proliferation, suppress the NK cell cytotoxicity, induce apoptosis of activated CD4⁺ cells, monocytes and NK cells, inhibit the cytotoxic T lymphocyte activity, and to suppress functional activities of macrophages and dendritic cells. In addition, GdA increases the levels of regulatory T cells, modifies the Th1/Th2 balance towards Th2, and induces a tolerant phenotype of dendritic cells.

The immunomodulating activity of GdA depends on the degree of its glycosylation, which, in turn, is associated with its preparation technique. Therefore, the review analyzed the features of the immunomodulating effects of the native and recombinant types of glycodelin upon the immune cells. However, cumulative effects of GdA upon the cells of the immune system make it possible to consider it among the main factors shaping feto-maternal immune tolerance during pregnancy. It is also worth of note, that clinical studies have revealed a correlation between low levels of circulating GdA, and repetitive spontaneous abortions that confirm importance of this protein for the fetal protection.

In general, it is obvious that GdA has a potential of medicinal application for treatment of autoimmune diseases, post-transplant complications and *in vitro* reprogramming of autoreactive T cell clones for subsequent cellular immunotherapy.

Keywords: native glycodelin A, recombinant glycodelin A, immune system, feto-maternal immune tolerance, immunomodulation

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-04055 мк.

The reported study was funded by RFBR according to the research project No. 19-29-04055 мк.

General characteristics of glycodelin

Glycodelin is a human glycoprotein that belongs to the superfamily of lipocalins [69]. Members of

this family are characterized by the ability to bind small hydrophobic molecules, cell surface receptors and soluble macromolecules [17]. Glycodelin was first isolated and identified by Petrunin D.D. and Tatarinov Yu.S. with colleagues in 1976 as a placenta new antigen, which was called chorionic α 2-microglobulin [3]. With the accumulation of data on the localization and properties of the protein,

its name changed to placental $\alpha 2$ -microglobulin, $\alpha 2$ -microglobulin of fertility (AMGF) and, finally, specific $\alpha 2$ -microglobulin. Later glycodelin was characterized by several independent research groups as placental protein 14 (PP14) [9], pregnancy-associated endometrial $\alpha 2$ -globulin ($\alpha 2$ -PEG) [6], endometrial protein 15 (EP15) [7], progestagen-dependent endometrial protein (PEP) [21, 23], alpha-2 uterine protein (AUP) [18, 74], progesterone associated endometrial protein (PAEP) [29]. To avoid terminological confusion, Dell A. et al. in 1995 [13] proposed a new protein's name: "glycodelin", reflecting its unique feature — sex-dependent glycosylation.

Structure of glycodelin

Glycodelin is a dimeric glycoprotein consisting of 180 amino acid residues (of which 18 are an N-terminal signal peptide), which molecular weight varies from 42 to 56 kDa, depending on the source and method of isolation [69]. Carbohydrates are about 20% of the molecular weight of the protein. The homodimeric form serves as the framework for four large side chains of sugar on the same surface of the protein. Different chains of oligosaccharides are responsible for a variety of biological functions in reproduction and immunosuppression [72].

The first studies of the N-terminal sequence of glycodelin revealed 59% identity with equine β -lactoglobulin and 23% identity with the human retinol-binding protein. The highest similarity of glycodelin — 91% is found with rhesus macaque. In β -lactoglobulins, four cysteine residues at positions 66, 106, 119 and 160 are responsible for intramolecular disulfide bridges, all of which are conserved in glycodelin [19, 25]. Despite these structural similarities, the amino acid sequence of β -lactoglobulin does not contain any glycosylation sites present in glycodelin [19, 31, 67, 69]. Notwithstanding the resemblance in the general folding patterns of glycodelin and β -lactoglobulin, the conformations of these proteins are different, which is determined by differences in their denaturation processes [31]. Also it was found that, unlike β -lactoglobulin, glycodelin A (GdA) does not bind to retinoids or any endogenous hydrophobic ligands [31, 35].

Comparative immunochemical studies, analysis of N-terminal sequences, and cDNA sequencing showed that the glycodelin isoforms are identical in the primary and tertiary structure of the protein molecule, in immunogenicity and in some physicochemical properties [67]. They differ only in glycosylation. Initially, three potential N-glycosylation sites were found at positions 28, 63, and 85, but later it turned out that only the first two of them were glycosylated [13, 40, 41, 45]. Mass spectrometric analysis of GdA and glycodelin S (GdS) N-glycans showed significant differences between them. The main differences in

glycans among "female" isoforms of glycodelins, such as GdA, GdC and GdF are basically at the level of terminal sialic acid residues. GdA contains the most of all residues of sialic acids Gal β 1-4GlcNAc (lacNAc), GalNAc β 1-4GlcNAc (lacdiNAc), NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc (sialylated lacNAc), NeuAc α 2-6GalNAc β 1-4GlcNAc (sialylated lacdiNAc), Gal β 1-4 (Fuc α 1-3), GlcNAc (blood group Lewisx) and GalNAc β 1- (Fuc β 1-3) GlcNAc (analogue of lacdiNAc Lewisx), opposite to glycodelins C (GdC) least. Glycan profile of glycodelin F (GdF) is similar to GdA profile, except that GdF contains less sialic acid residues. GdS does not contain sialylated glycans, its glycans are extraordinarily rich in fucose, and the basic structures of a complex type are two antennae glycans with Lewisx and Lewisy [Fuc α 1-2Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc] [45]. GdA and GdS have identical primary structures, immunoreactivity, tryptic peptide profiles, and similar thermodynamic parameters of reversible denaturation [30, 31], but different glycosylation [35]. Oligosaccharides containing terminal sialylated lacNAc or lacdiNAc residues present in GdF and GdA may exhibit immunosuppressive effects, whereas less sialylated GdC and unsialylated GdS do not possess significant immunosuppressive activity [45, 47]. However, the ligand for glycodelin has not yet been identified — there are only assumptions in the literature that, depending on glycosylation rate, glycodelin involve in their effects realization a number of molecules — L-selectin, E-selectin, CD45, CD22 and SIGLEC-7, as will be discussed below.

Place of glycodelin synthesis

The protein has four differentially glycosylated isoforms, namely GdA, GdF, GdC and GdS, which are secreted in various parts of the reproductive tract [68, 84]. Because of differences in glycosylation, the isoform of glycodelin isolated from the amniotic fluid was called GdA, and the corresponding glycodelin isoform isolated from seminal plasma was called GdS. Immunomorphological and immunochemical studies showed that GdA appears in the endometrial tissues a few days before the implantation, its amount increases during the implantation window and remains high until the onset of menstruation and during the first days of the next cycle, after which expression of the protein in the endometrium temporarily stops. In the case of pregnancy, GdA synthesis continues, and its content in decidual tissue in the first trimester reaches 4-10% of the total protein [69]. Thus, GdA is secreted mainly by decidual glandular epithelium and in the case of pregnancy, the protein accumulates in the amniotic fluid and maternal serum [21, 22]. The concentration of GdA in maternal serum at 12 weeks is 1200 μ g/l, and at 40 weeks — 100 μ g/l, and in the amniotic fluid the concentration of protein at 12 weeks is 13 mg/l, at 16 weeks — 125 mg/l, and at 40 weeks — 1 mg/l [24]. During a typical menstrual

cycle, GdA reaches serum concentrations in the middle of the proliferative phase – $< 20 \mu\text{g/l}$, in the middle of the luteal phase – $35 \mu\text{g/l}$, in the late luteal phase – $47 \mu\text{g/l}$, during menstruation – $74 \mu\text{g/l}$ [27]. GdF is secreted in the ovarian follicles [78], and GdC in multilayered epithelium cells in the wall of the vesicular ovarian follicle (*cumulus oophorus*) [10]. GdS is the only isoform found in the male body in seminal plasma [26, 84], whereas other isoforms are found only in women. Glycodelin has also been identified outside the reproductive system in cells of the megakaryocyte lineage, including platelets [46]. Other authors have shown that GdA (PAEP) is expressed in the hematopoietic system by erythroid progenitors, but not by mature erythrocytes, platelets, mononuclear phagocytes or lymphocytes [29]. Finally, it is worth noting that GdA expression is observed not only in healthy tissues of the reproductive tract, but also in certain types of cancer: lung, breast, endometrium, ovaries, and melanoma cells [28, 57, 64, 65, 82]. It has been shown that GdA can be used as a biomarker to track the progression of a tumor, as has been shown in non-small cell lung cancer, recurrence or metastatic spread [11]. Understanding the regulation of the glycodelin expression may lead to the development of new therapeutic approaches, with the help of which it will be possible to weaken the system of protection of the tumors themselves.

Clinical and diagnostic value of glycodelin

In clinical studies, glycodelin is a prognostic marker of early fetal loss and male infertility [2, 12]. GdS is a sensitive marker of fertility and its definition can be used as an additional test for the early detection of the pathology of ejaculate in idiopathic infertility [1]. The level of GdA is a sign of endometrial fertility. Serum GdA concentration is an important parameter for monitoring the menstrual cycle [8]. It can be used to distinguish the ovulatory menstrual cycle from non-ovulatory, which provides valuable information for the diagnosis of infertility *in vitro*. Additionally, this test is used to determine the optimal embryo transfer time in *in vitro* fertilization protocols [75] and in the diagnosis of the threat of termination of pregnancy [76]. Reducing expression of glycodelin can cause activation of the maternal immune system, and ultimately lead to the rejection of the developing embryo [77].

Biological effects of GdA

GdA is the most widely studied and most interesting isoform from all glycodelins. It is positioned as a specific protein of the human reproductive system. GdA inhibits the binding of spermatozoa to *zona pellucida* and protects spermatozoa from an immune attack in the maternal reproductive tract [85]. GdA promotes successful implantation and subsequent development of pregnancy [75]. Thus, a decrease in its level is associated with an increased risk of

preeclampsia and recurrent abortions [34, 36]. Simultaneous expression of enzymes that destroy the matrix and their inhibitors in trophoblasts suggests that the balance between these components regulates the invasive activity of trophoblast cells. GdA is one of the decidual factors that limit the invasion of trophoblast [34]. It is important to note that this effect is strictly dependent on the glycosylation of the molecule since deglycosylation and even minor changes in glycosylation present in various glycoforms decrease this activity [34]. In addition, GdA regulates the development of the placenta, which is closely related to the processes of angiogenesis. The angiogenic effect of GdA is mediated by the enhancement of vascular endothelial growth factor (VEGF), which is involved in placental angiogenesis [40]. Since glycodelin has been found in the glandular structures of many tissues, including seminal vesicles, lobular and ductal epithelium of the mammary gland, eccrine sweat glands and parabrachial glands, it is suggested that it plays the role of a marker of differentiation and morphogenesis in glandular tissues [69]. GdA is able to induce trophoblast cells to produce chorionic gonadotropin, an extremely important hormone that accompanies the development of pregnancy [20]. The authors conclude that *in vivo* GdA modulates the endocrine function, as well as the differentiation of trophoblasts. Thus, GdA has multiple biological functions.

Immunomodulatory effects of GdA

Obviously, immunocompetent cells of the reproductive tract fall under the influence of GdA. It is known that in the early stages of pregnancy in the decidua, about 40% of the stromal cells are leukocytes, of which 45-70% are NK cells, 30% are macrophages and less than 20-30% are $\text{CD3}^+\text{T}$ cells. During pregnancy, CD3^+ cells frequency remains stable, but in the third trimester their number increases, and the number of NK cells decreases [61].

Cells of the monocyte-macrophage lineage

Macrophages are also found in large numbers in the decidua. Their quantity is regulated by the hormones of the ovaries since macrophages contain receptors for estrogens. One of the key functions of these cells is the timely elimination of apoptotic cells [4]. With successful elimination, the production of Th2-cytokines by decidual macrophages increases, whereas the inferior removal of apoptotic cells leads to the hyperactivation of macrophages and the enhancement of pro-inflammatory Th1-cytokines production by them. Decidual macrophages help to maintain immune tolerance towards fetal antigens and to protect fetus from the constant risk of infection [42].

In order to analyze the effects of glycodelin on the cells of the immune system, it is important to separate the two available approaches: the use of native glycodelin derived from amniotic fluid or homogenate

of decidual tissues and the use of recombinant protein. Both the first and second approaches have their methodological differences associated with the degree of purification of the preparation, the source of the recombinant protein, the presence of isoforms, and the degree of glycosylation. Nevertheless, our task is to generalize the available information and to try to understand the dominant vector of the effects of this complex protein.

Thus, it is known that GdA dose-dependently inhibits the ability of human monocytes (cell line U937) to chemotaxis, losing these properties after deglycosylation [79].

Miller R.E. and colleagues found that human recombinant GdRec protein isolated from *E. coli* BL21 (DE3) periplasm transformed with the bacterial expression vector pPP14.1 EE his6/ET-22b (+) specifically bound to CD14⁺ cells (monocytic cell line), but not with CD20⁺ cells (B cell line) and CD3⁺ cells (T cell line). Thus, the authors show the presence of a receptor for this protein on the membrane of the CD14⁺ cells of the monocytic cell line [43].

Neither glycosylation nor sialylation of glycodelin does not impair the ability of monocytes to chemotaxis. Recombinant GdA binds to a specific protein receptor in monocytes, but the corresponding receptor is not detected on the surface of T or B cells [11]. Further study of the GdA action mechanism established that on the surface of cells of the monocyte-macrophage lineage, the binding protein for glycodelin is the L-selectin molecule. Thus, treatment with antibodies against L-selectin reduced the binding of GdA and the GdA-induced production of IL-6 [39].

When comparing the effects of native GdA derived from an amniotic fluid and recombinant glycodelin (GdRec), both of these proteins have been shown to inhibit both T cell and monocytic cell lines (U937 [48] and THP1 [5]) proliferation. A more detailed study of the GdRec effects has shown that it induces apoptosis of THP1 cells, as well as apoptosis of monocytes obtained from healthy volunteers. When studying the mechanism of action, it was demonstrated that GdRec realizes its apoptotic effect suppressing the expression of the anti-apoptotic genes Bcl-2A1 and APRIL and increasing the expression of the proapoptotic genes TNF-R1, Bad and Bax. At the same time, GdRec had no effect on phagocytosis processes in THP1 cells [5].

In 2012, Lee and colleagues demonstrated that GdA, which was obtained from amniotic fluid by affinity chromatography, does not affect the viability, cell death, and monocyte/macrophage phagocytosis, but induces the secretion of IL-6 by these cells [39]. At the same time, non-glycosylated GdRec did not have a stimulating effect on IL-6 production. GdA-induced IL-6, in turn, inhibited the expression of IFN γ by T lymphocytes by an autocrine mechanism, which led

to the Th2 activation. The anti-inflammatory effect of GdA is supported by the fact that it suppresses the production of TNF α by macrophages obtained from monocytes without affecting their phagocytic activity [39].

In a recent paper, Vijayan and colleagues discovered a possible GdA receptor on the human peripheral blood monocytes membrane. The GdA receptor – SIGLEC-7 (Immunoglobulin-like lectin 7 binding sialic acid; CD328) was identified by co-immunoprecipitation and flow cytometry. In culture conditions, GdA enhanced the expression of IDO-1 and CD209 decidual macrophage markers on GdA-polarized macrophages. Blocking the SIGLEC-7 receptor on cells leveled the biological effects of GdA on monocyte differentiation [80].

Dendritic cells (DC) are present in the maternal part of the placenta and are represented by immature and mature myeloid dendritic cells, with the cells responsible for the induction of T-cell anergy. Placental DC and macrophages actively absorb extravillous trophoblast cells undergoing apoptosis, which is considered as a stage of induction of the mother's immune tolerance to fetal antigens inherited from the father. Thus, it is known that a native GdA preparation derived from an amniotic fluid induces a tolerogenic phenotype of DCs (IL-10-producing cells) derived from monocytes *in vitro* [66]. At the same time, GdA suppressed maturation of DCs from peripheral blood mononuclear cells: after preliminary treatment with GdA, immature DCs could not go into a full mature phenotype. GdA suppressed the expression of costimulatory molecules CD83 and CD86 on immature DCs. Co-cultivation of obtained in this way DCs with allogeneic mononuclear blood cells dose-dependently reduced their lymphoproliferative activity [11]. Glycodelin isolated from ascites of patients with ovarian cancer, also prevents the maturation of DCs with a tolerogenic phenotype and functionality, suggesting that glycodelin can form an immunosuppressive microenvironment in the progression of cancer [11].

NK cells

At the beginning of pregnancy, the dominant cells in the decidua are uterine NK cells, which constitute up to 80% of all leukocyte infiltrate cells. NK cells lose their CD16 (Fc γ RIIIA), which provides the ability to carry out a cytotoxic effect, and start to express on the membrane HLA-G (human leukocyte antigen-G) tolerogenic molecule, through which they interact with the trophoblast, modulate immune processes in the endometrium, and also produce angiogenic factors [16]. Interestingly, glycodelin is selectively expressed in decidual NK cells and is practically not identified in peripheral NK cells [32]. As early as in 1991, it was demonstrated that glycodelin, obtained

from amniotic fluid, blocks the cytotoxicity of NK cells against the K562 cell line [50]. The authors suggest that GdA is thus involved in preventing fetus immune rejection in the fetoplacental interface.

Lee C.L. with colleagues studied the effects of GdA, isolated from amniotic fluid, on the functional activity of peripheral NK cells. It has been shown that glycodelin high concentration (1 µg/mL) significantly reduced the cytotoxicity of NK cells against target cells, although the ability of binding NK cells to target cells is preserved [37]. GdA did not affect the viability, cytotoxicity, and phenotype of peripheral blood NK cells, but increased the secretion of IL-6, IL-13, and GM-CSF by them [37].

B cells

The B-cell content in the decidua is small (as in the mother's bloodstream), but it increases significantly in the course of pregnancy, reaching 13% in last trimester. Th2 bias during pregnancy facilitates the development of the humoral immune response, including in the fetomaternal interface. Yaniv and colleagues showed that GdRec (recombinant form of GdA, PP14•Fcγ1) regulates humoral immunity, suppresses proliferation, IgM secretion and MHC class II expression on stimulated B cells, without affecting other surface molecules such as CD69 and CD86 [83]. In the experiments of Alok and co-authors, it was demonstrated that *S. aureus*-activated B cells under the influence of GdA reduced proliferative activity, evaluated in the H3-thymidine incorporation assay [5]. In addition, the proliferation of the human B-cell line U266B1 also decreased under the influence of GdA [5]. Quite interestingly, similar effects in this study were obtained both with the use of native GdA derived from amniotic fluid and recombinant GdA obtained in insect cells (Sf21, ie, *Spodoptera frugiperda* or Mb, ie, *Mamestra brassica* [5]). It is known that oligosaccharide chains in native glycodelin specifically interact with CD22 on B cells and have immunosuppressive functions [11, 13].

T cells

It is known that the development of physiological pregnancy is associated with the formation of immunological tolerance to the alloantigens of the paternal haplotype, which are expressed by the embryo. In general, the current concept of immunological tolerance is that during a normal pregnancy, changes occur in the mother's immune system, such as the dominance of Th2 and regulatory T cells (Treg) over Th1 and IL-17-producing T cells (Th17), as well as an increase of the indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) level [59].

It is known that native GdA can inhibit T-cell proliferation in a mixed culture, suppressing the mitogenic response of lymphocytes to phytohemagglutinin (PHA) [53]. It has been shown that inhibition of activation and proliferation of T

cells by the native preparation of GdA is carried out by inhibiting the transmission of T-cell receptor signals [55, 56].

As for CD8⁺T cells, the native GdA preparation, obtained by immunoaffinity chromatography from the amniotic fluid, reduces the cytotoxic effects of alloactivated CD8⁺T cells. Inhibition of cytotoxic T-lymphocytes activity is caused by suppression of transcription of effector molecules (granzyme B and perforin), and blocking the degranulation of cytolytic vesicles. Despite the inhibition of CD8⁺T-cells proliferation, GdA does not affect the initiation of apoptosis in these cells [70].

When studying the mechanism of GdA action, it was found that it participates in early signal transduction, involving T cell receptor (TCR, CD3). First, it abolishes the TCR-induced flow of Ca²⁺ ions in early TCR-CD3 signaling events. Unlike other T cell inhibitors, such as cyclosporin A, that inhibit Ca²⁺-dependent phosphatase (calcineurin) to weaken the signaling pathway of activation, regardless of interaction with TCR, GdA, on the contrary, increases the TCR activation threshold and changes the corresponding profile of cytokine expression, but not directly blocks the transduction of the T-cell signal. In addition, GdA can be localized in APC – T cell contact sites at TCR startup to inhibit activation of T lymphocytes. In addition, the binding of GdA to intact CD45 molecule of T cells diminishes the TCR-CD3 signal transduction [11].

In 2012, it was found that GdA disrupted IL-2/IL-2R signaling processes in T cells by reducing the expression of IL-2R on the cell surface, which resulted in a T cell proliferation decrease. It has generally impaired the immune response, including by weakening the cytotoxicity of CD8⁺T cells. Given that IL-2 regulates the expression of pro- and anti-apoptotic proteins in activated cells, an insufficient IL-2-signal in the presence of GdA may cause a decrease in the anti-apoptotic Bcl-2 protein and an increase in the pro-apoptotic Bax protein, which contribute to the induction of CD4⁺T cells apoptosis [71]. GdA also causes mitochondrial stress, which directly leads to apoptosis of T cells independent of TCR and CD45 signals [73]. GdA can induce apoptosis in activated T cells by selectively combining N-linked glycans on the glycoproteins of the T cell surface since activated T cells express more galactose than naïve T cells [48]. It is important to note that all these conclusions are drawn from the analysis of the effects of the native GdA preparation, obtained by the immunoaffinity chromatography from the amniotic fluid. In addition, GdA-mediated induction of apoptosis in activated T cells occurs through permeabilization of the mitochondrial membrane and induction of caspase-3, caspase-9 [38, 48, 73], increasing the activity of caspase-8, which leads to increased expression of

Fas, and thereby increase cell mortality [38]. Both recombinant glycodeilin GdRec obtained from *P. pastoris* cells (GS115 strain) which does not contain sialic acid residues and the desialylated form of native GdA do not induce T-cell apoptosis. The authors conclude that the apoptotic activity of GdA depends on the presence of sialic acid residues in this protein [48].

GdA is involved in the regulation of the functional activity of the dominant regulatory subpopulations of helper T cells – Th1 and Th2. For example, the recombinant form of GdA (PP14•Fcγ1) inhibits the polarization of naïve CD4⁺T cells towards the Th1 during T cell priming, suppressing the expression of IFNγ, IL-2 and CXCR3 (chemokine receptor), which are important for the development and activation of Th1 cells [44]. At the same time, native GdA induces apoptosis of Th1 cells mainly by enhancing Fas expression in them in comparison with Th2 cells [38]. GdA-treated macrophages exerted a suppressive effect on the intracellular level of IFNγ in helper T cells. With a detailed study of the native GdA action mechanism, it has been shown that it realizes its Th1-suppressive effect through the induction of IL-6 production by macrophages. At the same time, IL-6 promotes the differentiation of Th-2 cells, and GdA, thus, can improve fetal survival and help maintain pregnancy [39]. Thus, the general vector of the effects of recombinant and native GdA is directed to the formation of Th2-bias of immune response necessary for the normal pregnancy. In the experiments of Pockley et al., it was shown that first trimester decidual tissue extracts in which GdA is present inhibit the production of IL-2 in PHA-stimulated lymphocytes and lead to a reduced release of the IL-2R receptor [52]. The same authors showed that first trimester decidual tissue extracts and the purified GdA preparation suppressed the production of IL-1 in mitogen-stimulated (PHA and LPS) cultures of mononuclear cells [53].

However, in addition to the dominant Th1/Th2 subpopulations, generation of antigen-specific clones of regulatory T cells (Treg) is of great importance during pregnancy [59]. Treg accounts for 5-10% of the total population of helper T cells. They support immunological tolerance, participate in the suppression of the final stages of immune response, prevent the development of autoimmune diseases and grafts rejection. Treg enter the endometrium from the peripheral blood, the maximum of this cell's number in the decidua is observed in the first trimester of pregnancy, and Treg elimination leads to its interruption [33].

It is known that GdRec, obtained from the cell line of human embryonic kidneys, that has the same type of carbohydrate structures as amniotic (HEK 293 –

Human Embryonic Kidney 293), under prolonged culture conditions increased the level of myelin-specific Treg and the expression of FoxP3 *de novo* with simultaneous suppression of effector T cells. In the experiment, there was a twofold increase in the number of FoxP3⁺T cells, which were also characterized as CD25^{high} and GITR^{high} [49]. The observed increase in FOXP3 expression in cells treated with GdA was the result of premature termination of signaling via TCR and in particular the PI3K/Akt/mTOR pathway. By regulating the mTOR signaling, glycodeilin can influence the antigen-induced differentiation of T effectors or Treg [49]. The authors conclude that GdA has a potential therapeutic effect on T cells in autoimmune diseases by preventing the development of effector T cells and inducing antigen-specific Treg. In the long term, GdA would be logical to use in cellular immunotherapy for “reprogramming” autoreactive clones of T cells and directed induction of necessary antigen-specific Treg.

It should also be noted that physiological pregnancy is accompanied by a decrease in the frequency of proinflammatory IL-17-producing helper T cells (Th17) in peripheral blood compared with non-pregnant women [60]. Elevation of the Th17 number, in turn, is associated with pathological processes and can lead to premature birth or spontaneous abortion [59]. GdA-treated macrophages, when co-cultured with autologous lymphocytes, did not have a significant effect on the intracellular IL-17 level of T helper cells [39].

In 2018, the role of the immunosuppressive activity of the recombinant GdA (source of *E.coli* C43) in preventing graft rejection was investigated [14]. Using an *in vitro* experimental model based on the co-cultivation of mononuclear cells with targeted HepG2e cells, it was demonstrated that GdA suppressed the generation of cytotoxic lymphocytes and their functional activity. Similar results were obtained *in vivo* in nude mice that became recipients of HepG2e cells and GdA-treated human CD8⁺ cells. It was shown that *in vivo* GdA also inhibits the activity of cytotoxic lymphocytes [14].

In the same 2018, Paloma Riquelme and colleagues received regulatory macrophages (Mregs) from human blood monocytes CD14⁺ *in vitro*. By co-cultivation of Mregs with FoxP3⁺CD4⁺T cells, the researchers demonstrated that Mregs promoted the formation of IL-10-producing FoxP3⁺ (Treg) regulatory T cells, the so-called Mreg-induced (miTreg) cells, which subsequently suppressed nearby T-cells and prevented maturation of dendritic cells in culture. When anti-GdA antibodies were added to the mixed Mreg/FoxP3⁺CD4⁺T cells culture, a significant decrease in miTreg generation was observed. The authors concluded that under co-culture conditions,

**TABLE 1. EFFECTS OF DIFFERENT TYPES OF GLYCODELIN A ON THE FUNCTIONS OF IMMUNE CELLS
(IN CHRONOLOGICAL ORDER OF DISCOVERY)**

Type of glycodelin	Effects	Reference
Purified extract of decidual tissue, I trimester	Reduction of proliferative activity of lymphocyte mixed culture and PHA-stimulated lymphocytes	Bolton et al., 1987
Purified extract of decidual tissue, I trimester	Reduction of production of IL-1 and IL-2, as well as sIL-2R by mitogen-stimulated lymphocytes and mononuclear cells	Pockley et al., 1988
Amniotic fluid, second trimester	Inhibition of cytotoxicity of NK cells against the K562 cell line	Okamoto et al., 1991
Recombinant GdA (from E. coli BL21 (DE3), transformed with bacterial expression vector pPP14.1 EE his6/ET-22b (+))	Specifically associated with CD14 ⁺ cells (monocytic cell line), but not with CD20 ⁺ cells (B cell line) and CD3 ⁺ cells (T cell line)	Miller et al., 1998
Native* and recombinant (PP14 Fc γ 1) GdA	Reduced T cell activity (proliferative)	Rachmilewitz et al., 1999, 2001
Native* and recombinant	The inhibitory effect on the T cell proliferation is mediated through binding to α 2-macroglobulin	Riely et al., 2000
Native and recombinant	Directly induces apoptosis of T cells, regardless of monocytes	Mukhopadhyay et al., 2001
Homogenate of decidual tissue	Decreased chemotaxis of U937 monocytic cell line	Vigne et al., 2001
Recombinant form, PP14•Fc γ 1	Suppress proliferation, IgM secretion and MHC class II expression by stimulated B cells	Yaniv et al., 2003
Recombinant form of GdA (PP14•Fc γ 1)	Prevents polarization of naïve CD4 ⁺ T cells towards Th1, suppressing the expression of IFN γ , IL-2 and CXCR3	Mishan-Eisenberg et al., 2004
Native GdA	Induced mitochondrial stress, which directly leads to apoptosis of T cells independent of TCR and CD45 signals	Sundarraj et al., 2008
Native GdA	Reduced proliferation of <i>S. aureus</i> -activated B cells and proliferation of U266B1 B cell line	Alok et al., 2009
Native GdA	No effect on viability, peripheral NK cell phenotype, but increased secretion of IL-6, IL-13 and GM-CSF	Lee et al., 2010
Native GdA	Reduced cytotoxicity of allo-activated CD8 ⁺ T cells	Soni et al., 2010
Recombinant GdA derived from Human Embryonic Kidney 293 cell line (HEK 293)	<i>In vitro</i> increased the level of antigen-specific Treg and the expression of FoxP3 <i>de novo</i> with simultaneous suppression of effector T cell functions	Ochanuna et al., 2010
Native GdA	Induced apoptosis of Th1 cells mainly by enhancing the expression of Fas in them in comparison with Th2 cells	Lee et al., 2011
Native GdA	It did not affect the intracellular level of IL-17 expression in T-helper cells when co-cultured with GdA-treated macrophages	Lee et al., 2012

Type of glycodelin	Effects	Reference
Native GdA	Violated the IL-2/IL-2R signaling processes in T cells, which led to a decrease in cell proliferation	Soni et al., 2012
Recombinant GdA (<i>E. coli</i> source C43)	Prevented nude mice transplant rejection	Dixit et al., 2018
GdA secreted by human regulatory macrophages <i>in vitro</i>	Under co-culture (Mregs and FoxP3 ⁺ CD4 ⁺ T cells), GdA (PAEP) secretion by Mreg promotes Treg induction	Riquelme P. et al., 2018

Note. *, native GdA preparation obtained by immunoaffinity chromatography from amniotic fluid.

Mreg secrete GdA (PAEP) and thus induce miTreg generation from FoxP3⁺CD4⁺T cells. The preoperative administration of Mregs of kidney donor to recipients led to a dramatic increase in circulating Tregs and promoted the transplant engraftment [58].

In studying the molecular mechanisms by which GdA suppresses transplant rejection, it has been shown that the protein reduces the number of activated CD4⁺ and CD8⁺ cells and reduces the expression of key proteins involved in graft rejection such as IL-2, granzyme-B, eomesodermin (EOMES), and production of pro-inflammatory cytokines (TNF α and IL-6), which leads to a weakened cell-mediated immune response. In addition, GdA induced apoptosis in CD4⁺T cells, which are key mediators of the immune response. As a result, the authors see the possibility of using glycodelin in the therapy of rejection of the transplant. A similar assumption about the possible use of GdA in the case of lung transplantation was made by Schneider et al. [62, 63]. It is also important to note that clinical studies have revealed a correlation between a low level of circulating GdA with repeated spontaneous abortions, which confirms the importance of this protein in fetoprotection [12].

In general, it is obvious that GdA has prospects for use in biomedicine as a pharmacological drug for the treatment of post-transplant complications [14, 58] and autoimmune conditions [51] and “reprogramming” of autoreactive clones of T lymphocytes *in vitro* for further cellular immunotherapy.

Conclusion

Glycodelin (PP14, PAEP, alpha-2-microglobulin, a dimeric glycoprotein with a molecular weight of 42 to 56 kDa) is considered a marker of reproductive tissue receptivity [81]. In the normal course of pregnancy, the glycodelin level gradually increases, reaching a maximum at the 4-16th week of pregnancy, then begins to decrease, forming a plateau after 24 weeks [22, 24]. Clinical studies have revealed a correlation between a low level of circulating glycodelin with repeated spontaneous abortions [12], and with the development of preeclampsia [15], which confirms the importance of this protein in fetoprotection.

As a result, the data of modern literature show that the role of GdA in the regulation of the immune system is to inhibit the proliferation of T and B lymphocytes, suppress the cytotoxicity of NK cells, induce apoptosis of activated CD4⁺ cells, monocytes and NK cells, inhibit the activity of cytotoxic T-lymphocytes and suppression of the functional activity of macrophages and dendritic cells (Table 1). In addition, GdA increases the level of Treg, bias the Th1/Th2 balance towards Th2 and induces a tolerant phenotype of dendritic cells. Immunomodulating activity of GdA depends on the degree of its glycosylation. The overall effects of GdA at the level of the immune system allow us to consider it as one of the main factors that form the fetomaternal immune tolerance, along with other pregnancy proteins (chorionic gonadotropin, pregnancy specific β 1-glycoproteins, alpha-feto-protein, etc.).

Список литературы / References

1. Галимова Э.Ф., Ахмадуллина Г.Х., Булыгин К.В., Мочалов К.С., Галимов Ш.Н. Гликоделин S в сыворотке крови и эякуляте при идиопатическом бесплодии // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 3s. С. 178. [Galimova E.F., Akhmadullina G.Kh., Bulygin K.V., Mochalov K.S., Galimov Sh.N. Glycodelin S in serum and ejaculate in idiopathic infertility. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 3s, p. 178. (In Russ.)]
2. Енькова Е.В., Воронина Е.В., Грибанова В.А., Чернова А.В. Значение снижения уровня альфа2-микроглобулина фертильности для прогнозирования осложнений беременности // Доктор.Ру, 2011. № 9 (68).

- С. 90-93. [Enkova E.V., Voronina E.V., Griбанова V.A., Chernova A.V. Reduced levels of pregnancy protein 14 (Glycodelin) as a prognostic factor for complicated pregnancy. *Doktor.Ru*, 2011, no. 9 (68), pp. 90-93. (In Russ.)]
3. Петрунин Д.Д., Грязнова И.М., Петрунина Ю.А., Татаринов Ю.С. Иммунохимическая идентификация органоспецифического $\alpha 2$ -глобулина плаценты человека и его содержание в амниотической жидкости // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1976. №. 7. С. 803-804. [Petrinin D.D., Gрязnova I.M., Petrunina Yu.A., Tatarinov Yu.S. Immunochemical identification of human placental organ specific $\alpha 2$ -globulin and its concentration in amniotic fluid. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1976, no. 7, pp. 803-804. (In Russ.)]
4. Abrahams V.M., Kim Y.M., Straszewski S.L., Romero R., Mor G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *AJRI*, 2004, Vol. 51, pp. 275-282.
5. Alok A., Mukhopadhyay D., Karande AA. Glycodelin A, an immunomodulatory protein in the endometrium, inhibits proliferation and induces apoptosis in monocytic cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009, Vol. 41, no. 5, pp. 1138-1147.
6. Bell S.C. Purification of human secretory pregnancy-associated endometrial $\alpha 2$ -globulin ($\alpha 2$ -PEG) from cytosol of first trimester pregnancy endometrium. *Hum. Reprod.*, 1986, Vol. 1, no. 5, pp. 313-318.
7. Bell S.C., Hales M.W., Patel S., Kirwan P.H., Drife J.O. Protein synthesis and secretion by the human endometrium and decidua during early pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1985, Vol. 92, no. 8, pp. 793-803.
8. Bersinger N.A., Birkhäuser M.H., Yared M., Wunder D.M. Serum glycodelin pattern during the menstrual cycle in healthy young women. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2009, Vol. 88, Iss. 11, pp. 1215-1221.
9. Bohn H., Kraus W., Winkler H. New soluble placental issue proteins: their isolation, characterisation, localisation and quantification. *Placenta Suppl.*, 1982, Vol. 4, pp. 67-81.
10. Chiu P.C., Chung M.K., Koistinen R., Koistinen H., Seppala M., Ho P.C., Ng E.H., Lee K.F., Yeung W.S. Cumulus oophorus-associated glycodelin-C displaces sperm-bound glycodelin-A and -F and stimulates spermatozoa-zona pellucida binding. *J. Biol. Chem.*, 2007, Vol. 282, no. 8, pp. 5378-5388.
11. Cui J., Liu Y., Wang X. The Roles of glycodelin in cancer development and progression. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1685. doi: 10.3389/fimmu.2017.01685.
12. Dalton C.F., Laird S.M., Estdale S.E., Saravolos H.G., Li T.C. Endometrial protein PP14 and CA-125 in recurrent miscarriage patients; correlation with pregnancy outcome. *Hum. Reprod.*, 1998, Vol. 13, no. 11, pp. 3197-3202.
13. Dell A., Morris H.R., Easton R.L., Panico M., Patankar M., Oehniger S., Koistinen R., Koistinen H., Seppala M., Clark G.F. Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodelin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive and contraceptive activities. *J. Biol. Chem.*, 1995, Vol. 270, no. 41, pp. 24116-24126.
14. Dixit A., Balakrishnan B., Karande AA. Immunomodulatory activity of glycodelin: implications in allograft rejection. *Clin. Exp. Immunol.*, 2018, Vol. 192, no. 2, pp. 213-223.
15. Dundar B., Dincgez Cakmak B., Aydin Boyama B., Karadag B., Ozgen G. Maternal serum glycodelin levels in preeclampsia and its relationship with the severity of the disease. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 2018, Vol. 31, no. 21, pp. 2884-2892.
16. Faas M.M., de Vos P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta*, 2017, Vol. 56, pp. 44-52.
17. Flower D.R. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.*, 1996, Vol. 318, pp. 1-14.
18. Horne C.H., Paterson W.F., Sutcliffe R.G. Localization of alpha-uterine protein in human endometrium. *J. Reprod. Fertil.*, 1982, Vol. 65, no. 2, pp. 447-450.
19. Huhtala M.L., Seppala M., Narvanen A., Palomaki P., Julkunen M., Bohn H. Amino acid sequence homology between human placental protein 14 and beta-lactoglobulins from various species. *Endocrinology*, 1987, Vol. 120, iss. 6, pp. 2620-2622.
20. Jeschke U., Richter D.-U., Walzel H., Bergemann C., Mylonas I., Sharma S., Keil C., Briesse V., Friesse K. Stimulation of hCG and inhibition of hPL in isolated human trophoblast cells *in vitro* by glycodelin A. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2003, Vol. 268, no. 3, pp. 162-167.
21. Joshi S.G., Elbert K.M., Swartz D.P. Detection and synthesis of a progestagen-dependent protein in human endometrium. *J. Reprod. Fertil.*, 1980, Vol. 59, pp. 273-285.
22. Joshi S.G., Smith R.A., Stokes D.K. A progestagen-dependent endometrial protein in human amniotic fluid. *J. Reprod. Fertil.*, 1980, Vol. 60, pp. 317-321.
23. Joshi S. G. A progestagen-associated protein of the human endometrium: Basic studies and potential clinical applications. *J. Steroid Biochem.*, 1983, Vol. 19, no. 1 (3), pp. 751-757.
24. Julkunen M., Rutanen E.M., Koskimies A., Ranta T., Bohn H., Seppala M. Distribution of placental protein 14 in tissues and body fluids during pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1985, Vol. 92, pp. 1145-1151.
25. Julkunen M., Seppala M., Janne O.A. Complete amino acid sequence of human placental protein 14: a progesterone regulated uterine protein homologous to beta-lactoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, Vol. 85, no. 23, pp. 8845-8849.
26. Julkunen M., Wahlstrom T., Seppala M., Koistinen R., Koskimies A.I., Stenman U.H., Bohn H. Detection and localization of placental protein 14-like protein in human seminal plasma and in the male genital tract. *Arch. Androl.*, 1984, Vol. 12, pp. 59-67.
27. Julkunen M., Koistinen R., Sjoberg J., Rutanen E.M., Wahlstrom T., Seppala M. Secretory endometrium synthesizes placental protein 14. *Endocrinology*, 1986, Vol. 118, pp. 1782-1786.

28. Kämäräinen M., Halttunen M., Koistinen R., von Boguslawsky K., von Smitten K., Andersson L.C., Seppala M. Expression of glycodelin in human breast and breast cancer. *Int. J. Cancer*, 1999, Vol. 83, pp. 738-742.
29. Kämäräinen M., Riittinen L., Seppala M., Palotie A., Andersson L.C. Progesterone-associated endometrial protein – a constitutive marker of human erythroid precursors. *Blood*, 1994, Vol. 84, no. 2, pp. 467-473.
30. Koistinen H., Koistinen R., Dell A., Morris H.R., Easton R.L., Patankar M.S., Oehninger S., Clark G.F., Seppala M. Glycodelin from seminal plasma is a differentially glycosylated form of contraceptive glycodelin-A. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996, Vol. 2, no. 10, pp. 759-765.
31. Koistinen H., Koistinen R., Seppala M., Burova T.V., Choiset Y., Haertle T. Glycodelin and β -lactoglobulin, lipocalins with a high structural similarity, differ in ligand binding properties. *FEBS Letters*, 1999, Vol. 450, iss. 1-2, pp. 158-162.
32. Koopman L.A., Kopcow H.D., Rybalov B., Boyson J.E., Orange J.S., Schatz F., Masch R., Lockwood C.J., Schachter A.D., Park P.J., Strominger J.L. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, no. 8, pp. 1201-1212.
33. la Rocca C., Carbone F., Longobardi S., Matarese G. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunol. Lett.*, 2014, Vol. 162 (1 Pt A), pp. 41-48.
34. Lam K.K., Chiu P.C., Chung M.K., Lee C.L., Lee K.F., Koistinen R., Koistinen H., Seppala M., Ho P.C., Yeung W.S. Glycodelin-A as a modulator of trophoblast invasion. *Hum. Reprod.*, 2009, Vol. 24.
35. Lapid K., Sharon N. Meet the multifunctional and sexy glycoforms of glycodelin. *Glycobiology*, 2006, Vol. 16, no. 3, pp. 39R-45R.
36. Lee C., Vijayan M., Koistinen H., Seppala M., Ng E.H.Y., Yeung W.S.B., Chiu P.C.N. T19: The regulatory roles of decidual glycodelin-A on trophoblast and immune cell functions during early pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2018, Vol. 80, pp. 28-28.
37. Lee C.L., Chiu P.C., Lam K.K., Chan R.W., Chu I.K., Koistinen R., Koistinen H., Seppala M., Lee K.F., Yeung W.S. Glycodelin-A modulates cytokine production of peripheral blood natural killer cells. *Fertil Steril.*, 2010, Vol. 94, no. 2, pp. 769-771.
38. Lee C.L., Chiu P.C., Lam K.K., Siu S.O., Chu I.K., Koistinen R., Koistinen H., Seppala M., Lee K.F., Yeung W.S. Differential actions of glycodelin-A on Th1 and Th2 cells: a paracrine mechanism that could produce the Th2 dominant environment during pregnancy. *Hum. Reprod.*, 2011, Vol. 26, pp. 517-526.
39. Lee C.L., Lam E.Y., Lam K.K., Koistinen H., Seppala M., Ng E.H., Yeung W.S., Chiu P.C. Glycodelin-A stimulates interleukin-6 secretion by human monocytes and macrophages through L-selectin and the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 2012, Vol. 287, no. 44, pp. 36999-37009.
40. Lee C.L., Lam K.K.W., Vijayan M., Koistinen H., Seppala M., Ng E.H.Y., Yeung W.S.B., Chiu P.C.N. The pleiotropic effect of glycodelin-A in early pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 75, pp. 290-297.
41. Lee C.L., Pang P.C., Yeung W.S., Tissot B., Panico M., Lao T.T., Chu I.K., Lee K.F., Chung M.K., Lam K.K., Koistinen R., Koistinen H., Seppala M., Morris H.R., Dell A., Chiu P.C. Effects of differential glycosylation of glycodelins on lymphocyte survival. *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284, no. 22, pp. 15084-15096.
42. Li M., Huang S.J. Innate immunity, coagulation and placenta-related adverse pregnancy outcomes. *Thromb. Res.*, 2009, Vol. 124, no. 6, pp. 656-662.
43. Miller R.E., Fayen J.D., Chakraborty S., Weber M.C., Tykocinski M.L. A receptor for the lipocalin placental protein 14 on human monocytes. *FEBS Letter.*, 1998, Vol. 436, iss. 3, pp. 455-460.
44. Mishan-Eisenberg G., Borovsky Z., Weber M.C., Gazit R., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. Differential regulation of Th1/Th2 cytokine responses by placental protein 14. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 9, pp. 5524-5530.
45. Morris H.R., Dell A., Easton R.L., Panico M., Koistinen H., Koistinen R., Oehninger S., Patankar M., Seppala M., Clark G.F. Gender-specific glycosylation of human glycodelin affects its contraceptive activity. *J. Biol. Chem.*, 1997, Vol. 272, pp. 32159-32167.
46. Morrow D.M., Xiong N., Getty R.R., Ratajczak M.Z., Morgan D., Seppala M., Riittinen L., Gewirtz A.M., Tykocinski M.L. Hematopoietic placental protein 14. An immunosuppressive factor in cells of the megakaryocytic lineage. *Am. J. Pathol.*, 1994, Vol. 145, pp. 1485-1495.
47. Mukhopadhyay D., SundarRaj S., Alok A., Karande A.A. Glycodelin A, not glycodelin S, is apoptotically active. Relevance of sialic acid modification. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, pp. 8577-8584.
48. Mukhopadhyay D., Sundereshan S., Rao C., Karande A.A. Placental protein 14 induces apoptosis in T cells but not in monocytes. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, no. 30, pp. 28268-28273.
49. Ochanuna Z., Geiger-Maor A., Dembinsky-Vaknin A., Karussis D., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. Inhibition of effector function but not T cell activation and increase in FoxP3 expression in T cells differentiated in the presence of PP14. *PLoS ONE*, 2010, Vol. 5, no. 9, e12868. doi: 10.1371/journal.pone.0012868.
50. Okamoto N., Uchida A., Takakura K., Kariya Y., Kanzaki H., Riittinen L., Koistinen R., Seppala M., Mori T. Suppression by human placental protein 14 of natural killer cell activity. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1991, Vol. 26, no. 4, pp. 137-142.
51. Pan H.-F., Leng R.-X., Zhang N., Tao J.-H., Ye D.-Q. Role and therapeutic potential of Glycodelin A in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.*, 2011, Vol. 31, no. 5, pp. 563-565.
52. Pockley A.G., Bolton A.E. Placental protein 14 (PP14) inhibits the synthesis of interleukin-2 and the release of soluble interleukin-2 receptors from phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 1989, Vol. 77, no. 2, pp. 252-256.

53. Pockley A.G., Bolton A.E. The effect of human placental protein 14 (PP14) on the production of interleukin-1 from mitogenically stimulated mononuclear cell cultures. *Immunology*, 1990, Vol. 69, no. 2, pp. 277-281.
54. Pockley A.G., Mowles E.A., Stoker R.J., Westwood O.M., Chapman M.G., Bolton A.E. Suppression of *in vitro* lymphocyte reactivity to phytohemagglutinin by placental protein 14. *J. Reprod. Immunol.*, 1988, Vol. 13, no. 1, pp. 31-39.
55. Rachmilewitz J., Riely G.J., Huang J.H., Chen A., Tykocinski M.L. A rheostatic mechanism for T cell inhibition based on elevation of activation thresholds. *Blood*, 2001, Vol. 98, no. 13, pp. 3727-3732.
56. Rachmilewitz J., Riely G.J., Tykocinski M.L. Placental protein 14 functions as a direct T cell inhibitor. *Cell Immunol.*, 1999, Vol. 191, no. 1, pp. 26-33.
57. Ren S., Howell P.M. Jr., Han Y., Wang J., Liu M., Wang Y., Quan G., Du W., Fang L., Riker A.I. Overexpression of the progesterone-associated endometrial protein gene is associated with microphthalmia-associated transcription factor in human melanoma. *Ochsner J.*, 2011, Vol. 11, no. 3, pp. 212-219.
58. Riquelme P., Haarer J., Kammler A., Walter L., Tomiuk S., Ahrens N., Wege A.K., Goetze I., Zecher D., Banas B., Spang R., Fandrich F., Lutz M. B., Sawitzki B., Schlitt H.J., Ochando J., Geissler E.K., Hutchinson J.A. TIGIT⁺ iTregs elicited by human regulatory macrophages control T cell immunity. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, no. 1, 2858. doi: 10.1038/s41467-018-05167-8.
59. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 6, pp. 601-610.
60. Santner-Nanan B., Peek M.J., Khanam R., Richarts L., Zhu E., Fazekas de St. Groth. B., Nanan R. Systemic increase in the ratio between Foxp3⁺ and IL-17-producing CD4⁺ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 11, pp. 7023-7030.
61. Scherjon S., Lashley L., Hoorn M.L., Claas F. Fetus specific T cell modulation during fertilization, implantation and pregnancy. *Placenta*, 2011, Vol. 32, Suppl. 4, pp. S291-297.
62. Schneider M., Meister M., Muley T. Glycodelin as diagnostic and prognostic marker and for monitoring treatment of lung diseases. European patent application, Bulletin, 2016.06, EP2982765A1.
63. Schneider M.A., Granzow M., Warth A., Schnabel P.A., Thomas M., Herth F.J., Dienemann H., Muley T., Meister M. Glycodelin A new Biomarker with immunomodulatory functions in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2015, Vol. 21, no. 15, pp. 3529-3540.
64. Schneider M.A., Muley T., Kahn N.C., Warth A., Thomas M., Herth F.J.F., Dienemann H., Meister M. Glycodelin is a potential novel follow-up biomarker for malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 44, pp. 71285-71297.
65. Scholz C., Heublein S., Lenhard M., Friese K., Mayr D., Jeschke U. Glycodelin A is a prognostic marker to predict poor outcome in advanced stage ovarian cancer patients. *BMC Res. Notes*, 2012, Vol. 5, p. 551.
66. Scholz C., Toth B., Brunnhuber R., Rampf E., Weissenbacher T., Santoso L., Friese K., Jeschke U. Glycodelin A induces a tolerogenic phenotype in monocyte-derived dendritic cells *in vitro*. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2008, Vol. 60, no. 6, pp. 501-512.
67. Seppälä M., Koistinen H., Koistinen R. Glycodelins. *Trends. Endocrinol. Metab.*, 2001, Vol. 12, no. 3, pp. 111-117.
68. Seppälä M., Koistinen H., Koistinen R., Chiu P.C., Yeung W.S.B. Glycosylation related actions of glycodelin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations. *Hum. Reprod. Update*, 2007, Vol. 13, no. 3, pp. 275-287.
69. Seppälä M., Taylor R.N., Koistinen H., Koistinen R., Milgrom E. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr. Rev.*, 2002, Vol. 23, no. 4, pp. 401-430.
70. Soni C., Karande A.A. Glycodelin A suppresses the cytolytic activity of CD8⁺ T lymphocytes. *Mol. Immunol.*, 2010, Vol. 47, no. 15, pp. 2458-2466.
71. Soni C., Karande A.A. Glycodelin-A interferes with IL-2/IL-2R signalling to induce cell growth arrest, loss of effector functions and apoptosis in T-lymphocytes. *Hum. Reprod.*, 2012, Vol. 27, no. 4, pp. 1005-1015.
72. Sorensen S., Myrholm V., Nguyen T.H., Aaslo P., Hansen Y.B. Affinity purification of native glycodelin from amniotic fluid for biological investigations and development of a glycodelin ELISA for clinical studies. *Protein Expr. Purif.*, 2017, Vol. 130, pp. 73-80.
73. Sundar Raj S., Mukhopadhyay D., Karande A.A. Glycodelin A triggers mitochondrial stress and apoptosis in T cells by a mechanism distinct and independent of TCR signaling. *Mol. Immunol.*, 2008, Vol. 45, no. 8, pp. 2391-2400.
74. Sutcliffe R.G., Bolton A.E., Sharp F., Nicholson L.V.B., MacKinnon R. Purification of human alpha uterine protein. *J. Reprod. Fert.*, 1980, Vol. 58, no. 2, pp. 435-442.
75. Taherippanah R., Zamaniyan M., Akhondzadeh S., Taherippanah A., Malih N. Uterine and serum glycodelin concentration in recurrent implantation failure versus normal fertile women on implantation window. *Int. J. Women's Health Reprod. Sci.*, 2017, Vol. 5, no. 2, pp. 103-106.
76. Toth B., Rogenhofer N., Jeschke U., Scholz C., Wurfel W., Thaler C.J., Makrigiannakis A. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 85, no. 1, pp. 24-32.
77. Toth B., Roth K., Kunert-Keil C., Scholz C., Schulze S., Mylonas I., Friese K., Jeschke U. Glycodelin protein and mRNA is downregulated in human first trimester abortion and partially upregulated in mole pregnancy. *J. Histochem. Cytochem.*, 2008, Vol. 56, no. 5, pp. 477-485.

78. Tse J.Y., Chiu P.C., Lee K.F., Seppala M., Koistinen H., Koistinen R., Yao Y.Q., Yeung W.S. The synthesis and fate of glycodelin in human ovary during folliculogenesis. *Mol. Hum. Reprod.*, 2002, Vol. 8, no. 2, pp. 142-148.
79. Vigne J.L., Hornung D., Mueller M.D., Taylor R.N. Purification and characterization of an immunomodulatory endometrial protein, glycodelin. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, no. 20, pp. 17101-17105.
80. Vijayan M., Lee C.-L., Chiu P.C.N., Lee K.F. P56 Glycodelin-A polarised human macrophages exhibit characteristics and functions similar to decidual macrophages. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2018, Vol. 80, pp. 81-82.
81. Waites G.T., Bell S.C. Immunohistological localization of human pregnancy-associated endometrial alpha 2-globulin (alpha 2-PEG), a glycosylated beta-lactoglobulin homologue, in the decidua and placenta during pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, 1989, Vol. 87, no. 1, pp. 291-300.
82. Weber R., Meister M., Muley T., Thomas M., Sultmann H., Warth A., Winter H., Hearth F.J.R., Schneider M.A. Pathways regulating the expression of the immunomodulatory protein glycodelin in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.*, 2019, Vol. 54, no. 2, pp. 515-526.
83. Yaniv E., Borovsky Z., Mishan-Eisenberg G., Rachmilewitz J. Placental protein 14 regulates selective B cell responses. *Cell Immunol.*, 2003, Vol. 222, no. 2, pp. 156-163.
84. Yeung W.S., Lee K.F., Koistinen R., Koistinen H., Seppala M., Ho P.C., Chiu P.C. Effects of glycodelins on functional competence of spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.*, 2009, Vol. 83, no. 1-2, pp. 26-30.
85. Yeung W.S., Lee K.F., Koistinen R., Koistinen H., Seppala M., Ho P.C., Chiu P.C. Glycodelin: a molecule with multi-functions on spermatozoa. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 2007, Vol. 63, pp. 143-151.

Авторы:

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

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

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

Authors:

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

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

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

Храмцов П.В. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

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

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

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

Поступила 07.03.2019
Принята к печати 12.08.2019

Received 07.03.2019
Accepted 12.08.2019

РОЛЬ ХЕМОКИНОВОГО РЕЦЕПТОРА CXCR3 И ЕГО ЛИГАНДОВ ПРИ НЕКОТОРЫХ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Арсентьева Н.А.¹, Семенов А.В.^{1,2}, Жебрун Д.А.³, Васильева Е.В.⁴,
Тотолян Арег А.^{1,2}

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

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

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Bostongene, Москва, Россия

Резюме. Хемокины представляют особое семейство цитокинов, основная функция которых состоит в контроле миграции клеток, они служат ключевыми игроками в реакциях врожденного и адаптивного иммунного ответа. Направленный хемотаксис специфических субпопуляций лейкоцитов участвует не только в поддержании гомеостаза, но также в развитии иммунопатологических состояний, таких как рак, воспаление, инфекция, аллергия и аутоиммунные расстройства. Хемокины являются плейотропными молекулами, участвующими в физиологических и патофизиологических процессах. Например, хемокиновый рецептор CXCR3 экспрессируется на различных типах клеток: активированных Т- и В-лимфоцитах, натуральных киллерных клетках, эозинофилах и нейтрофилах, дендритных клетках, фибробластах, эндотелиальных и эпителиальных клетках, что обуславливает широкий спектр его функциональной активности. Рецептор CXCR3 представляет собой серпентиновый трансмембранный белок, в настоящее время известно три варианта CXCR3: CXCR3A, CXCR3B и CXCR3-alt. Лиганды рецептора CXCR3 включают IFN γ -зависимые хемокины: CXCL9, CXCL10, CXCL11 и хемокины, секретируемые тромбоцитами: CXCL4, CXCL4L1. Лиганды рецептора CXCR3 представляют собой отдельную группу ангиостатических хемокинов, поскольку для них характерно отсутствие аминокислотной последовательности Glu-Leu-Arg (ELR-мотива). IFN γ -зависимые лиганды рецептора CXCR3 являются провоспалительными хемокинами, они осуществляют свой хемотаксический потенциал за счет направленной миграции лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3, к участкам воспаления, в основном они опосредуют хемотаксис активированных Т-клеток и их поляризацию. Молекулы хемокинов могут подвергаться посттрансляционным модификациям, что оказывает влияние на их функции. Благодаря своей полифункциональности, лиганды CXCR3 играют важную роль в патогенезе многих заболеваний. В настоящем обзоре представлены данные о роли лигандов CXCR3 в иммунопатогенезе ряда заболеваний, в том числе результаты наших исследований хронического вирусного гепатита С, ревматоидного артрита и туберкулеза легких. Дополнительно в статье обсуждается значимость хемокинов как информативных биомаркеров, которые могут быть полезны для лабораторной диагностики различных иммунопатологических состояний. Этот обзор иллюстрирует универсальность IFN γ -зависимых хемокинов как медиаторов иммунных реакций при различных за-

Адрес для переписки:

Арсентьева Наталья Александровна
ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (904) 646-57-58.
E-mail: arsentieva_n.a@bk.ru

Address for correspondence:

Arsentyeva Natalya A.
St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone: 7 (904) 646-57-58.
E-mail: arsentieva_n.a@bk.ru

Образец цитирования:

Н.А. Арсентьева, А.В. Семенов, Д.А. Жебрун, Е.В. Васильева, Арег А. Тотолян «Роль хемокинового рецептора CXCR3 и его лигандов при некоторых иммунопатологических состояниях» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 617-632.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-617-632

© Арсентьева Н.А. и соавт., 2019

For citation:

N.A. Arsentieva, A.V. Semenov, D.A. Zhebrun, E.V. Vasilyeva, Areg A. Totolyan "Role of CXCR3 chemokine receptor and its ligands in certain diseases", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 617-632. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-617-632

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-617-632

болеваниях. Исследование лигандов CXCR3, их изоформ и рецепторов, взаимодействий между собой и с рецепторами может внести существенный вклад в наше понимание в области сети хемокинов. Понимание системы IFN γ -зависимых хемокинов может иметь клиническое значение, как с точки зрения диагностики, так и с терапевтической точки зрения.

Ключевые слова: хемокины, CXCR3, IFN γ -зависимые лиганды, гепатит С, ревматоидный артрит, туберкулез

ROLE OF CXCR3 CHEMOKINE RECEPTOR AND ITS LIGANDS IN CERTAIN DISEASES

Arsentieva N.A.^a, Semenov A.V.^{a, b}, Zhebrun D.A.^c, Vasilyeva E.V.^d,
Totolyan Areg A.^{a, b}

^a St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

^d Bostongene, Moscow, Russian Federation

Abstract. Chemokines are a special family of cytokines whose main function is to control cell migration; they are key players in the innate and adaptive immune responses. Directed chemotaxis of specific leukocyte subpopulations is necessary not only to maintain homeostasis, but also in development of some immunopathological conditions such as cancer, inflammation, infection, allergies and autoimmune disorders. Chemokines are pleiotropic molecules that are involved in physiological and pathophysiological processes. For example, the CXCR3 chemokine receptor is expressed on various cells: activated T and B lymphocytes, natural killers, eosinophils and neutrophils, dendritic cells, fibroblasts, endothelial and epithelial cells. Hence, CXCR3 and its ligands have a wide range of functional activity. CXCR3 ligands are the IFN γ -induced chemokines: CXCL9, CXCL10, CXCL11, and platelet-derived chemokines: CXCL4, CXCL4L1. All the CXCR3 ligands share common angiostatic properties due to lack of the Glu-Leu-Arg (ELR) motif. IFN γ -induced ligands of the CXCR3 are proinflammatory chemokines, they mainly recruit activated T cells and exert an effect on T cell polarization. Due to wide spectrum of biological activity, the ligands of CXCR3 receptor are involved in pathogenesis of various disorders, such as inflammation, infection, cancer, allergies and autoimmune disorders. In this review, we discuss the role of CXCR3 ligands in immunopathogenesis of various diseases, including the results of our studies in chronic hepatitis C, rheumatoid arthritis and pulmonary tuberculosis. Moreover, we have also discussed the potential laboratory diagnostic applicability of the chemokines in various diseases. This review illustrates a universal role of IFN γ -induced chemokines as mediators of immune responses in various diseases. The studies of CXCR3 ligands, their isoforms and receptors, interactions between themselves and with their receptors can provide a significant contribution to our understanding of the chemokine network. Understanding the system of IFN γ -dependent chemokines may have clinical implications, both for diagnostic tasks, and for therapeutic purposes.

Keywords: chemokines, CXCR3, IFN γ -induced ligands, hepatitis C, rheumatoid arthritis, tuberculosis

Введение

Первоначально хемотаксические цитокины, или хемокины, были обнаружены как факторы, привлекающие лейкоциты в очаг воспаления, что и дало им такое название. Молекулы хемокинов представляют собой небольшие белки с молекулярной массой 8-10 кДа. На сегодняшний день хемокины считаются плеiotропными молекулами, которые участвуют в физиологических и патологических процессах [31, 87, 88, 107]. Поскольку хемокины являются ключевыми игроками в реакциях врожденного и адаптивного иммунного ответа, то очевидно, что направленный хемотаксис специфических субпопуляций лейкоцитов участвует не только в поддержании гомеостаза, включая хоуминг иммунных клеток, эмбриогенез и ангиогенез, но также в патофизиологических процессах, таких как рак, воспале-

ние, инфекция, аллергия и аутоиммунные расстройства [34, 51, 77, 89].

Хемокины взаимодействуют со специфическими рецепторами, которые интернализованы на поверхности клеток и обладают высоким сродством к лигандам. Рецепторы хемокинов являются трансмембранными G-сопряженными белками (GPCR — G protein-coupled receptors) [21]. Специфичность хемокиновых рецепторов характеризуется вырожденностью: с одним и тем же рецептором взаимодействует несколько хемокинов, и только рецепторы конститутивных хемокинов имеют один лиганд. С другой стороны, системе хемокинов свойственна избыточность: один и тот же хемокин может взаимодействовать с несколькими разными рецепторами. Позднее были обнаружены атипичные хемокиновые рецепторы (ACKR — atypical chemokine receptors), очень близкие к классическим G-белкам, они

связывают хемокины с высокой аффинностью, но не передают сигнал через G-белки [24]. Дополнительно, глюкозаминогликаны (GAG) влияют на функцию хемокинов, в основном задерживая их на поверхности эндотелиальных клеток для представления проходящим лейкоцитам. На взаимодействие рецептора и хемокина могут оказывать влияние модулирующие факторы, такие как транскрипция генов, стабильность мРНК, альтернативный сплайсинг генов, взаимный синергизм или антагонизм и посттрансляционные модификации [68, 71, 73]. Таким образом, конечное функционирование хемокинов *in vivo* является результатом сложных многочисленных регулирующих механизмов, однако из-за уникальных временных и пространственных паттернов экспрессии в системе хемокинов степень специфичности более важна, чем избыточность [44].

Хемокины можно разделить в соответствии с их функциональной активностью на два семейства: воспалительные и гомеостатические. Тем не менее чаще семейства хемокинов классифицируют по структуре. Так, выделяют 4 семейства хемокинов в зависимости от расположения консервативных цистеинов в белковой молекуле: CXC, CC, CX3C и C, где C обозначает остатки цистеина, а X — любой другой аминокислотный остаток, разделяющий цистеины [21, 25]. CC хемокины содержат два N-концевых соседних цистеина, для CXC хемокинов характерно включение одной вариативной аминокислоты «X», разделяющей N-концевые цистеины. Вместе классы CC и CXC составляют большинство хемокинов. Хемокины C класса являются исключением, они содержат только два цистеина вместо четырех и представлены двумя хемокинами, к CX3C-хемокинам относится один представитель — фракталин. Обозначают хемокины в соответствии с их классовой принадлежностью: CCL, CXCL, CX3CL или XCL, где «L» обозначает лиганд, за которым следует идентификационное число. Тем не менее большинство хемокинов также имеют общие или исторические названия, отражающие характерные функции.

В зависимости от наличия перед первым остатком цистеина последовательности Glu-Leu-Arg (ELR) среди CXC-хемокинов выделяют 2 подгруппы. Наличие последовательности ELR обуславливает способность хемокинов стимулировать ангиогенез, воздействуя на эндотелиальные клетки. Эта последовательность характерна для семи CXC-хемокинов (CXCL1-3 и CXCL5-8) и отсутствует у остальных CXC-хемокинов, обладающих ангиостатическими функциями [25, 87].

Общим рецептором для всех ELR⁺ CXC-хемокинов является CXCR2, кроме того, хемокины CXCL6 и CXCL8 могут передавать сигнал через рецептор CXCR1. Активация этих рецепторов является результатом хемотаксиса нейтрофилов. К тому же лиганды рецептора CXCR2 и лиганд CXCL12, уникальный для рецептора CXCR4,

стимулируют ангиогенез [42, 51]. Единственным проангиогенным хемокином, лишенным ELR-мотива, является CXCL12, который альтернативно связывает рецепторы CXCR4 и ACKR3/CXCR7 [35].

Большинство CXC-хемокинов, которые не имеют ELR-мотив, взаимодействуют с хемокиновым рецептором CXCR3 и являются ингибиторами ангиогенеза [87]. Среди них выделяют хемокины CXCL4 и CXCL4L1, секретируемые тромбоцитами и CXCL9, CXCL10 и CXCL11, для которых основным индуктором служит интерферон- γ (IFN γ) [99]. Таким образом, лиганды рецептора CXCR3 представляют собой отдельную группу ангиостатических хемокинов. Кроме этого, они осуществляют свой хемотаксический потенциал за счет направленной миграции лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3, к участкам воспаления. Также большинство лигандов CXCR3 способны связываться с некоторыми GAG, представленными на поверхности эндотелиальных клеток [45, 66, 93]. Таким образом, они конкурируют с различными ангиогенными факторами роста, такими как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста фибробластов (FGF2) для связывания с GAG и препятствуют связыванию этих факторов роста с их сигнальными рецепторами [92]. Многообразие функций IFN γ -зависимых лигандов рецептора CXCR3, несомненно, имеет значение в развитии многих заболеваний, в том числе аллергических, инфекционных и аутоиммунных. В настоящем обзоре мы рассмотрим рецептор CXCR3 и его IFN γ -зависимые лиганды: CXCL9, CXCL10 и CXCL11 в аспекте их участия при различных заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы.

CXCR3 и его лиганды

Хемокиновый рецептор CXCR3

Впервые хемокиновый рецептор человека CXCR3 был описан в 1996 году [62]. Соответствующий ген был найден два года спустя и, в отличие от других хемокиновых рецепторов, он находится в X хромосоме, в области q13.1 [63]. Позднее рецептор CXCR3 был назван CXCR3A, поскольку были обнаружены еще два варианта альтернативного сплайсинга гена *cxcr3*: CXCR3B и CXCR3-alt.

CXCR3A наиболее распространенная форма, состоит из 368 аминокислот и взаимодействует с CXCL9, CXCL10 и CXCL11, что вызывает хемотаксис и мобилизацию внутриклеточного кальция. CXCL11 и CXCL10 индуцируют активацию ингибиторного типа G α белков (G α i), активацию β -аррестина-1 и β -аррестина-2 и фосфорилирование ERK1/2 [28]. Большинство клеток, включая лейкоциты, преимущественно экспрессируют вариант рецептора CXCR3A. Этот белок кодирован двумя экзонами, разделенными одним интроном, сопряжен с субъединицей G α i G-белка, что позволяет передавать промиграци-

онные и пролиферативные сигналы и повышает уровень внутриклеточного кальция [62, 63].

Напротив, эндотелиальные клетки исключительно экспрессируют CXCR3B, который ассоциирован с субъединицей Gαs G-белка, инициируя противоположные сигнальные каскады [58]. CXCR3B представляет собой белок, состоящий из 415 аминокислот, продукт альтернативного сплайсинга на 5'-конце второго экзона, содержит уникальный N-концевой хвост из 51 аминокислоты, которые заменяют четыре N-концевых остатка CXCR3A. Большинство CXCR3A-позитивных клеток также демонстрируют низкую экспрессию CXCR3B. Существование двух предположительно функционально разных вариантов может объяснить ангиостатический эффект, приписываемый лигандам CXCR3.

Кроме того, позднее был идентифицирован третий вариант альтернативного сплайсинга рецептора CXCR3, обусловленный пропуском экзона, он называется CXCR3-alt [37]. CXCR3-alt состоит из 267 аминокислот. Этот вариант показывает значительные структурные и функциональные различия, содержит только четыре или пять трансмембранных доменов [37]. Изоформа рецептора CXCR3-alt сохраняет сродство исключительно к CXCL11, что приводит к умеренному увеличению уровня внутриклеточного кальция и хемотаксису [37, 54].

Рецептор CXCR3 представляет собой серпентиновый трансмембранный белок семейства GPCR, классифицируемый на основе строения его лигандов как рецептор типа CXCR. Изначально этот рецептор был обнаружен на активированных Т-лимфоцитах, селективный в отношении ELR-негативных CXCR-хемокинов CXCL9 и CXCL10 [62]. Было показано, что в культуре клеток процент Т-лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3, увеличивается до 95% под воздействием IL-2 и фитогемагглютинаина (РНА) [63]. Активация Т-лимфоцитов, соответственно, индуцирует клеточную чувствительность к лигандам CXCR3. Т-лимфоциты представляют собой гетерогенную группу клеток и включают: CD4⁺Т-хелперные клетки (Th), CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), а также Т-клетки памяти, либо CD4⁺, либо CD8⁺, которые демонстрируют повышенную экспрессию CXCR3 в отличие от их наивных предшественников [17, 44]. Среди популяции Th-клеток, рецептор CXCR3 представлен в основном на Th1. Установлено, что фактор транскрипции T-bet, отвечающий за дифференцировку наивных Т-клеток в Th1 и CTL, непосредственно способствует экспрессии CXCR3 [94, 96]. Также транскрипционный фактор T-bet индуцирует секрецию IFNγ и способствует экспрессии рецептора CXCR3 на субпопуляции Т-регуляторных клеток [53]. Позднее было показано, что рецептор CXCR3 представлен на субпопуляции γδ-Т-клеток, В-лимфоцитах, естественных клеток-киллеров (NK), Т-натуральных киллеров (ТНК) и дендритных клетках [43, 62, 74, 81]. Кроме того,

экспрессия CXCR3 была обнаружена на различных клетках, которые напрямую не связаны с иммунной системой. К ним относятся фибробласты, эндотелиальные и эпителиальные клетки, а также астроциты и клетки гладких мышц [43]. Важно отметить, что рецептор CXCR3 был обнаружен на эозинофилах и нейтрофилах, участвующих в воспалительной реакции [46, 48]. Таким образом, положение о том, что CXCR3 отсутствует на гранулоцитах, требует пересмотра.

Лиганды CXCR3 обладают широким спектром биологической активности, воздействуя на различные типы клеток, экспрессирующие CXCR3 (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). Среди IFNγ-зависимых агонистов CXCR3, CXCL10 проявляет самую высокую аффинность связывания с CXCR3B [48]. Все IFN-индуцируемые лиганды CXCR3 проявляют более высокое сродство к классическому рецептору CXCR3A, чем к CXCR3B.

Из-за ограниченного числа исследований с изоформ-специфическими антителами точный вклад вариантов сплайсинга CXCR3 в общую сеть IFNγ-зависимых лигандов CXCR3 в норме и при патологии остается в значительной степени неизвестным. Показано, что в очаге воспаления присутствуют различные варианты хемокинового рецептора и его лигандов, а также может быть коэкспрессия рецепторов отдельными клетками [58]. Такой феномен вызывает дополнительное затруднение в понимании специфического вклада *in vivo* вариантов рецепторного сплайсинга при взаимодействии CXCR3 с лигандами.

Таким образом, среди CXCR3-связывающих хемокинов можно четко выделить две группы: с одной стороны IFNγ-индуцируемые хемокины CXCL9, CXCL10 и CXCL11, которые представляют собой традиционные лиганды CXCR3, с другой – хемокины, секретируемые тромбоцитами: CXCL4 и CXCL4L1, которые представляют отдельную пару лигандов CXCR3.

IFNγ-зависимые лиганды

Хемокины CXCL9, CXCL10 и CXCL11 являются IFNγ-зависимым лигандами рецептора CXCR3. Первым из них был открыт CXCL10. В 1985 году было проведено исследование воспаления, вызванного IFNγ, в результате которого был обнаружен ген, кодирующий белок с высокой степенью гомологии с белками тромбоцитов [65]. Молекулярная масса белка составляла примерно 10 кДа, и он был назван «IFNγ-индуцируемый белок 10 кДа» (IP-10). Пять лет спустя, в 1990 году, была обнаружена мРНК, кодирующая другой белок, подобный фактору тромбоцитов 4, который селективно был индуцирован IFNγ и не активировался под действием липополисахарида и других макрофагальных факторов, таких как IFNα, IFNβ [41]. Авторы предложили назвать эту молекулу «монокин, индуцированный IFNγ» (MIG). Стало ясно, что IP-10 и MIG очень схожие белки, их соответствующие гены расположены в хромосоме 4 в области q21.1, а их стартовые

кодона разделены не более чем 16 т.п.н. [60]. Последующие исследования показали, что IP-10 и MIG являются хемотаксическими цитокинами, или хемокинами, в которых отсутствует консервативный аминокислотный мотив ELR, они содержат два консервативных остатка цистеина, разделенных одной случайной аминокислотой «X» в их N-концевых последовательностях. Оба хемокина взаимодействуют с рецептором CXCR3, который изначально считался специфическим для них [62]. Впоследствии две исследовательские группы идентифицировали третий ELR-отрицательный, IFN γ -индуцируемый CXС-хемокин, в опытах по стимуляции астроцитов и кератиноцитов [33, 97]. Этот белок был тесно связан с IP-10 и MIG и показывал даже более высокое сродство к CXCR3. Этот третий IFN γ -зависимый лиганд CXCR3 был назван «IFN γ -индуцибельный белок-9» (IP-9), или «IFN-индуцибельный Т-клеточный α -хемоаттрактант» (I-TAC), для него был найден соответствующий ген в том же 4q21.1 хромосомном мини-кластере кератиноцитов [33]. В дальнейшем в соответствии с номенклатурой хемокинов MIG, IP-10 и I-TAC (IP-9) были переименованы в CXCL9, CXCL10 и CXCL11, соответственно, [25] и обычно упоминаются как IFN γ -зависимые лиганды CXCR3.

IFN γ -зависимые хемокины демонстрируют примерно 40% гомологии аминокислотных последовательностей между собой и секретируются различными типами клеток в ответ на стимуляцию специфическими цитокинами и лигандами Toll-подобного рецептора (TLR) или их комбинациями [46, 47]. Имея общие функции при развитии воспалительной реакции, они совместно контролируют миграцию лейкоцитов в очаг воспаления [14]. CXCL9 и CXCL11 обычно секретируются мононуклеарными клетками периферической крови (МНПК), макрофагами (CXCL9) и астроцитами (CXCL11) [42, 44] (табл. 1). Среди лейкоцитов, которые преимущественно продуцируют CXCL10, следует отметить Т-клетки и моноциты [64, 83].

Было продемонстрировано, что эти хемокины по-разному взаимодействуют с хемокиновым рецептором: имеют разные сайты связывания, различную аффинность, а также эффективность. Как правило, CXCL11 имеет самое высокое сродство к CXCR3A, тогда как CXCL9 — самое низкое. CXCL11 также является наиболее мощным из IFN γ -зависимых лигандов CXCR3, на основании его воздействия на выброс внутриклеточного кальция и по хемотаксическому ответу клеток, экспрессирующих CXCR3A [33]. Наибольшей чувствительностью к различным стимулам обладает CXCL10, поэтому он связан со множеством физиологических, а также патологических состояний [44]. CXCL10 является наиболее полно исследованным лигандом CXCR3 и часто служит прототипным примером IFN γ -индуцируемых хемокинов.

Лиганды CXCR3, секретируемые тромбоцитами

Хемокины CXCL4 и CXCL4L1 относят к тромбоцитарным факторам, которые секретируются при активации тромбоцитов. Они демонстрируют гомологичность 37% с аминокислотной последовательностью хемокина CXCL10. CXCL4L1 является неаллельным вариантом CXCL4, между собой эти хемокины показывают поразительную идентичность аминокислот — 96%, только три аминокислотных замены вблизи С-конца различают зрелые варианты [55]. И все же этой небольшой разницы достаточно, чтобы изменить трехмерную структуру, благодаря которой CXCL4L1 уменьшает сродство к GAG, что в результате повышает его ангиостатический потенциал.

С другой стороны, CXCL4 и CXCL4L1 явно отличаются от других лигандов CXCR3. Во-первых, они имеют слабое сродство к рецепторам CXCR3A и CXCR3B, во-вторых, их секреция не зависит от IFN γ . Более того, они в основном секретируются активированными тромбоцитами, поэтому получили название лиганды CXCR3, секретируемые тромбоцитами [59]. Эти хемокины способствуют свертыванию крови, замедляя действие гепариноподобных молекул. Также CXCL4 и CXCL4L1 являются ингибиторами ангиогенеза.

Лиганды CXCR3 при различных заболеваниях

Благодаря своей полифункциональности, лиганды CXCR3 играют важную роль в патогенезе многих заболеваний (табл. 2). Участие всех лигандов CXCR3 показано при различных патологиях, связанных с ангиогенезом, а также иммунологическими нарушениями, причем последние в основном связаны с аутоиммунитетом или инфекцией [26]. Также IFN γ -зависимые хемокины вовлечены в биологию опухолей и гематологические злокачественные новообразования [99]. При этом роль этих хемокинов при опухолевых заболеваниях далеко не однозначна. Кроме этого, IFN γ -зависимые лиганды CXCR3 участвуют в процессах фиброгенеза [67]. Не стоит забывать о том, что IFN γ -зависимые хемокины могут выступать в роли антагонистов по отношению к рецепторам CCR3 и CCR5 и их лигандам.

Ниже приведены примеры заболеваний, в иммунопатогенез которых вовлечены хемокины CXCL9, CXCL10 или CXCL11. Для лигандов рецептора CXCR3 характерно уникальное сочетание функций воспалительных и ангиостатических хемокинов, и, соответственно, они играют исключительную роль в норме и патологии, а также нашли свое применение в лабораторной диагностике и терапии целого ряда заболеваний.

Хронический вирусный гепатит С (ХВГС)

Для ХВГС характерна длительная персистенция вируса гепатита С (ВГС) в организме и высокая частота хронизации инфекционного процесса (до 80%), нарушение нормального течения иммунного ответа, прогрессирование заболевания в цирроз и рак печени. Естественную элиминацию вируса гепатита С связывают

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛИГАНДОВ ХЕМОКИНОВОГО РЕЦЕПТОРА CXCR3

TABLE 1. MAIN CHARACTERISTICS OF CXCR3 LIGANDS

Хемокин Chemokine	Альтернативное название Aliases	Секретирующие клетки Producer cells	Основная функция Main function	Рецептор- агонист Agonist receptor	Рецептор- антагонист Antagonist receptor
CXCL4	PF4	тромбоциты platelets	прокоагулянт procoagulant	CXCR3B, A	не обнаружен not found
CXCL4L1	PF4V1				
CXCL9	MIG	МНПК, Т-клетки, макрофаги, моноциты, астроциты, фибробласты, эпителиальные клетки, звездчатые клетки, ДК PBMC, T cells, macrophages, monocytes, astrocytes, fibroblasts, epithelial cells, HSC, DC	иммунный ответ по пути Th1 Th1 immune response	CXCR3A, B	CCR3
CXCL10	IP-10			CXCR3A, B	CCR3
CXCL11	I-TAC			CXCR3A, B CXCR7 (ACKR3) DARK (ACKR1)	CCR3, CCR5

Примечание. МНПК – мононуклеары периферической крови, ДК – дендритные клетки.

Note. PBMC, peripheral blood mononuclear cell; DC, dendritic cells; HSC, hepatic stellate cells.

с успешным контролем репликации вируса иммунной системой. В этом случае формируется интенсивный специфический Т-клеточный ответ [30]. Поэтому особый интерес представляют IFN γ -индуцируемые хемокины, ответственные за привлечение эффекторных Т-клеток в очаг воспаления и миграцию в печеночную ткань. В ряде работ, в том числе и наших, была установлена связь между хемокинами, индуцируемыми IFN γ , и вирусным гепатитом С [4, 40]. Тем не менее сам ВГС может модулировать систему хемокинов, активируя воспалительные хемокины, но подрывая специфический иммунный ответ, способствуя персистенции ВГС [1, 57].

Была подтверждена важная роль в иммунопатогенезе хронического вирусного гепатита С (ХВГС) хемокинов CXС-семейства CXCL9, CXCL10 и CXCL11, концентрация которых значительно возрастает при ХВГС и имеет прямую связь со степенью фиброза печени [3, 20, 100]. Повышенные уровни CXCL10 в плазме связывают с фиброзом печени, тогда как уровни CXCL9, согласно некоторым исследованиям, в основном ассоциированы с воспалением [105]. Имеются данные, что CXCL9 может оказывать антифибротическое действие [100]. Кроме того, установлено, что CXCL10 может оказывать прямое проапоптотическое действие на гепатоциты, потенциально способствующие CXCL10-ассоциированному повреждению печени [90]. CXCL11 также экспрессируется гепатоцитами

при ХВГС, он способствует привлечению провоспалительных Т-клеток в печень и последующему портальному и лобулярному воспалению [47]. Важно отметить, что при ХВГС выявлена положительная корреляционная связь между содержанием в крови цитокина TNF α и хемокинов: CXCL9, CXCL10, CXCL11, что свидетельствует о TNF α -зависимой секреции лигандов CXCR3 при инфекции, вызванной ВГС [3, 76].

Ответ на вопрос, почему ангиостатические хемокины, которые должны в норме тормозить развитие фибротических процессов, потенцируют процесс повреждения печеночной ткани, был предложен Casrouge A. и соавт. [32]. Они обнаружили, что CXCL10 в сыворотке крови больных ХВГС находится в форме антагониста. Белок подвергается действию фермента дипептидазы 4 (DPP4/CD26), измененная форма CXCL10 становится дефектной, она способна взаимодействовать с рецептором CXCR3, но без последующей передачи внутриклеточного сигнала. Таким образом, в крови больных ХВГС возрастает количество дефектных форм хемокинов, которые не способны выполнять свои функции, но при этом потенцируют реакции воспаления, опосредуют повреждение гепатоцитов и развитие фиброза. Инфильтрация печени неспецифическими эффекторными клетками приводит к ее повреждению и активации звездчатых клеток, что является ключевым моментом в запуске процесса фиброобразования печеночной ткани.

ТАБЛИЦА 2. РОЛЬ ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИИ IFN γ -ЗАВИСИМЫХ ЛИГАНДОВ РЕЦЕПТОРА CXCR3 ПРИ НЕКОТОРЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

TABLE 2. ROLE OF INCREASED SECRETION OF IFN γ -INDUCIBLE CXCR3 LIGANDS IN CERTAIN DISEASES

Заболевание Disease	Функция лигандов CXCR3 Function of CXCR3 ligands	Источник литературы References
Диабет Diabetes	Инфильтрация Т-клетками островков Лангерганса (CXCL9, CXCL10) T cell islet infiltration (CXCL9, CXCL10)	[86]
	Снижение пролиферации бета-клеток поджелудочной железы (CXCL10) Decreased pancreatic beta cell proliferation (CXCL10)	[91]
	Корреляция с ангиогенным осложнением пролиферативной диабетической ретинопатией (CXCL9, CXCL10) Correlation to angiogenic complication of proliferative diabetic retinopathy (CXCL9, CXCL10)	[75]
Ревматоидный артрит Rheumatoid arthritis	Синовиальное воспаление (CXCL9, CXCL10, CXCL11) и повреждение сосудов (CXCL4) Synovial inflammation (CXCL9, CXCL10, CXCL11) and vascular damage (CXCL4)	[13, 14, 101]
Аллергический ринит Allergic rhinitis	CXCL9, CXCL10 запуск аллергического воспаления, CXCL9 – ранний аллергический ответ CXCL9, CXCL10 triggering allergic inflammation, CXCL9 – early allergic response	[98]
Туберкулез легких Pulmonary tuberculosis	Привлечение макрофагов и активированных Т-клеток в очаг воспаления (CXCL10) Macrophages and activated T-cells recruitment to the inflammation site (CXCL10)	[23]
	CXCL10 – биомаркер инфицирования <i>Mycobacterium tuberculosis</i> CXCL10 – <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection biomarker	[5, 6]
СПИД AIDS	Привлечение Т-клеток и размножение вирусов (CXCL9, CXCL10, CXCL11) T-cell recruitment and virus propagation (CXCL9, CXCL10, CXCL11)	[85]
	Стимуляция вирусной репликации (CXCL9, CXCL10, CXCL11) Stimulated virus replication (CXCL9, CXCL10, CXCL11)	[56]
Гепатит В и С Hepatitis B and C	Лобулярное воспаление и фиброз печени (CXCL9, CXCL10, CXCL11) Lobular inflammation and liver fibrosis (CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11)	[4, 40]
	Антифибротическое действие (CXCL9) Anti-fibrotic effect (CXCL9)	[100]
	Повреждение гепатоцитов (CXCL10) Hepatocyte damage (CXCL10)	[90]
Лимфома Lymphoma	Повышенная диссеминация опухолевых клеток (CXCL9, CXCL10, CXCL11), противоопухолевая активность: некроз опухолевой ткани, повреждение сосудов, защитный иммунный ответ (CXCL9, CXCL10) Increased tumor cell dissemination (CXCL9, CXCL10, CXCL11), anti-tumoral activity: tumor tissue necrosis, vascular damage, protective immune response (CXCL9, CXCL10)	[102]
	Усиление пролиферации опухолевых клеток (CXCL10) Increased tumor cell proliferation (CXCL10)	[27]
Колоректальный рак Colorectal cancer	Супрессоры опухоли (CXCL9, CXCL10) Tumor suppressor (CXCL9, CXCL10)	[70]
	Усиление инвазивности опухоли (CXCL10, CXCL11) Increased tumor invasiveness (CXCL10, CXCL11)	[104]
Рак молочной железы Breast cancer	Усиление пролиферации клеток опухоли, метастазирование (CXCL10, в меньшей степени CXCL9, CXCL11) Increased proliferation of tumor cells, metastasis (CXCL10, less CXCL9, CXCL11)	[38]

При исследовании содержания CXCR3⁺ лимфоцитов в периферической крови больных ХВГС нами было обнаружено, что количество CXCR3⁺В-лимфоцитов более чем в три раза больше у людей, инфицированных ВГС, по сравнению с условно здоровыми лицами [2]. Вместе с тем обнаружена прямая корреляционная связь между степенью фиброза печени и содержанием CXCR3⁺В-клеток. Известно, что при развитии хронической вирусной инфекции постоянная антигенная стимуляция В-клеток может привести к их истощению, что проявляется в дефекте функций клеток [72]. Согласно данным Mizuochi T. и соавт. в печени больных ХВГС обнаруживается повышенное содержание В-лимфоцитов, несущих на своей поверхности рецептор CXCR3 [69]. Полагают, что усиление экспрессии молекулы CXCR3 на В-лимфоцитах может зависеть от репликации ВГС [84].

При оценке CXCR3⁺Т-клеток в крови больных ХВГС нами было выявлено увеличение абсолютного и относительного количества этих клеток по сравнению с группой условно здоровых лиц [11, 12]. Показано увеличение содержания CXCR3⁺Th у больных ХВГС. Несмотря на то что рецептор CXCR3 связывают в основном с Th1, он может быть представлен и на других субпопуляциях CD4⁺Т-клеток, в том числе и на Th2 [52]. Данные субпопуляции обладают различными, иногда противоположными функциями. Учитывая тот факт, что в крови больных ХВГС значительно возрастает количество CXCR3⁺В-клеток и, по данным многих авторов, преобладают цитокины, ответственные за Th2-ответ [18, 106], логично предположить, что среди CXCR3⁺CD4⁺Т-клеток присутствуют Th2-клетки. В то же время при оценке CXCR3⁺CD8⁺Т-клеток в крови больных ХВГС было показано снижение этих клеток относительно CTL по сравнению с условно здоровыми донорами, возрастание абсолютного количества CXCR3⁺CTL в группе больных ХВГС [4, 19]. Таким образом, снижение экспрессии молекулы CXCR3 на CD8⁺Т-клетках может являться одним из механизмов ускользания ВГС от иммунного ответа организма хозяина и использоваться как неблагоприятный признак развития ХВГС.

Нами обнаружено значительное возрастание экспрессии мРНК CXCR3 в гепатобиоптатах больных ХВГС с выраженным фиброзом/циррозом печени по сравнению со слабовыраженным и умеренным фиброзом печени. Установлена положительная корреляционная зависимость между внутрипеченочной экспрессией мРНК CXCL10 и степенью фиброза печени [4]. Следовательно, при прогрессировании ХВГС наблюдается тенденция к нарастанию экспрессии мРНК CXCL10 в печени. Можно предположить, что повышенная экспрессия мРНК генов CXCR3 и CXCL10 клетками печени, в том числе лимфоцитами, способствует инфильтрации органа эффекторными клетками и повреждению печеночной паренхимы. Установлена положительная корреля-

ционная зависимость между экспрессией мРНК гена CXCL9 в печени и уровнем вирусной нагрузки в крови у лиц, инфицированных ВГС. Таким образом, количество вируса оказывает влияние на силу секреции хемокинов в очаге воспаления. Это является еще одним доказательством непрямого, а опосредованного иммунным ответом повреждения клеток печени в результате инфицирования ВГС. Процессы, происходящие в ткани печени, соответствующим образом отражаются в периферической крови. В итоге степень повреждения печеночной паренхимы можно оценивать посредством косвенных показателей крови, таких как концентрация хемокинов в плазме крови и выраженность экспрессии рецептора CXCR3 на клетках периферической крови.

У пациентов с прогрессирующим фиброзом печени обнаружены повышенные концентрации CXCL4 в сыворотке и внутрипеченочные уровни мРНК CXCL4 [103]. Также при гепатите неинфекционной этиологии — алкогольном гепатите — показана повышенная экспрессия CXCL4 и CXCL10 в биоптатах печени [36]. Аналогично повышенные концентрации в сыворотке крови и уровни внутрипеченочной экспрессии CXCL9 и CXCL10 были связаны с тяжестью фиброза печени при хронических гепатитах различной этиологии [95].

Согласно нашим данным, определение CXCL11 в плазме крови больных ХВГС может быть использовано для разделения начальных стадий фиброза печени (F0-1 и F2) [20]. С другой стороны, самостоятельно этот показатель не способен с высокой информативностью разделить больных ХВГС по стадиям фиброза печени (F0-1, F2 и F3-4). Нами был предложен алгоритм для определения стадии фиброза печени у больных ХВГС на основе определения трех цитокинов: CXCL11, TNFα и CCL20 [4], в котором используется метод построения деревьев решений. Показано, что совместное определение CXCL11, TNFα и CCL20 является достаточным для оценки степени фиброза печени у больных ХВГС. Определением числовых критериев дифференциальной диагностики стадий фиброза ткани печени при ХВГС стали следующие значения маркеров: для разделения стадий F0-1 и F2 выбрано значение CXCL11 — 166,5 пг/мл, TNFα — 15,7 пг/мл, CCL20 — 10,6 пг/мл; для разделения стадии фиброза F2 и стадии выраженного фиброза F3 следует ориентироваться на значения TNFα — 15,8 пг/мл, CXCL11 — 301,8 пг/мл, CCL20 — 15,5 пг/мл. Использование данного алгоритма для диагностики стадий фиброза печени позволило достигнуть чувствительности метода 67-91% при специфичности 87,4-91,5%. Таким образом, одновременное определение трех цитокинов и применение данного алгоритма может быть использовано для дополнительной, более точной диагностики фиброза печени при ХВГС. Для доказательства информативности и роли в оценке стадий фиброза с помощью предложен-

ной комбинации цитокинов важно провести дальнейшие валидационные исследования. Нами исследована возможность использования этой модели для других форм гепатита, а именно – вирусного гепатита В и аутоиммунных форм, при этом эффективность предложенной модели на других нозологиях не подтверждается. Для абсолютного большинства пациентов с различными стадиями фиброза модель предполагает стадию F0-1, что не соответствует истине.

Ревматоидный артрит

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся поражением соединительной ткани, преимущественно суставов. Особенностью РА является образование паннуса, представляющего собой гипертрофированную синовиальную оболочку (СО) сустава, инфильтрированную клетками воспаления, где активно идет процесс ангиогенеза. Набор медиаторов, участвующих в развитии и поддержании воспаления и ангиогенеза при ревматоидном артрите, чрезвычайно широк, в том числе интенсивно изучается роль лигандов CXCR3 в патогенезе ревматоидного артрита, их участие в ангиогенезе при формировании и распространении паннуса [22].

Нами получены данные о повышенном синтезе мРНК CXCL9, CXCL10 и CXCL11 в синовиальной оболочке, подтвержденные повышенным содержанием этих хемокинов в синовиальной жидкости при РА по сравнению с контрольной группой и/или остеоартрозом [13, 15, 16]. Установлено, что у пациентов с РА экспрессия рецептора CXCR3 на Т-лимфоцитах и тучных клетках при воспалении в синовиальной жидкости связана с повышенной экспрессией CXCL9 и CXCL10 в синовиальной жидкости и ткани по сравнению с уровнем этих хемокинов при травматическом артрите или остеоартрите [78].

Также была обнаружена связь между усиленной экспрессией CXCL4 и хроническим воспалением при РА [39]. Повышенные уровни CXCL4 наблюдались в плазме крови пациентов с РА, в том числе одновременно с образованием активных сосудистых поражений [101]. Это свидетельствует о том, что концентрация в плазме CXCL4 может оказаться полезным маркером эндотелиальных повреждений при ревматических заболеваниях.

Кроме того, продемонстрировано участие IFN γ -зависимых лигандов CXCR3 при артрите различной этиологии. Например, было показано, что синовиальная экспрессия CXCL10 увеличивается при ювенильном идиопатическом артрите [80], также при септическом артрите сообщалось о воспалительной секреции CXCL9 и CXCL11 [83].

При РА в связи с локализацией воспалительного процесса внутри сустава наибольший интерес представляет изучение хемокинов в синовиальной оболочке. Нами показано, что по сравнению с условно нормальной синовиальной

оболочкой экспрессия СХС-хемокинов значимо выше у больных с РА. Особенно это было выражено для CXCL9 (различие в экспрессии около 30 раз). При сравнении РА с остеоартрозом было выявлено увеличение экспрессии мРНК CXCL9, CXCL10 и CXCL11. Более того, при оценке характера экспрессии мРНК рецептора CXCR3 было обнаружено значимое увеличение его экспрессии при РА по сравнению с контролем [13].

В синовиальной жидкости больных РА концентрации ангиостатических хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11/ITAC были значительно выше по сравнению с контрольной группой, а также с группой остеоартроза. IFN γ -зависимые лиганды CXCR3 показали сочетанное повышение экспрессии в синовиальной оболочке и концентрации в синовиальной жидкости при РА по сравнению как с контрольной группой, так и с группой с остеоартрозом. Логично предположить, что такое увеличение экспрессии и содержания ангиостатических медиаторов может отражать компенсаторные процессы при патологическом ангиогенезе и воспалении внутри синовиальной оболочки.

Наши данные свидетельствуют о том, что три СХС-хемокина – CXCL9, CXCL10 и CXCL11 – могут рассматриваться в качестве дополнительных биомаркеров РА в целях дифференциальной диагностики. Для сравнения информативности выявленных биомаркеров были выбраны такие пороговые значения, при которых достигалась специфичность 87,5%. Наибольшая чувствительность достигалась для CXCL9 и CXCL11 (94,7%), для CXCL10 она составила 78,5%. Статистический анализ показал хорошую диагностическую информативность для всех анализов, таким образом, данные тесты могут стать полезными в диагностике РА.

Кроме того, при разделении пациентов с РА на группы в зависимости от наличия ревматоидного фактора в сыворотке крови обнаружено, что в группе с серопозитивным РА экспрессия мРНК CXCR3 была выше, чем в группе с серонегативным, но не отличалась от таковой в контрольной группе. Для относительной экспрессии CXCL11 найдена положительная корреляционная зависимость с содержанием С-реактивного белка в сыворотке крови [14].

На основании данных о повышенном внутрисуставном синтезе и содержании хемокинов, регулирующих ангиогенез, установлено, что три IFN γ -зависимых лиганда CXCR3 могут рассматриваться в качестве новых потенциальных биомаркеров РА, повышенный уровень которых в синовиальной жидкости является информативным критерием для дифференциальной диагностики РА и остеоартроза. Таким образом, в сложных случаях клинической практики определение содержания CXCL9, CXCL10 и CXCL11 в синовиальной жидкости рекомендуется в качестве дополнительных критериев для дифференциальной диагностики.

Туберкулез легких

Ввиду широкого распространения туберкулезного инфицирования, чрезвычайно актуален поиск биомаркеров, применение которых позволит улучшить диагностику туберкулеза. На сегодняшний день «золотым стандартом» для диагностики латентного туберкулеза является квантифероновый тест [8]. Он основан на количественном определении IFN γ , высвобождаемого Т-клетками, сенсibilизированными *in vitro* антигенами *Mycobacterium tuberculosis*. Поиск альтернативных IFN γ биомаркеров является актуальной задачей. При стимуляции иммунокомпетентных клеток образуется целый ряд биомолекул, которые потенциально могут быть использованы как для выявления инфицирования *Mycobacterium tuberculosis*, так и для разработки иммунологических тестов, которые позволят оценивать активность туберкулезного процесса.

Было показано, что у пациентов с активным туберкулезом уровень CXCL10 в плазме крови повышен, более того, концентрация CXCL10 значительно снижается после успешного лечения туберкулеза, что позволяет применять этот показатель для мониторинга активности заболевания и эффективности специфической терапии [23]. Позднее было предложено использовать все три IFN γ -зависимых лиганда CXCR3 в качестве суррогатных маркеров для диагностики активного туберкулеза и клинической оценки больных туберкулезом [61]. В некоторых исследованиях было показано, что определение антиген-индуцированной продукции CXCL10 имеет аналогичную чувствительность с интерфероновыми тестами [7, 79]. В квантифероновом тесте "QuantiFERON-TB Gold In-Tube" пороговое значение концентрации IFN γ , рекомендуемое производителем, достаточно низкое и для его количественного обнаружения требуются очень чувствительные и дорогостоящие тест-системы, также низкое пороговое значение увеличивает количество сомнительных результатов. Наши данные свидетельствуют о том, что применение CXCL10 обеспечивает больший диапазон измеряемых концентраций по сравнению с IFN γ и более высокое пороговое значение 1087 пг/мл против 14 пг/мл для IFN γ , что является его несомненным преимуществом. При этом тест с CXCL10 при выбранном пороговом значении обеспечивает чувствительность выявления туберкулезного инфицирования и специфичность более 80%. Таким образом, эти результаты дают обоснование возможности использования CXCL10 в качестве альтернативного биомаркера IFN γ для выявления туберкулезного инфицирования [9]. Также была продемонстрирована возможность использования CXCL10 в качестве альтернативного биомаркера IFN γ для выявления туберкулезного инфицирования у пациентов с ВИЧ-инфекцией [10, 49].

Позднее было обнаружено, что в плазме крови больных туберкулезом легких превалирует антагонистическая форма CXCL10, основным источ-

ником которой являются альвеолярные макрофаги [29], при этом в крови была показана низкая ферментативная активность DPP4/CD26, в то время как в очаге воспаления, в легочной ткани, значительно увеличивался уровень экспрессии DPP4/CD26. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что антагонизм CXCL10 может быть важным регуляторным механизмом при развитии туберкулеза. CXCL10 может быть инактивирован вскоре после секреции мембраносвязанной DPP4 (CD26), следовательно, снижается его хемотаксический потенциал. Учитывая важность функций клеток Th1 и IFN γ -опосредованных эффектов при туберкулезе, эти данные свидетельствуют о возможной недооцененной регуляторной роли DPP4 и антагонистической формы CXCL10 при туберкулезе.

Заключение

Как упоминалось выше, многочисленные исследования продемонстрировали связь между повышением или понижением регуляции одного или нескольких IFN γ -зависимых лигандов CXCR3 и различных типов заболеваний: ХВГС, РА и туберкулеза легких. Таким образом, эти молекулы являются универсальными медиаторами иммунных реакций при различных заболеваниях.

IFN γ -зависимые лиганды рецептора CXCR3 по отдельности или в сочетании с другими цитокинами могут служить информативными биомаркерами заболеваний в целях повышения качества лабораторной диагностики. Наши данные свидетельствуют о том, что три CXС-хемокина — CXCL9, CXCL10 и CXCL11 — могут рассматриваться в качестве дополнительных биомаркеров РА в целях дифференциальной диагностики. При ХВГС нами была продемонстрирована возможность использования комбинации трех цитокинов — CXCL11, TNF α и CCL20 — для оценки стадии фиброза печени. Нами установлено, что использование оценки антиген-индуцированной продукции CXCL10 позволяет выявить инфицирование *Mycobacterium tuberculosis*. Полученные данные заложили прочную основу для последующих исследований и внедрений анализа хемокинов в лабораторную диагностику. В дальнейшем необходимо оптимизировать предложенные алгоритмы диагностики и уточнить разработанные модели. Для этого следует провести масштабные валидационные исследования, с целью повышения специфичности тестов оценить антигенспецифичную продукцию цитокинов.

В последнее время появляются убедительные доказательства того, что *in vivo* функционируют IFN γ -зависимые лиганды CXCR3, которые подвергаются посттрансляционной модификации. Возможно, этим объясняются противоположные функции этих хемокинов при различных заболеваниях. Эта гипотеза также подтверждается тем фактом, что ферменты, способные модифицировать данные хемокины в молекулы с измененной

биологической активностью, способны изменять свою активность при определенных заболеваниях. На сегодняшний день остается неясным, какая форма хемокина — подлинная не измененная или модифицированная изоформа с резко отличной биологической активностью — присутствует в организме.

Исследование хемокинов, их изоформ, рецепторов, взаимодействий между собой и с рецепторами может внести существенный вклад в наше

понимание в области сети хемокинов. Более того, из-за их очевидной роли в инфекции, воспалении, ангиогенезе и раке, глубокое понимание системы IFN γ -зависимых хемокинов будет иметь клиническое значение, как с точки зрения диагностики, так и с терапевтической точки зрения.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Список литературы / References

1. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Тотолян А.А. Роль полиморфизма генов цитокинов при вирусном гепатите С // *Инфекция и иммунитет*, 2012. Т. 2, № 4. С. 687-698. [Arsentieva N.A., Semenov A.V., Totolyan A.A. The role of cytokine gene polymorphism in viral hepatitis C. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2012, Vol. 2, no. 4, pp. 687-698. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2012-4-687-698.
2. Арсентьева Н.А., Кудрявцев И.В., Елезов Д.С., Семенов А.В., Эсауленко Е.В., Басина В.В., Тотолян А.А. Экспрессия хемокинового рецептора CXCR3 на субпопуляциях В-лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С // *Медицинская иммунология*, 2013. Т. 15, № 5. С. 471-476. [Arsentieva N.A., Kudryavtsev I.V., Elezov D.S., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Basina V.V., Totolyan A.A. CXCR3 chemokine receptor expression on peripheral blood B cells in patients with chronic hepatitis C. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 5, pp. 471-476. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-5-471-476.
3. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Любимова Н.Е., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Козлов К.В., Жданов К.В., Тотолян А.А. Содержание цитокинов и хемокинов в плазме крови больных хроническим вирусным гепатитом С // *Российский иммунологический журнал*, 2015. Т. 9, № 18. С. 83-92. [Arsentieva N.A., Semenov A.V., Lyubimova N.E., Basina V.V., Esaulenko E.V., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Totolyan A.A. Contents of cytokines and chemokines in the blood plasma of patients with chronic viral hepatitis C. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9, no. 18, pp. 83-92. (In Russ.)]
4. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Козлов К.В., Жданов К.В., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 и их лиганды в печени и крови больных хроническим вирусным гепатитом С // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2015. Т. 160, № 8. С. 218-222. [Arsentieva N.A., Semenov A.V., Lyubimova N.E., Ostankova Yu.V., Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Basina V.V., Esaulenko E.V., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Totolyan A.A. Chemokine receptors CXCR3 and CCR6 and their ligands in the liver and blood of patients with chronic viral hepatitis C. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, Vol. 160, no. 8, pp. 218-222. (In Russ.)]
5. Васильева Е.В., Вербов В.Н., Никитина И.Ю., Любимова Н.Е., Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Лядова И.В., Тотолян А.А. Информативность определения спонтанной и специфической продукции цитокинов для оценки активности туберкулезного процесса // *Вестник уральской медицинской академической науки*, 2012. Т. 4, № 41. С. 99-100. [Vasilyeva E.V., Verbov V.N., Nikitina I.Yu., Lyubimova N.E., Arsentieva N.A., Semenov A.V., Lyadova I.V., Totolyan A.A. Informative determination of spontaneous and specific cytokine production to assess the activity of the tuberculosis process. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2012, Vol. 4, no. 41, pp. 99-100. (In Russ.)]
6. Васильева Е.В., Вербов В.Н., Ивановский В.Б., Жемкова М.Ф., Никитина И.Ю., Лядова И.В., Тотолян А.А. Комбинированное определение спонтанной и антигениндуцированной продукции цитокинов для дифференциальной диагностики активного туберкулеза легких и латентной туберкулезной инфекции // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, 2013. Т. 4. С. 77-85. [Vasilyeva E.V., Verbov V.N., Ivanovsky V.B., Zhemkova M.F., Nikitina I.Yu., Lyadova I.V., Totolyan A.A. Combined determination of spontaneous and antigeninduced cytokine secretion for the differential diagnosis of pulmonary tuberculosis and latent tuberculosis infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, Vol. 4, pp. 77-85. (In Russ.)]
7. Васильева Е.В., Лапин С.В., Блинова Т.В., Никитина И.Ю., Лядова И.В., Вербов В.Н., Тотолян Арег А. Сравнительная ценность квантиферонового теста, неоптерина и специфических противотуберкулезных антител для клинико-лабораторной диагностики туберкулеза легких // *Клиническая лабораторная диагностика*, 2013. Т. 5. С. 21-26. [Vasilyeva E.V., Lapin S.V., Blinova T.V., Nikitina I.Yu., Lyadova I.V., Verbov V.N., Totolyan Areg A. Comparative value of quantiferone test, neopterin and specific anti-tuberculosis antibodies for clinical and laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, Vol. 5, pp. 21-26. (In Russ.)]
8. Васильева Е.В., Паукер М.Н., Грицай И.Ю., Прибыток Е.В., Вербов В.Н., Тотолян А.А. Возможности и ограничения теста Quantiferon TB-Gold in tube в лабораторной диагностике туберкулеза легких // *Туберкулез и болезни легких*, 2013. Т. 2. С. 13-17. [Vasilyeva E.V., Pauker M.N., Gritsay I.Yu., Pribytok E.V., Verbov V.N., Totolyan A.A. Possibilities and limitations of the Quantiferon TB-Gold in tube test in the laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2013, Vol. 2, pp. 13-17. (In Russ.)]
9. Васильева Е.В., Вербов В.Н., Тотолян А.А. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике активного туберкулеза легких и латентной туберкулезной инфекции // *Медицинский альянс*, 2015.

Т. 1. С. 92-93. [Vasilyeva E.V., Verbov V.N., Totolyan A.A. Immunological methods in the differential diagnosis of lung and latent tuberculous. *Meditsinskiy alyans = Medical Alliance*, 2015, Vol. 1, pp. 92-93. (In Russ.)]

10. Васильева Е.В., Пантелеев А.М., Вербов В.Н., Тотолян А.А. Значение квантиферонового теста и IP-10 в диагностике туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17. С. 131-132. [Vasilyeva E.V., Panteleev A.M., Verbov V.N., Totolyan A.A. Quantiferon test and IP-10 in the diagnosis of tuberculosis in patients with HIV infection. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, pp. 131-132. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-3s-129-144.

11. Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Эсауленко Е.В., Басина В.В., Тотолян А.А. Анализ субпопуляций Т-хелперов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 и активационные маркеры CD38 и HLA-DR // Инфекция и иммунитет, 2013. Т. 3, № 4. С. 327-334. [Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Basina V.V., Totolyan A.A. Analysis of T-helper subsets of peripheral blood in patients with chronic hepatitis C expressing chemokine receptors CXCR3 and CCR6 and activation markers of CD38 and HLA-DR. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, Vol. 3, no. 4, pp. 327-334. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2013-4-327-334.

12. Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Арсентьев Н.А., Басин В.В., Эсауленко Е.В., Семенов А.В., Тотолян А.А. Анализ популяций Т-хелперных клеток памяти, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6, в периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2015. Т. 160, № 8. С. 204-208. [Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Arsentiev N.A., Basin V.V., Esaulenko E.V., Semenov A.V., Totolyan A.A. Analysis of populations T-helper memory cell expressing CXCR3 and CCR6 chemokine receptors in peripheral blood of patients with chronic viral hepatitis C. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, Vol. 160, no. 8, pp. 204-208. (In Russ.)]

13. Жебрун Д.А., Маслянский А.Л., Титов А.Г., Патрухин А.П., Костарева А.А., Гольцева И.С., Тотолян А.А. Определение мРНК ангиогенных и ангиостатических хемокинов и их рецепторов в синовиальной оболочке методом количественной ПЦР в реальном времени // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 6. С. 525-534. [Zhebrun D.A., Maslyansky A.L., Titov A.G., Patruhin A.P., Kostareva A.A., Goltseva I.S., Totolyan A.A. Analysis of expression of angiogenic and angiostatic chemokines and their receptors in synovial tissue by quantitative real-time PCR. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 6, pp. 525-534. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-6-525-534.

14. Жебрун Д.А., Тотолян А.А., Маслянский А.Л., Титов А.Г., Патрухин А.П., Костарева А.А., Гольцева И.С. Синтез ангиогенных и ангиостатических CXС-хемокинов и их рецепторов в синовиальной оболочке при ревматоидном артрите // Цитокины и воспаление, 2014. Т. 13, № 2. С. 39-44. [Zhebrun D.A., Totolyan A.A., Maslyansky A.L., Titov A.G., Patrukhin A.P., Kostareva A.A., Goltseva I.S. Levels of angiogenic and angiostatic CXС chemokines and their receptors in the synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2014, Vol. 13, no. 2, pp. 39-44. (In Russ.)]

15. Жебрун Д.А., Маслянский А.Л., Титов А.Г., Патрухин А.П., Костарева А.А., Гольцева И.С., Арсентьева Н.А., Любимова Н.С., Тотолян А.А. Содержание некоторых хемокинов в нормальной синовиальной жидкости // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 2. С. 189-194. [Zhebrun D.A., Maslyansky A.L., Titov A.G., Patrukhin A.P., Kostareva A.A., Goltseva I.S., Arsentieva N.A., Lyubimova N.S., Totolyan A.A. The content of some chemokines in normal synovial fluid. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 2, pp. 189-194. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-2-189-194.

16. Жебрун Д.А., Маслянский А.Л., Титов А.Г., Патрухин А.П., Костарева А.А., Гольцева И.С., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Тотолян А.А. Содержание хемокинов, регулирующих ангиогенез, в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом // Научно-практическая ревматология, 2015. Т. 1, № 53. С. 58-62. [Zhebrun D.A., Maslyansky A.L., Titov A.G., Patrukhin A.P., Kostareva A.A., Goltseva I.S., Arsentieva N.A., Lyubimova N.E., Totolyan A.A. The content of chemokines that regulate angiogenesis in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2015, Vol. 1, no. 53, pp. 58-62. (In Russ.)]

17. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 3. С. 239-250. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobins I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Totolyan A.A. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral blood. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 239-250. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250.

18. Никитин В.Ю., Сухина И.А., Цыган В.Н., Гусев Д.А. Иммунологическая характеристика стадий хронического гепатита С и оценка факторов иммунной системы как прогностических критериев течения заболевания // Журнал инфектологии, 2009. Т. 1, № 1. С. 30-40. [Nikitin V.Yu., Sukhina I.A., Tsigan V.N., Gusev D.A. The immunologic characteristic of the stages of chronic hepatitis C and an assessment of immune system factors as prognostic criteria of a current disease. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2009, Vol. 1, no. 1, pp. 30-40. (In Russ.)]

19. Семенов А.В., Арсентьева Н.А., Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. Особенности популяционного состава CXCR3-положительных лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2013. Т. 6. С. 69-75. [Semenov A.V., Arsentieva N.A., Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Esaulenko E.V., Totolyan A.A. Features of the population composition of CXCR3-positive peripheral blood lymphocytes in patients with chronic viral hepatitis C. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, Vol. 6, pp. 69-75. (In Russ.)]

20. Семенов А.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Тюленев С.В., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. Роль цитокинов и хемокинов в лабораторной диагностике хронического вирусного гепати-

та С // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. Т. 60, № 8. С. 45-51. [Semenov A.V., Arsentieva N.A., Lyubimova N.E., Tyulenev S.V., Basina V.V., Jesaulenko E.V., Totolyan A.A. The role of cytokines and chemokines in the laboratory diagnosis of chronic viral hepatitis C. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, Vol. 60, no. 8, pp. 45-51. (In Russ.)]

21. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 749 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 749 p.

22. Antonelli A., Ferrari S.M., Giuggioli D., Ferrannini E., Ferri C., Fallahi P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.*, 2014, Vol. 13, no. 3, pp. 272-280.

23. Azzurri A., Sow O.Y., Amedei A., Bah B., Diallo S., Peri G., Benagiano M., d'Elios M.M., Mantovani A., del Prete G. IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect.*, 2005, Vol. 7, no. 1, pp. 1-8.

24. Bachelier F., Graham G.J., Locati M., Mantovani A., Murphy P.M., Nibbs R., Rot A., Sozzani S., Thelen M. New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, pp. 207-208.

25. Bacon K., Baggiolini M., Broxmeyer H., Horuk R., Lindley I., Mantovani A., Maysushima K., Murphy P., Nomiyama H., Oppenheim J., Rot A., Schall T., Tsang M., Thorpe R., van Damme J., Wadhwa M., Yoshie O., Zlotnik A., Zoon K. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2002, Vol. 22, pp. 1067-1068.

26. Balestrieri M.L., Balestrieri A., Mancini F.P., Napoli C. Understanding the immunoangiostatic CXC chemokine network. *Cardiovasc Res.*, 2008, Vol. 78, pp. 250-256.

27. Barash U., Zohar Y., Wildbaum G., Beider K., Nagler A., Karin N., Ilan N., Vlodavsky I. Heparanase enhances myeloma progression via CXCL10 downregulation. *Leukemia*, 2014, Vol. 28, no. 11, pp. 2178-2187.

28. Berchiche Y.A., Sakmar T.P. CXC chemokine receptor 3 alternative splice variants selectively activate different signaling pathways. *Mol. Pharmacol.*, 2016, Vol. 90, pp. 483-495.

29. Blauenfeldt T., Petrone L., Del Nonno F., Baiocchi A., Falasca L., Chiacchio T., Bondet V., Vanini V., Palmieri F., Galluccio G., Casrouge A., Eugen-Olsen J., Albert M.L., Goletti D., Duffy D., Ruhwald M.H. Interplay of DDP4 and IL-10 as a Potential Mechanism for Cell Recruitment to Tuberculosis Lesions. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, p. 1456.

30. Bowen D.G., Walker C.M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*, 2005, Vol. 436, no. 7053, pp. 946-952.

31. Butcher E.C., Picker L.J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 1996, Vol. 272, no. 5258, pp. 60-66.

32. Casrouge A., Decalf J., Ahloulay M., Lababidi C., Mansour H., Vallet-Pichard A., Mallet V., Mottez E., Mapes J., Fontanet A., Pol S., Albert M.L. Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *J. Clin. Invest.*, 2011, Vol. 121, no. 1, pp. 308-317.

33. Cole K.E., Strick C.A., Paradis T.J., Ogborne K.T., Loetscher M., Gladue R.P., Lin W., Boyd J.G., Moser B., Wood D.E., Sahagan B.G., Neote K. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 187, pp. 2009-2021.

34. Corsiero E., Nerviani A., Bombardieri M., Pitzalis C. Ectopic lymphoid structures: powerhouse of autoimmunity. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 430.

35. Dai X., Tan Y., Cai S., Xiong X., Wang L., Ye Q., Yan X., Ma K., Cai L. The role of CXCR7 on the adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells. *J. Cell Mol. Med.*, 2011, Vol. 15, pp. 1299-1309.

36. Dominguez M., Miquel R., Colmenero J., Moreno M., Garcia-Pagan J.C., Bosch J., Arroyo V., Ginès P., Caballería J., Bataller R. Hepatic expression of CXC chemokines predicts portal hypertension and survival in patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*, 2009, Vol. 136, pp. 1639-1650.

37. Ehlert J.E., Addison C.A., Burdick M.D., Kunkel S.L., Strieter R.M. Identification and partial characterization of a variant of human CXCR3 generated by posttranscriptional exon skipping. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, pp. 6234-6240.

38. Ejaidei A.A., Craft B.S., Punekey L.V., Lewis R.E., Cruse J.M. Hormone receptor-independent CXCL10 production is associated with the regulation of cellular factors linked to breast cancer progression and metastasis. *Exp. Mol. Pathol.*, 2015, Vol. 99, no. 1, pp. 163-172.

39. Erdem H., Pay S., Musabak U., Simsek I., Dinc A., Pekel A., Sengul P.S. Synovial angiostatic non-ELR CXC chemokines in inflammatory arthritides: does CXCL4 designate chronicity of synovitis? *Rheumatol. Int.*, 2007, Vol. 27, pp. 969-973.

40. Fahey S., Dempsey E., Long A. The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C infection. *Cell. Mol. Immunol.*, 2014, Vol. 11, pp. 25-40.

41. Farber J.M. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, Vol. 87, pp. 5238-5242.

42. Furuya M., Yoneyama T., Miyagi E., Tanaka R., Nagahama K., Miyagi Y., Nagashima Y., Hirahara F., Y., Aoki I. Differential expression patterns of CXCR3 variants and corresponding CXC chemokines in clear cell ovarian cancers and endometriosis. *Gynecol. Oncol.*, 2011, Vol. 122, pp. 648-655.

43. Garcia-Lopez M.A., Sanchez-Madrid F., Rodriguez-Frade J.M., Mellado M., Acevedo A., Garcia M.I., Albar J.P., Martínez C., Marazuela M. CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells. *Lab. Invest.*, 2001, Vol. 81, pp. 409-418.

44. Groom J.R., Luster A.D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.*, 2011, Vol. 89, pp. 207-215.

45. Handel T.M., Johnson Z., Crown S.E., Lau E.K., Proudfoot A.E. Regulation of protein function by glycosaminoglycans – as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.*, 2005, Vol. 74, pp. 385-410.

46. Hartl D., Krauss-Etschmann S., Koller B., Hordijk P.L., Kuijpers T.W., Hoffmann F., Hector A., Eber E., Marcos V., Bittmann I., Eickelberg O., Griesse M., Roos D. Infiltrated neutrophils acquire novel chemokine receptor

expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 18, pp. 8053-8067.

47. Helbig K.J., Ruszkiewicz A., Semendric L., Harley H.A., McColl S.R., Beard M.R. Expression of the CXCR3 ligand I-TAC by hepatocytes in chronic hepatitis C and its correlation with hepatic inflammation. *Hepatology*, 2004, Vol. 39, pp. 1220-1229.

48. Jinquan T., Jing C., Jacobi H.H., Reimert C.M., Millner A., Quan S., Quan S., Hansen J.B., Dissing S., Malling H.J., Skov P.S., Poulsen L.K. CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma-inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 165, pp. 1548-1556.

49. Juffermans N.P., Verbon A., van Deventer S.J., van Deutekom H., Belisle J.T., Ellis M.E., Speelman P., van der Poll T. Elevated chemokine concentrations in sera of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients with tuberculosis: a possible role for mycobacterial lipoarabinomannan. *Infect. Immun.*, 1999, Vol. 67, pp. 4295-4297.

50. Kaplan G., Luster A.D., Hancock G., Cohn Z.A. The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J. Exp. Med.*, 1987, Vol. 166, pp. 1098-1108.

51. Keeley E.C., Mehrad B., Strieter R.M. Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Exp. Cell Res.*, 2011, Vol. 317, pp. 685-690.

52. Kim C.H., Rott L., Kunkel E.J., Genovese M.C., Andrew D.P., Wu L., Butcher E.C. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 2001, Vol. 108, no. 9, pp. 1331-1339.

53. Koch M.A., Tucker-Heard G., Perdue N.R., Killebrew J.R., Urdahl K.B., Campbell D.J. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, pp. 595-602.

54. Korniejewska A., McKnight A.J., Johnson Z., Watson M.L., Ward S.G. Expression and agonist responsiveness of CXCR3 variants in human T lymphocytes. *Immunology*, 2011, Vol. 132, pp. 503-515.

55. Kuo J.H., Chen Y.P., Liu J.S., Dubrac A., Quemener C., Prats H., Bikfalvi A., Wu W.G., Sue S.C. Alternative C-terminal helix orientation alters chemokine function: structure of the anti-angiogenic chemokine, CXCL4L1. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, pp. 13522-13533.

56. Lane B.R., King S.R., Bock P.J., Strieter R.M., Coffey M.J., Markovitz D.M. The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication. *Virology*, 2003, Vol. 307, no. 1, pp. 122-134.

57. Larrubia J.R., Benito-Martinez S., Calvino M., Sanz-de-Villalobos E., Parra-Cid T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.*, 2008, Vol. 14, pp. 7149-7159.

58. Lasagni L., Francalanci M., Annunziato F., Lazzeri E., Giannini S., Cosmi L., Sagrinati C., Mazzinghi B., Orlando C., Maggi E., Marra F., Romagnani S., Serio M., Romagnani P. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 197, pp. 1537-1549.

59. Lasagni L., Grepin R., Mazzinghi B., Lazzeri E., Meini C., Sagrinati C., Liotta F., Frosali F., Ronconi E., Alain-Courtois N., Ballerini L., Netti G.S., Maggi E., Annunziato F., Serio M., Romagnani S., Bikfalvi A., Romagnani P. PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion. *Blood*, 2007, Vol. 109, pp. 4127-4134.

60. Lee H.H., Farber J.M. Localization of the gene for the human MIG cytokine on chromosome 4q21 adjacent to INP10 reveals a chemokine "mini-cluster". *Cytogenet. Cell Genet.*, 1996, Vol. 74, pp. 255-258.

61. Lee K., Chung W., Jung Y., Kim Y., Park J., Sheen S., Park K. CXCR3 ligands as clinical markers for pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2015, Vol. 19, no. 2, pp. 191-199.

62. Loetscher M., Gerber B., Loetscher P., Jones S.A., Piali L., Clark-Lewis I., Baggiolini M., Moser B. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1996, Vol. 184, pp. 963-969.

63. Loetscher M., Loetscher P., Brass N., Meese E., Moser B. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur. J. Immunol.*, 1998, Vol. 28, pp. 3696-3705.

64. Loos T., Dekeyser L., Struyf S., Schutyser E., Gijssbers K., Gouwy M., Fraeyman A., Put W., Ronsse L., Grillet B., Opdenakker G., van Damme J., Proost P. TLR ligands and cytokines induce CXCR3 ligands in endothelial cells: enhanced CXCL9 in autoimmune arthritis. *Lab. Invest.*, 2006, Vol. 86, pp. 902-916.

65. Luster A.D., Unkeless J.C., Ravetch J.V. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*, 1985, Vol. 315, pp. 672-676.

66. Luster A.D., Greenberg S.M., Leder P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J. Exp. Med.*, 1995, Vol. 182, pp. 219-231.

67. Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front. Biosci.*, 2002, Vol. 7, pp. 1899-1914.

68. Metzemaekers M., van Damme J., Mortier A., Proost P. Regulation of chemokines activity – a focus on the role of dipeptidyl peptidase IV/CD26. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 483.

69. Mizuochi T., Ito M., Saito K., Kunimura T., Morohoshi T., Momose H., Hamaguchi I., Takai K., Iino S., Suzuki M., Mochida S., Ikebuchi K., Yamaguchi K. Possible recruitment of peripheral blood CXCR3⁺ CD27⁺ CD19⁺ B cells to the liver of chronic hepatitis C patients. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2010, Vol. 30, no. 4, pp. 243-251.

70. Mlecnik B., Tosolini M., Charoentong P., Kirilovsky A., Bindea G., Berger A., Camus M., Gillard M., Bruneval P., Fridman W.H., Pagès F., Trajanoski Z., Galon J. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2010, Vol. 138, no. 4, pp. 1429-1440.

71. Moelants E.A., Mortier A., van Damme J., Proost P. *In vivo* regulation of chemokine activity by post-translational modification. *Immunol. Cell Biol.*, 2013, Vol. 91, pp. 402-407.

72. Moir S., Ho J., Malaspina A., Wang W., DiPoto A.C. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected individuals. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 8, pp. 1797-1805.

73. Mortier A., van Damme J., Proost P. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol. Lett.*, 2012, Vol. 154, pp. 2-9.
74. Muehlinghaus G., Cigliano L., Huehn S., Peddinghaus A., Leyendeckers H., Hauser A.E., Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells. *Blood*, 2005, Vol. 105, pp. 3965-3971.
75. Nawaz M.I., van Raemdonck K., Mohammad G., Kangave D., van Damme J., Abu El-Asrar A.M., Struyf S. Autocrine CCL2, CXCL4, CXCL9 and CXCL10 signal in retinal endothelial cells and are enhanced in diabetic retinopathy. *Exp. Eye Res.*, 2013, Vol. 109, pp. 67-76.
76. Ohmori Y., Hamilton T.A. The interferon-stimulated response element and a kappa B site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Immunol.*, 1995, Vol. 154, no. 10, pp. 5235-5244.
77. Opdenakker G., Proost P., van Damme J. Microbiomic and posttranslational modifications as preludes to autoimmune diseases. *Trends Mol. Med.*, 2016, Vol. 22, pp. 746-757.
78. Patel D.D., Zachariah J.P., Whichard L.P. CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. *Clin. Immunol.*, 2001, Vol. 98, pp. 39-45.
79. Petrucci R., Abu Amer N., Gurgel R.Q., Sherchand J.B., Doria L., Lama C., Ravn P., Ruhwald M., Yassin M., Harper G., Cuevas L.E. Interferon gamma, interferon-gamma-induced-protein 10, and tuberculin responses of children at high risk of tuberculosis infection. *Pediatr Infect. Dis. J.*, 2008, Vol. 27, no. 12, pp. 1073-1707.
80. Pharoah D.S., Varsani H., Tatham R.W., Newton K.R., de Jager W., Prakken B.J. Expression of the inflammatory chemokines CCL5, CCL3 and CXCL10 in juvenile idiopathic arthritis, and demonstration of CCL5 production by an atypical subset of CD8⁺ T cells. *Arthritis Res. Ther.*, 2006, Vol. 8, no. 2, R50. doi: 10.1186/ar1913.
81. Poggi A., Zancolli M., Catellani S., Borsellino G., Battistini L., Zocchi M.R. Migratory pathways of gammadelta T cells and response to CXCR3 and CXCR4 ligands: adhesion molecules involved and implications for multiple sclerosis pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2007, Vol. 1107, pp. 68-78.
82. Proost P., Vynckier A.K., Mahieu F., Put W., Grillet B., Struyf S., Wuyts A., Opdenakker G., van Damme J. Microbial Toll like receptor ligands differentially regulate CXCL10/IP-10 expression in fibroblasts and mononuclear leukocytes in synergy with IFN-gamma and provide a mechanism for enhanced synovial chemokine levels in septic arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 2003, Vol. 33, pp. 3146-3153.
83. Proost P., Verpoest S., van de Borne K., Schutyser E., Struyf S., Put W., Ronsse I., Grillet B., Opdenakker G., van Damme J. Synergistic induction of CXCL9 and CXCL11 by Toll-like receptor ligands and interferon-gamma in fibroblasts correlates with elevated levels of CXCR3 ligands in septic arthritis synovial fluids. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, Vol. 75, pp. 777-784.
84. Racanelli V., Frassanito M.A., Leone P., Galiano M., de Re V., Silvestris F., Dammacco Racanelli F. Antibody production and *in vitro* behavior of CD27-defined B-cell subsets: persistent hepatitis C virus infection changes the rules. *J. Virol.*, 2006, Vol. 80, no. 8, pp. 3923-3934.
85. Reinhart T.A. Chemokine induction by HIV-1: recruitment to the cause. *Trends Immunol.*, 2003, Vol. 24, no. 7, pp. 351-353.
86. Rhode A., Pauza M.E., Barral A.M., Rodrigo E., Oldstone M.B., von Herrath M.G. Christen U. Islet-specific expression of CXCL10 causes spontaneous islet infiltration and accelerates diabetes development. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, pp. 3516-3524.
87. Romagnani P., Lasagni L., Annunziato F., Serio M., Romagnani S. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.*, 2004, Vol. 25, pp. 201-209.
88. Rosenkilde M.M., Schwartz T.W. The chemokine system – a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS*, 2004, Vol. 112, pp. 481-495.
89. Russo R.C., Garcia C.C., Teixeira M.M., Amaral F.A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 10, pp. 593-619.
90. Sahin H., Borkham-Kamphorst E., do O N.T., Berres M.L., Kaldenbach M., Schmitz P., Weiskirchen R., Liedtke C., Streetz K.L., Maedler K., Trautwein C., Wasmuth H.E. Proapoptotic effects of the chemokine, CXCL 10 are mediated by the noncognate receptor TLR4 in hepatocytes. *Hepatology*, 2013, Vol. 57, no. 2, pp. 797-805.
91. Schulthess F.T., Paroni F., Sauter N.S., Shu L., Ribaux P., Haataja L., Strieter R.M., Oberholzer J., King C.C., Maedler K. CXCL10 impairs beta cell function and viability in diabetes through TLR4 signaling. *Cell Metab.*, 2009, Vol. 9, pp. 125-139.
92. Shute J. Glycosaminoglycan and chemokine/growth factor interactions. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2012, Vol. 207, pp. 307-324.
93. Struyf S., Saligni L., Burdick M.D., Vandercappellen J., Gouwy M., Noppen S., Proost P., Opdenakker G., Parmentier M., Gerard C., Sozzani S., Strieter R.M., van Damme J. Angiostatic and chemotactic activities of the CXC chemokine CXCL4L1 (platelet factor-4 variant) are mediated by CXCR3. *Blood*, 2011, Vol. 117, pp. 480-488.
94. 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, pp. 655-669.
95. Tacke F., Zimmermann H.W., Berres M.L., Trautwein C., Wasmuth H.E. Serum chemokines receptor CXCR3 ligands are associated with progression, organ dysfunction and complications of chronic liver diseases. *Liver Int.*, 2011, Vol. 31, no. 6, pp. 840-849.
96. Taqueti V.R., Grabie N., Colvin R., Pang H., Jarolim P., Luster A.D., Glimcher L.H., Lichtman A.H. T-bet controls pathogenicity of CTLs in the heart by separable effects on migration and effector activity. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, pp. 5890-5901.
97. Tensen C.P., Flier J., van der Raaij-Helmer E.M., Sampat-Sardjoepersad S., van der Schors R.C., Leurs R., Scheper R.J., Boorsma D.M., Willemze R. Human IP-9: a keratinocyte-derived high affinity CXC-chemokine ligand for the IP-10/Mig receptor (CXCR3). *J. Invest Dermatol.*, 1999, Vol. 112, pp. 716-722.

98. Tworek D., Kuna P., Młynarski W., Gorski P., Pietras T., Antczak A. MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) and I-TAC (CXCL11) concentrations after nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. *Arch. Med. Sci.*, 2013, Vol. 9, no. 5, pp. 849-853.
99. van Raemdonck K., van den Steen P.E., Liekens S., van Damme J., Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2015, Vol. 26, pp. 311-327.
100. Wasmuth H.E., Lammert F., Zaldivar M.M., Weiskirchen R., Hellerbrand C., Scholten D., Berres M.L., Zimmermann H., Streetz K.L., Tacke F., Hillebrandt S., Schmitz P., Keppeler H., Berg T., Dahl E., Gassler N., Friedman S.L., Trautwein C. Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans. *Gastroenterology*, 2009, Vol. 137, pp. 309-319.
101. Yamamoto T., Chikugo T., Tanaka Y. Elevated plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in patients with rheumatic disorders and cutaneous vasculitis. *Clin. Rheumatol.*, 2002, Vol. 21, pp. 501-504.
102. Yan X.J., Dozmorov I., Li W., Yancopoulos S., Sison C., Centola M., Jain P., Allen S.L., Kolitz J.E., Rai K.R., Chiorazzi N., Sherry B. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 19, pp. 5201-5210.
103. Zaldivar M.M., Pauels K., von Hundelshausen P., Berres M.L., Schmitz P., Bornemann J., Kowalska M.A., Gassler N., Streetz K.L., Weiskirchen R., Trautwein C., Weber C., Wasmuth H.E. CXC chemokine ligand 4 (Cxcl4) is a platelet-derived mediator of experimental liver fibrosis. *Hepatology*, 2010, Vol. 51, pp. 1345-1353.
104. Zeng Y.J., Lai W., Wu H., Liu L., Xu H.Y., Chu Z.H. Neuroendocrine-like cells-derived CXCL10 and CXCL11 induce the infiltration of tumor-associated macrophage leading to the poor prognosis of colorectal cancer. *Oncotarget.*, 2016, Vol. 7, no. 19, pp. 27394-27407.
105. Zeremski M., Dimova R., Brown Q., Jacobson I.M., Markatou M., Talal A.H. Peripheral CXCR3-associated chemokines as biomarkers of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.*, 2009, Vol. 200, no. 11, pp. 1774-1780.
106. Zhang L., Hao C.Q., Miao L., Dou X.G. Role of Th1/Th2 cytokines in serum on the pathogenesis of chronic hepatitis C and the outcome of interferon therapy. *Genet. Mol. Res.*, 2014, Vol. 13, no. 4, pp. 9747-9755.
107. Zlotnik A., Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000, Vol. 12, pp. 121-127.

Авторы:

Арсентьева Н.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Семенов А.В. — д.б.н., заместитель директора по инновационной работе ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Жебрун Д.А. — к.б.н., научный сотрудник института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Васильева Е.В. — к.б.н., аналитик Bostongene, Москва, Россия

Тотолян Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Arsentyeva N.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Semenov A.V., PhD, MD (Biology), Deputy Director for Innovations, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Zhebrun D.A., PhD (Biology), Research Associate, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Medical V. Almazov Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Vasilyeva E.V., PhD (Biology), Analyst, Bostongene, Moscow, Russian Federation

Totolyan Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 23.04.2019

Отправлена на доработку 06.05.2019

Принята к печати 08.05.2019

Received 23.04.2019

Revision received 06.05.2019

Accepted 08.05.2019

РОЛЬ ПЕРИВАСКУЛЯРНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В РАЗВИТИИ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ И НЕАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

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

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

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

Резюме. Периваскулярная жировая ткань (ПВЖТ) окружает большинство крупных кровеносных сосудов и играет важную роль в сосудистом гомеостазе. Недавние исследования показали, что ПВЖТ влияет на вазодилатацию и вазоконстрикцию, что указывает на то, что ПВЖТ регулирует тонус и диаметр сосудов. Адипоцитокины и хемокины, секретируемые из ПВЖТ, по-видимому, имеют прямой доступ к соседней артериальной стенке путем диффузии или через *vasa vasorum*. Установленные данные свидетельствуют о том, что ПВЖТ играет важную роль в атеросклерозе, гипертонии. Недавно появились исследования, в которых изучалась роль ПВЖТ в неатеросклеротических сосудистых заболеваниях, таких как неоинтимальные новообразования, аневризма аорты, артериальная ригидность и васкулит. В этой обзорной статье мы обобщим данные о роли ПВЖТ в патогенезе атеросклероза, гипертонии и неатеросклеротических сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: периваскулярная жировая ткань, адипокины, цитокины, атеросклероз, гипертония, сердечно-сосудистые заболевания

ROLE OF PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE IN THE DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROTIC AND NON- ATHEROSCLEROTIC DISEASES

Uchasova E.G.^a, Gruzdeva O.V.^{a,b}, Dyleva Yu.A.^a, Belik E.V.^a

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

^b Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Perivascular adipose tissue surrounds most large blood vessels and plays an important role in vascular homeostasis. Recent studies have shown that perivascular adipose tissue effects vasodilation and vasoconstriction, which indicates that the perivascular adipose tissue regulates tone and diameter of the vessels. Adipocytokines and chemokines, secreted from the perivascular adipose tissue, apparently have direct access

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Е.Г. Учасова, О.В. Груздева, Ю.А. Дылева, Е.В. Белик
«Роль периваскулярной жировой ткани в развитии
атеросклеротических и неатеросклеротических
заболеваний» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21,
№ 4. С. 633–642.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-633-642
© Учасова Е.Г. и соавт., 2019

For citation:

E.G. Uchasova, O.V. Gruzdeva, Yu.A. Dyleva, E.V. Belik
“Role of perivascular adipose tissue in the development of
atherosclerotic and non-atherosclerotic diseases”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019,
Vol. 21, no. 4, pp. 633–642.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-633-642
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-633-642

to the adjacent arterial wall by diffusion, or through *vasa vasorum*. The present data indicate that perivascular adipose tissue plays an important role in atherosclerosis, hypertension. Recently, some studies were performed that examined the role of perivascular adipose tissue in non-atherosclerotic vascular diseases, such as neointimal formation, aortic aneurysm, arterial stiffness and vasculitis. The present review will discuss a role of perivascular adipose tissue in pathogenesis of atherosclerosis, hypertension and non-atherosclerotic vascular diseases.

Keywords: perivascular adipose tissue, adipokines, cytokines, atherosclerosis, hypertension, cardiovascular diseases

Введение

К периваскулярной жировой ткани (ПВЖТ) относят ее скопления вокруг сосудов, жировую клетчатку сосудистых сетей сердца, почек, мышц [9]. ПВЖТ является полноценным фрагментом сосудистой стенки, таким образом, что не один фасциальный слой не отделяет это жировое депо от сосудистой стенки. Отсутствие анатомического барьера предполагает, что медиаторы, такие как адипокины и цитокины, высвобождаемые из ПВЖТ, могут легко получить доступ к стенке кровеносного сосуда. Традиционно считалось, что ПВЖТ просто обеспечивает структурную поддержку кровеносных сосудов, однако за последние два десятилетия она была признана физиологически и метаболически активной эндокринной тканью с важными эффектами на сосудистую функцию и развитие заболеваний [15, 53]. Основная масса жировой ткани это — белая жировая ткань (БелЖТ), содержащаяся в висцеральных и подкожных складах, которая предназначена для хранения и мобилизации энергии. В зависимости от анатомического положения ПВЖТ проявляет признаки как белой, так и бурой жировой ткани (БурЖТ), последняя предназначена для термогенного расхода энергии [6]. Считается, что зрелые адипоциты внутри висцеральных и подкожных жировых складов происходят из клеток-предшественников с различными эмбриологическими линиями [1, 48], в то время как адипоциты ПВЖТ могут отличаться от других адипоцитов в силу их предполагаемого происхождения из предшественников сосудистых гладкомышечных клеток (ГМК) [7, 8]. Дифференциальная экспрессия генов развития *En-1*, *Emx-2* и *Nox-A10* предполагает, что адипоциты из анатомически разделенных жировых депо происходят из разных клеток-предшественников [48], что может вызвать фенотипические различия [9]. Периваскулярные коронарные адипоциты меньше и имеют более неправильную форму с меньшим накоплением липидов и сниженным состоянием дифференцировки по сравнению с подкожными и периренальными адипоцитами. Кроме того, экспрессия генов, ассоциированных с адипоцитами, таких как *PPAR γ* , *C/EBP α* и *FABP4*, синтаза жирных кислот, глицерина 3-фосфогидрогеназы 1, липопротеинлипаза, гормон-чувствительная липопротеинлипаза,

мРНК лептина и пептидных уровней, перилипина, и адипонектин ниже в ПВЖТ, чем в подкожных и периренальных жировых тканях [9]. Также периваскулярные адипоциты синтезируют более низкие уровни лептина, *TNF α* , *MCP-1* и адипонектина по сравнению с подкожной жировой тканью [34]. Адипоциты и клеточные компоненты ПВЖТ представляют собой сосудистую фракцию стромы, которая представляет собой гетерогенную популяцию клеток, содержащую различные иммунные клетки (главным образом макрофаги, В- и Т-лимфоциты), эндотелиальные и жировые стромальные клетки, известные своими регенеративными свойствами [4]. Кроме того, внеклеточный матрикс ПВЖТ образован коллагеновыми и эластичными волокнами [35].

Учитывая эти уникальные особенности ПВЖТ, существует большой интерес к пониманию ее роли в развитии сосудистой дисфункции. В различных исследованиях показано, что ПВЖТ у животных оказывает как защитное, так и пагубное воздействие на сосудистую функцию в зависимости от экспериментальной модели и связанных с ней патологических состояний, таких как ожирение и метаболические заболевания, которые влияют на производство и биологическую активность вазоактивных факторов и медиаторов воспаления. Установленные данные также свидетельствуют о том, что дисфункциональный ПВЖТ играет важную роль в развитии атеросклероза и гипертонии, путем частичного повышения инсулинорезистентности [14]. С другой стороны, функция ПВЖТ (как бурой ткани) может вызывать благоприятные метаболические эффекты, связанные не только с увеличением термогенеза, но и окислением свободных жирных кислот для улучшения атеросклероза [8]. В недавних исследованиях было показано, что ПВЖТ также может модулировать развитие других сосудистых заболеваний, включая артериальную ригидность сосудов, аневризму аорты и васкулит.

Периваскулярная жировая ткань и атеросклероз

В связи с тем, что ПВЖТ находится в непосредственном контакте с адвентицией сосудов она играет важную роль в развитии атеросклероза (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). Адипоциты ПВЖТ, клетки иммунной системы и фибробласты высвобождают вазоактивные вещества, такие как *NO*, ангиотензин, лептин и адипонектин, которые обладают вазодилатационным действием.

ПВЖТ также выпускает релаксирующий фактор, полученный из адипоцитов, который противодействует вазоконстрикции и тем самым регулирует сосудистый тонус [32]. Как и у других жировых тканей, объем ПВЖТ увеличивается при ожирении. В результате в ПВЖТ запускаются процессы гипоксии, усиливается инфильтрация ткани иммунными клетками (моноциты, лимфоциты и гранулоциты) и продукция провоспалительных адипокинов, цитокинов и хемокинов [51]. Воспаление распространяется на стенку сосуда, вызывая локальную эндотелиальную дисфункцию, в конечном счете способствуя развитию атеросклероза [23, 51]. Более того, защитные антисократительные свойства ПВЖТ, которые присутствуют в здоровом состоянии, отсутствуют у пациентов с ожирением [34].

Фенотипические различия между различными депо ПВЖТ (т.е. БелЖТ-подобная в брюшной ПВЖТ и БурЖТ-подобный в грудной ПВЖТ) могут отражаться в различной восприимчивости ткани к развитию атеросклероза. Так, абдоминальная и грудная ПВЖТ действуют как буфер против токсических уровней жирных кислот в артериальной циркуляции, абдоминальная ПВЖТ очищает жирные кислоты путем хранения жирных кислот, тогда как грудной ПВЖТ делает это путем индукции термогенеза. Экспрессия воспалительных генов и маркеров инфильтрации иммунных клеток (т.е. макрофагов и Т-клеток) выше в абдоминальном ПВЖТ, чем в грудном [36]. Абдоминальная (фенотип БелЖТ) ПВЖТ может способствовать развитию атеросклероза, тогда как грудной (фенотип БурЖТ) ПВЖТ может защитить от развития атеросклероза. Действительно, недавно было показано, что нарушение термогенеза в ПВЖТ приводит к развитию атеросклероза [8]. Таким образом, функционально адаптивный термогенез в ПВЖТ может защитить от развития атеросклероза. Однако вполне вероятно, что ожирение приводит к уменьшению термогенеза в БурЖТ-подобном ПВЖТ, что способствует развитию атеросклероза. В целом ПВЖТ оказывает благотворное влияние на функцию сосуда в здоровых условиях, поскольку она оказывает вазодилатирующее действие и улучшает буферную способность жирных кислот. При ожирении это депо жировой ткани становится дисфункциональным и развиваются вазоконстриктивные эффекты. При нарушении функционирования в ПВЖТ высвобождают повышенные уровни провоспалительных адипокинов, которые способствуют развитию атеросклероза, воздействуя непосредственно на сосудистую стенку [2, 47].

ПВЖТ и гипертония

ПВЖТ выпускает ряд сосудорасширяющих факторов, таких как адипоцитарный фактор ги-

перполяризации (ADRF), лептин, адипонектин, ангиотензин 1-7 (Ang 1-7), перекись водорода и оксида азота (NO) [8, 18, 47]. Кроме того, ПВЖТ продуцирует вазоконстрикторные факторы, такие как ангиотензин II (Ang II) и супероксидный анион [18, 19]. В физиологических условиях ПВЖТ высвобождает вещества для поддержания вазомоторного тонуса. При патофизиологических состояниях периваскулярная жировая ткань подвергается структурным и функциональным изменениям. В ранний период ожирения в ПВЖТ происходит увеличение адаптивного производства NO, вероятно, направленное на защиту сосудистой функции [20]. Однако при установленном ожирении ПВЖТ теряет свои антиконтрактивные свойства за счет увеличения окислительного стресса, что приводит к эндотелиальной дисфункции [20]. Кроме того, при ожирении происходит увеличение лептина, концентрация которого в плазме коррелирует с количеством жировой ткани [45]. Лептин участвует в регуляции тонуса сосудов, хотя механизмы его влияния еще неясны и противоречивы [2, 27]. Сосудистые эффекты лептина, по-видимому, являются результатом двух разных действий: косвенной вазоконстрикции посредством стимуляции симпатической активности на уровне гипоталамуса и прямой вазодилатации, от которой зависит функциональное состояние эндотелия различных сосудов [45]. Эксперименты *in vivo* у крыс показали, что введение лептина снижает артериальное давление путем увеличения NO. В изолированной аорте вазодилатация включает высвобождение NO через механизм, связанный с активацией эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) через Akt-зависимое фосфорилирование eNOS [42]. В брыжеечных артериях крыс лептин вызывает высвобождение гиперполяризующего фактора, полученного из эндотелия [18].

Кроме того, был описан эндотелий-независимый антиконтрактивный эффект лептина на Ang II-индуцированные сокращения. У людей лептин вызывает вазодилатацию в подкожной вене и внутренней молочный артерии через эндотелий-независимый механизм [18].

В последние время появились работы, изучающие роль макрофагов в развитии антиконтрактивного эффекта в ПВЖТ. Так, в недавнем исследовании Withers S.B. и соавт. [56] пришли к выводу, что активация макрофагов ответственна за потерю антиконтрактивного эффекта ПВЖТ в воспаленном периваскулярном жире. В другом исследовании Wenzel U.O. и соавт. [55] показали, что истощение моноцитов, которые являются предшественниками макрофагов, предотвращает экспериментально индуцированную гипертонию у мышей. Поэтому вполне возможно, что по-

теря антиконтракционного эффекта ПВЖТ при гипертонии может быть связана с накоплением провоспалительных факторов, выделяемых макрофагами. Так, уровень TNF α продуцируемый макрофагами в воспаленной ПВЖТ, при гипертонии сильно повышен. Таким образом, ПВЖТ, помимо обеспечения механической поддержки кровеносных сосудов, регулирует тонус гладкой мускулатуры сосудов посредством выпуска адипонектина, лептина и различных воспалительных факторов. Гипертензия связана с нарушением антиконтракционного эффекта в ПВЖТ, что указывает на роль периваскулярного жира в патогенезе гипертонии.

ПВЖТ и неатеросклеротические заболевания

ПВЖТ и неоинтимальное образование

Неоинтимальное образование инициируется механическим повреждением артериального эндотелия, а затем местным воспалительным клеточным вовлечением, продуцированием хемокинов и факторов роста, которые способствуют миграции VSMC и адвентициальных фибробластов в интимальный слой и неоваскуляризации [21]. ГМК сильно пролиферируют в интима и внеклеточной матрице, в процессе, аналогичном образованию рубца. ПВЖТ высвобождает множество адипокинов и цитокинов, которые потенциально могут регулировать различные стадии образования неоинтимы. У худых мышей адипонектин, продуцируемый ПВЖТ, оказывает противовоспалительное действие для ослабления образования неоинтимальной формации [33]. Напротив, Wang P. и соавт. показали, что висфатин (адипоцитокин с существенным влиянием на метаболизм глюкозы), продуцируемый в ПВЖТ, стимулирует пролиферацию ГМК [54]. В другом исследовании Schroeter M.R. и соавт. обнаружили увеличение экспрессии лептина в сонной артерии после повреждения сосудов [44]. Дальнейшие исследования продемонстрировали, что рекомбинантный лептин человека значительно увеличивает пролиферацию ГМК *in vitro*, что указывает на то, что ПВЖТ может способствовать образованию неоинтимы посредством локального образования лептина. Лептин также ассоциировался с фенотипическим переключением ГМК на синтетический фенотип посредством активации сигнального пути митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) p38 [31]. Кроме того, при ожирении в периваскулярном жировом депо повышается экспрессия провоспалительного моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), что также способствует пролиферации ГМК [25].

В работе Rudic R.D. и соавт. было показано, что эндотелиальная дисфункция связана с уменьшением образования оксида азота (NO)

за счет нарушения активности эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и делеции гена eNOS, способствующего реконструированию сосудов, и усиленного образования неоинтимы после лигирования внешней сонной артерии [41]. Кроме того, делеция eNOS вызывала экспрессию фактора роста-1 стромальной клетки, который играет важную роль в рекрутировании клеток-предшественников ГМК в неоинтима [37, 58]. ПВЖТ также может ингибировать продукцию эндотелием NO путем увеличения экспрессии кавеолина-1, что отрицательно регулирует eNOS путем прерывания передачи сигнала на систему кальций/кальмодулин [30]. Эти данные свидетельствуют о том, что ПВЖТ может способствовать развитию эндотелиальной дисфункции за счет нарушения сигнализации NO, тем самым способствуя образованию неоинтимы.

В настоящее время развитие неоваскуляризации адвентиции связывают с сосудистым рестенозом после повреждения артерии баллоном. Эти неососуды могут служить каналами для воспалительной клеточной транспортировки в поврежденный кровеносный сосуд, а разрывы неососудов потенциально могут способствовать кровоизлиянию внутри бляшки, приводящему к острой окклюзии сосудов [11]. Было продемонстрировано, что человеческие коронарные периваскулярные адипоциты выделяют более высокие уровни биологически активных проангиогенных факторов, чем подкожные адипоциты, что указывает на потенциальную роль в регуляции неоваскуляризации после повреждения сосудов [9]. В различных работах было показано: механическая артериальная травма индуцирует гистологические и фенотипические изменения локально в ПВЖТ, окружающей поврежденную артерию [38, 46]. Воспалительные лейкоциты были обнаружены в ПВЖТ только через 1 день после повреждения баллоном в коронарных артериях свиней, а экспрессия мРНК васкулярных молекул адгезии сосудистого эндотелия (VCAM)-1 была увеличена в ПВЖТ через 3 дня после повреждения [46].

Интересно, что воспалительные изменения в ПВЖТ у людей могут обнаруживаться с помощью компьютерной томографии (КТ) [3]. В исследовании Antonopoulos A.S. и соавт. продемонстрировано, что степень воспаления коронарного ПВЖТ коррелирует с индексом поглощения жира (FAI), отражающим изменения баланса между липидной и водной фазой из-за изменений в размере адипоцитов и содержании липидов [3]. Эти данные свидетельствуют о том, что биологические и фенотипические характеристики ПВЖТ могут динамически меняться в ответ на спонтанную дестабилизацию поражением и меха-

ническую травму. Фенотипические изменения в ПВЖТ происходят вскоре после повреждения сосудов, что приводит к изменениям в экспрессии и высвобождении различных хемокинов, цитокинов и адипокинов, которые могут регулировать воспаление, пролиферацию ГМК, неоваскуляризацию.

ПВЖТ и аневризма аорты

С каждым годом растет количество смертей от аневризмы аорты (АА), лишь около 25% пациентов доживают до операции, из них около 50% умирают после операции [29]. АА характеризуются локализованным структурным повреждением стенки аорты, что приводит к прогрессирующей дилатации и разрыву аорты. Формирование аневризмы часто сосуществует с атеросклерозом. Основные патологические особенности АА включают выраженную воспалительную клеточную инфильтрацию, окислительный стресс, активацию металлопротеиназ (ММР) и апоптоз гладкомышечных клеток, которые кумулятивно приводят к деградации внеклеточного матрикса, потере структурной целостности и ослаблению стенки аорты [28]. Воспаление в аорте распространяется по всей стенке сосуда на адвентицию, что говорит о потенциальной роли ПВЖТ в патогенезе АА. Было показано, что наиболее значимым фактором риска для АА является усиление провоспалительного статуса ПВЖТ за счет усиления экспрессии и активности P2X7R-инфламмосомального комплекса [40, 52].

Наработка воспалительными клетками ММР и ГМК является фундаментальным для патогенеза АА [28]. Дефицит ангиопоэтинподобного протеина в ПВЖТ ослабляет активность ММР-2 в сосудах и активирует деградацию внеклеточного матрикса [40]. Ожирение является фактором риска для АА [12]. Thanassoulis G. и соавт. показали, что количество ПВЖТ вокруг грудной и брюшной аорты, оцененное с помощью компьютерной томографии, положительно связано с диаметром аневризмы [49]. В Framingham Heart Study было показано, что местные жировые отложения могут способствовать развитию ремоделирования аорты [17]. Folkesson M. и соавт. изучали характеристики ПВЖТ у пациентов, подвергающихся плановому хирургическому вмешательству, и продемонстрировали, что АА окружена ПВЖТ, обогащенной воспалительными клетками (нейтрофилы, макрофаги, тучные клетки и Т-клетки) и протеазами (катепсин К и S) [17]. В воспаленной ПВЖТ увеличивается количество воспалительных цитокинов и ROS, что дополнительно способствует окислительному стрессу и деградации матрикса в сосудистой стенке. Более того, экспрессия провоспалительного IL-6 была увеличена в ПВЖТ в 4 раза по сравнению

с интимой/медиа тканей АА. Эти данные свидетельствуют о том, что ПВЖТ может играть сложную и многогранную роль в развитии АА.

ПВЖТ и артериальная ригидность

Артериальная ригидность является независимым предиктором сердечно-сосудистых событий, таких как сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, инсульт и дисфункция почек. Аортальная ригидность преимущественно определяется балансом белков внеклеточного матрикса, таких как коллаген и эластин, находящихся в артериальной стенке [26]. Коллаген 1 типа представляет собой коллагеновую изоформу, повышенная экспрессия которого ассоциирована с аортальной ригидностью. Напротив, экспрессия эластина, апротеина, который обеспечивает эластичность артериям, обратно пропорциональна развитию аортальной ригидности. В последних работах есть данные о том, что аортальная жесткость положительно коррелирует с толщиной ПВЖТ, независимо от индекса массы тела [5].

В работе Schnabel R. и соавт. было показано, что IL-6, полученный из ПВЖТ, связан с увеличением аортальной жесткости [43]. Du и соавт. исследовали, способствует ли аортальный ПВЖТ у гиперлипидемических мышей развитию жесткости аорты и ремоделированию посредством секреции IL-6 из ПВЖТ. В своей работе они оценивали внутреннюю механическую жесткость в сегментах аорты *in vivo* по скорости пульсовой волны аорты и в методах *ex vivo* [13]. По сравнению с мышами дикого типа у гиперлипидемических мышей наблюдалась повышенная скорость распространения пульсовой волны в аорте и внутренняя механическая жесткость, которая была связана с более высокой экспрессией коллагена 1-го типа и конечных продуктов гликирования. Важно отметить, что у мышей с повышенным уровнем липидов секреция IL-6 из ПВЖТ была выше, чем у мышей дикого типа, а усиленная внутренняя механическая жесткость аорты была отменена нейтрализующим антителом к IL-6 у гиперлипидемических мышей. Эти данные свидетельствуют о том, что дисфункциональный ПВЖТ может способствовать внутренней механической жесткости и ремоделированию посредством усиления продукции IL-6. Chen J.Y. и соавт. сообщили, что медиаторы, высвобождаемые из ПВЖТ, ослабляют активность лизилоксидазы, тем самым способствуя фрагментации эластина и аортальной жесткости [10]. Таким образом, накопление ПВЖТ потенциально может ухудшить устойчивость эластичного волокна и способствует развитию ригидности аорты.

Чтобы исследовать модуляционную роль ПВЖТ в артериальной ригидности, периваскулярную ткань трансплантировали от молодых

мышей (4–6 месяцев) старым мышам (26–28 месяцев) или от старых мышей (получавших темпол (миметик супероксиддисмутаза)) на брюшную аорту молодых мышей-реципиентов [16]. Восемь недель спустя после трансплантации ПЖТ молодые мыши-реципиенты с пересаженной жировой тканью от старых мышей имели большую аортальную активность *in vivo* (увеличенная скорость пульсовой волны аорты) и *ex vivo* (внутренняя механическая жесткость) по сравнению с теми, которым была трансплантирована жировая ткань от молодых доноров. Эти результаты свидетельствуют о том, что окислительный стресс в ПЖТ может способствовать возраст-зависимой аортальной жесткости посредством увеличения экспрессии коллагена 1-го типа, который потенциально может быть аннулирован целенаправленной антиоксидантной терапией ПЖТ.

ПЖТ и синдром васкулита

Васкулит представляет собой гетерогенную группу комплексных расстройств, характеризующихся острым и хроническим воспалительным поражением сосудистой стенки. Ключевым компонентом васкулитов является инфильтрация макрофагов, которая особенно заметна в адвентиции сосудов [24]. Инфильтрация воспалительных клеток в ПЖТ также была продемонстрирована в васкулитных синдромах [39].

Артериит Такаясу (АТ) является первичной воспалительной болезнью крупных эластичных артерий, таких как аорта и ее основные ветви, с заметным накоплением гранулем. Болезнь характеризуется острой фазой конституциональных симптомов, за которой следует сосудистая фаза, ведущая к артериальному стенозу, окклюзии и иногда образованию аневризмы. Артери-

ит Такаясу диагностируется по типичным клиническим признакам, визуализируется сужение аорты или ее ветвей вблизи их происхождения с помощью обычной компьютерной томографии, магнитно-резонансной ангиографии или ультразвукографии [22]. Интересно отметить, что у пациентов с артериитом Такаясу наблюдалась большая распространенность метаболического синдрома и более высокие уровни лептина и резистина, низкие уровни адипонектина по сравнению с сопоставимым по возрасту контролем [57]. В то время как в нескольких исследованиях была продемонстрирована связь между ПЖТ и различными васкулитами, однако прямых доказательств патогенной роли ПЖТ на настоящее время не найдено.

Заключение

Важность ПЖТ как паракринного модулятора сосудистой функции становится все более очевидной. Сложные механизмы действия ПЖТ на сосудистые сокращения, вероятно, связаны с патогенезом сосудистой дисфункции при ожирении/метаболическом синдроме, гипертонии и атеросклеротических и неатеросклеротических заболеваниях. Гипоксия, воспаление и окислительный стресс в ПЖТ приводят к нарушению высвобождения вазоактивных факторов из жировой ткани и нарушению нормальной функции ПЖТ. До сих пор остается неясным, как дисфункциональная, воспаленная периваскулярная жировая ткань влияет на сосудистую дисфункцию. Однако каким бы ни был конкретный механизм воспаления, который возникает на ранней стадии патогенеза сосудистого заболевания, он может дать направление для поиска новых методов диагностики и лечения.

Список литературы / References

1. Груздева О.В., Акбашева О.Е., Дылева Ю.А., Антонова Л.В., Матвеева В.Г., Учасова Е.Г., Фанаскова Е.В., Каретникова В.Н., Иванов С.В., Барбараш О.Л. Адипокиновый и цитокиновый профили эпикардальной и подкожной жировой ткани у пациентов с ишемической болезнью сердца // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2017. Т. 163, № 5. С. 560–563. [Gruzdeva O.V., Akbasheva O.E., Dyleva Yu.A., Antonova L.V., Matveeva V.G., Uchasova E.G., Fanaskova E.V., Karetnikova V.N., Ivanov S.V., Barbarash O.L. Adipokine and cytokine profiles of epicardial and subcutaneous adipose tissue in patients with coronary heart disease. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2017, Vol. 163, no. 5, pp. 560–563. (In Russ.)]
2. Отт А.В., Чумакова Г.А., Веселовская Н.Г. Значение лептинорезистентности в развитии различных метаболических фенотипов ожирения // Российский кардиологический журнал, 2016. Т. 4, № 132. С. 14–18. [Ott A.V., Chumakova G.A., Veselovskaya N.G. Resistance to leptin in development of different obesity phenotypes. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal* = *Russian Journal of Cardiology*, 2016, Vol. 4, no. 132. pp. 14–18. (In Russ.)]
3. Antonopoulos A.S., Sanna F., Sabharwal N., Thomas S., Oikonomou E.K., Herdman L. Detecting human coronary inflammation by imaging perivascular fat. *Sci. Transl. Med.*, 2017, Vol. 9, eal2658. doi: 10.1126/scitranslmed.aal2658.

4. Bourlier V., Zakaroff-Girard A., Miranville A., de Barros S., Maumus M., Sengenès C. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation*, 2008, Vol. 11, pp. 806-815.
5. Britton K.A., Wang N., Palmisano J., Corsini E., Schlett C.L., Hoffmann U. Thoracic periaortic and visceral adipose tissue and their cross-sectional associations with measures of vascular function. *Obesity (Silver Spring)*, 2013, Vol. 21, no. 7, pp. 1496-1503.
6. Brown N.K., Zhou Z., Zhang J., Zeng R., Wu J., Eitzman D.T., Chen Y.E., Chang L. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2014, Vol. 34, no. 8, pp. 1621-1630.
7. Cai X., Lin Y., Hauschka P.V., Grottkau B.E. Adipose stem cells originate from perivascular cells. *Biol. Cell*, 2011, Vol. 103, pp. 435-447.
8. Chang L., Villacorta L., Li R., Hamblin M., Xu W., Dou C., Zhang J., Wu J., Zeng R., Chen Y.E. Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. *Circulation*, 2012, Vol. 126, pp. 1067-1078.
9. Chatterjee T.K., Stoll L.L., Denning G.M., Harrelson A., Blomkalns A.L., Idelman G., Rothenberg F.G., Neltner B., Romig-Martin S.A., Dickson E.W., Rudich S., Weintraub N.L. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: Influence of high-fat feeding. *Circ. Res.*, 2009, Vol. 104, pp. 541-549.
10. Chen J.Y., Tsai P.J., Tai H.C., Tsai R.L., Chang Y.T., Wang M.C., Chiou Y.W., Yeh M.L., Tang M.J., Lam C.F., Shieh S.C., Li Y.H., Tsai W.C., Chou C.H., Lin L.J., Wu H.L., Tsai Y.S. Increased aortic stiffness and attenuated lysyl oxidase activity in obesity significance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2013, Vol. 33, pp. 839-846.
11. Chen Y.C., Huang A.L., Kyaw T.S., Bobik A., Peter K. Atherosclerotic plaque rupture: identifying the straw that breaks the camel's back. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2016, Vol. 36, pp. 63-72.
12. Cronin O., Walker P. J., Gollidge J. The association of obesity with abdominal aortic aneurysm presence and growth. *Atherosclerosis*, 2013, Vol. 226, pp. 321-327.
13. Du B., Ouyang A., Eng J.S., Fleenor B.S. Aortic perivascular adiposederived interleukin-6 contributes to arterial stiffness in low-density lipoprotein receptor deficient mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2015, Vol. 308, pp. 1382-1390.
14. Fernández-Alfonso M.S., Somoza B., Tsvetkov D., Kuczmanski A., Dashwood M., Gil-Ortega M. Role of perivascular adipose tissue in health and disease. *Compr. Physiol.*, 2018, Vol. 8, pp. 23-59.
15. Fitzgibbons T.P., Czech M.P. Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinical associations. *J. Am. Heart Assoc.*, 2014, Vol. 3, e000582. doi: 10.1161/JAHA.113.000582.
16. Fleenor B.S., Eng J.S., Sindler A.L., Pham B.T., Kloor J.D., Seals D.R. Superoxide signaling in perivascular adipose tissue promotes age-related artery stiffness. *Aging Cell*, 2014, Vol. 13, pp. 576-578.
17. Folkesson M., Vorkapic E., Gulbins E., Japtok L., Kleuser B., Welander M., Länne T., Wågsäter D. Inflammatory cells, ceramides, and expression of proteases in perivascular adipose tissue adjacent to human abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.*, 2017, Vol. 65, pp. 1171-1179.
18. Gálvez-Prieto B., Somoza B., Gil-Ortega M., García-Prieto C.F., de Las Heras A.I., González M.C., Arribas S., Arangué I., Bolbrinker J., Kreutz R., Ruiz-Gayo M., Fernández-Alfonso M.S. Anticontractile effect of perivascular adipose tissue and leptin are reduced in hypertension. *Front. Pharmacol.*, 2012, Vol. 3, p. 103.
19. Gao Y.J., Takemori K., Su L.Y., An W.S., Lu C., Sharma A.M., Lee R.M. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovasc. Res.*, 2006, Vol. 71, pp. 363-373.
20. Gil-Ortega M., Condezo-Hoyos L., García-Prieto C.F., Arribas S.M., González M.C., Arangué I., Ruiz-Gayo M., Somoza B., Fernández-Alfonso M.S. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 4, e95312. doi: 10.1371/journal.pone.0095312.
21. Goel S.A., Guo L.W., Liu B., Kent K.C. Mechanisms of post-intervention arterial remodelling. *Cardiovasc. Res.*, 2012, Vol. 96, pp. 363-371.
22. Gotway M.B., Araoz P.A., Macedo T.A., Stanson A.W., Higgins C.B., Ring E.J., Dawn S.K., Webb W.R., Leung J.W., Reddy G.P. Imaging findings in Takayasu's arteritis. *Am. J. Roentgenol.*, 2005, Vol. 184, pp. 1945-1950.
23. Gruzdeva O., Uchasova E., Dyleva Y., Borodkina D., Akbasheva O., Belik E., Karetnikova V., Brel N., Kokov A., Kashtalov V., Barbarash O. Relationships between epicardial adipose tissue thickness and adipo-fibrokin indicator profiles post-myocardial infarction. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2018, Vol. 17, p. 40.
24. Hansson G.K., Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, pp. 204-212.
25. Horimatsu T., Kim H.W., Weintraub N.L. The role of perivascular adipose tissue in non-atherosclerotic vascular disease. *Front. Physiol.*, 2017, Vol. 8, p. 969.
26. Kitzman D.W., Herrington D.M., Brubaker P.H., Moore J.B., Eggebeen J., Haykowsky M.J. Carotid arterial stiffness and its relationship to exercise intolerance in older patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Hypertension*, 2013, Vol. 61, pp. 112-119.
27. Knudson J.D., Payne G.A., Borbouse L., Tune J.D. Leptin and mechanisms of endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2008, Vol. 10, pp. 434-439.

28. Kuivaniemi H., Ryer E.J., Elmore J.R., Tromp G. Understanding the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, 2015, Vol. 13, pp. 975-987.
29. Lederle F.A., Johnson G.R., Wilson S.E., Ballard D.J., Jordan W.D. Jr., Blebea J., Littooy F.N., Freischlag J.A., Bandyk D., Rapp J.H., Salam A.A. Rupture rate of large abdominal aortic aneurysms in patients refusing or unfit for elective repair. *JAMA*, 2002, Vol. 287, pp. 2968-2972.
30. Lee M.H., Chen S.J., Tsao C.M., Wu C.C. Perivascular adipose tissue inhibits endothelial function of rat aortas via caveolin-1. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, e99947. doi:10.1371/journal.pone.0099947.
31. Li H., Wang Y.P., Zhang L.N., Tian G. Perivascular adipose tissue derived leptin promotes vascular smooth muscle cell phenotypic switching via p38 mitogen-activated protein kinase in metabolic syndrome rats. *Exp. Biol. Med.*, 2014, Vol. 239, pp. 954-965.
32. Lohn M., Dubrovskaya G., Lauterbach B., Luft F.C., Gollasch M., Sharma A.M., Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J.: Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 2002, Vol. 16, pp. 1057-1063.
33. Matsuda M., Shimomura I., Sata M., Arita Y., Nishida M., Maeda N., Kumada M., Okamoto Y., Nagaretani H., Nishizawa H., Kishida K., Komuro R., Ouchi N., Kihara S., Nagai R., Funahashi T., Matsuzawa Y. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis the missing link of adipovascular axis. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, pp. 37487-37491.
34. Mauro C.R., Ilonzo G., Nguyen B.T., Yu P., Tao M., Gao I., Seidman M.A., Nguyen L.L., Ozaki C.K. Attenuated adiposopathy in perivascular adipose tissue compared with subcutaneous human adipose tissue. *Am. J. Surg.*, 2013, Vol. 206, pp. 241-244.
35. Miao C.Y., Li Z.Y. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br. J. Pharmacol.*, 2012, Vol. 165, pp. 643-658.
36. Padilla J., Jenkins N.T., Vieira-Potter V.J., Laughlin M.H. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2013, Vol. 304, pp. 543-552.
37. Payne G.A., Bohlen H.G., Dincer U.D., Borbouse L., Tune J.D. Periadventitial adipose tissue impairs coronary endothelial function via PKC beta-dependent phosphorylation of nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2009, Vol. 297, pp. 460-465.
38. Rajsheker S., Manka D., Blomkalns A.L., Chatterjee T.K., Stoll L.L., Weintraub N.L. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2010, Vol. 10, pp. 191-196.
39. Richards B.L., March L., Gabriel S.E. Epidemiology of large-vessel vasculidities. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2010, Vol. 24, pp. 871-883.
40. Rossi C., Santini E., Chiarugi M., Salvati A., Comassi M., Vitolo E., Solini A. The complex P2X7 receptor/ inflammasome in perivascular fat tissue of heavy smokers. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 44, pp. 295-302.
41. Rudic R.D., Shesely E. G., Maeda N., Smithies O., Segal S.S., Sessa W.C. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J. Clin. Invest.*, 1998, Vol. 101, pp. 731-736.
42. Sahin A.S., Bariskaner H., Gökbil H., Okudan N. The dual effects of leptin on aortic rings with and without endothelium isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 2009, Vol. 31, pp. 325-329.
43. Schnabel R., Larson M.G., Dupuis J., Lunetta K.L., Lipinska I., Meigs J.B., Yin X., Rong J., Vita J.A., Newton-Cheh C., Levy D., Keaney J.F. Jr, Vasan R.S., Mitchell G.F., Benjamin E.J. Relations of inflammatory biomarkers and common genetic variants with arterial stiffness and wave reflection. *Hypertension*, 2008, Vol. 51, pp. 1651-1657.
44. Schroeter M.R., Eschholz N., Herzberg S., Jerchel I., Leifheit-Nestler M., Czepluch F.S., Chalikias G., Konstantinides S., Schäfer K. Leptin dependent and leptin independent paracrine effects of perivascular adipose tissue on neointima formation significance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2013, Vol. 33, pp. 980-987.
45. Somoza B., Guzmán R., Cano V., Merino B., Ramos P., Díez-Fernández C. Fernández-Alfonso M.S., Ruiz-Gayo M. Induction of cardiac uncoupling protein-2 expression and adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase phosphorylation during early states of diet-induced obesity in mice. *Endocrinology*, 2007, Vol. 148, pp. 924-931.
46. Takaoka M., Suzuki H., Shioda S., Sekikawa, K., Saito Y., Nagai R., Sata M. Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010, Vol. 30, pp. 1576-1582.
47. Tanaka K., Sata M. Roles of Perivascular adipose tissue in the pathogenesis of atherosclerosis. *Front. Physiol.*, Vol. 9, p. 3.
48. Tchkonina T., Lenburg M., Thomou T., Giorgadze N., Frampton G., Pirtskhalava T., Cartwright A., Cartwright M., Flanagan J., Karagiannides I., Gerry N., Forse R.A., Tchoukalova Y., Jensen M.D., Pothoulakis C., Kirkland J.L. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2007, Vol. 292, pp. 298-307.
49. Thanassoulis G., Massaro J.M., Corsini E., Rogers I., Schlett C.L., Meigs J.B., Hoffmann U., O'Donnell C.J., Fox C.S. Periaortic adipose tissue and aortic dimensions in the Framingham Heart Study. *J. Am. Heart Assoc.*, 2012, Vol. 1, e000885. doi:10.1161/JAHA.112.000885.
50. Tian Z., Miyata K., Tazume H., Sakaguchi H., Kadomatsu T., Horio E., Komohara Y., Araki K., Hirata Y., Tabata M., Takanashi S., Takeya M., Hao H., Shimabukuro M., Sata M., Kawasuji M., Oike Y. Perivascular adipose

tissue-secreted angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) accelerates neointimal hyperplasia after endovascular injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2013, Vol. 57, pp. 1-12.

51. van Dam A.D., Boon M.R., Berbée J.F.P., Rensen P.C.N., van Harmelen V. Targeting white, brown and perivascular adipose tissue in atherosclerosis development. *Eur. J. Pharmacol.*, 2017, Vol. 816, pp. 82-92.

52. Vardulaki K.A., Walker N.M., Day N.E., Duffy S.W., Ashton H.A., Scott R.A. Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br. J. Surg.*, 2000, Vol. 87, pp. 195-200.

53. Verhagen S.N., Visseren F.L. Perivascular adipose tissue as a cause of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2011, Vol. 214, pp. 3-10.

54. Wang P., Xu T.Y., Guan Y.F., Su D.F., Fan G.R., Miao C.Y. Perivascular adipose tissue-derived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: role of nicotinamide mononucleotide. *Cardiovasc. Res.*, 2009, Vol. 81, pp. 370-380.

55. Wenzel U.O., Bode M., Köhl J., Ehmke H. A pathogenic role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2017, Vol. 312, no. 3, pp. 349-354.

56. Withers S.B., Agabiti-Rosei C., Livingstone D.M., Little M.C., Aslam R., Malik R.A., Heagerty A.M. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011, Vol. 31, no. 4, pp. 908-913.

57. Yilmaz H., Gerdan V., Kozaci D., Solmaz D., Akar S., Can G., Gulcu A., Goktay Y., Sari I., Birlik M., Akkoc N., Onen F. Ghrelin and adipokines as circulating markers of disease activity in patients with Takayasu arteritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2012, Vol. 14, p. 272.

58. Zhang L.N., Wilson D.W., Cunha V.D., Sullivan M.E., Vergona R., Rutledge J.C., Wang Y.X. Endothelial NO synthase deficiency promotes smooth muscle progenitor cells in association with upregulation of stromal cell derived factor-1a in a mouse model of carotid artery ligation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006, Vol. 26, pp. 765-772.

Авторы:

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

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

Authors:

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

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

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

Белик Е.В. — младший научный сотрудник лаборатории исследований гомеостаза отдела диагностики сердечно-сосудистых заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Dyleva Yu.A., PhD (Medicine), |Senior Research Associate, Laboratory of Homeostasis Research, Federal State Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Belik E.V., Junior Research Associate, Laboratory of Homeostasis Research, Federal State Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 04.09.2018
Принята к печати 19.09.2018

Received 04.09.2018
Accepted 19.09.2018

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИМУСА И СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ У САМОК КРЫС ВИСТАР С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ

Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В., Сладкопеевцев А.С.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Резюме. Гипоксия и иммунные реакции тесно взаимосвязаны между собой на молекулярном, клеточном и организменном уровнях, а особи отличаются по устойчивости к недостатку кислорода. Животные с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии имеют различные адаптационные возможности и предрасположенность к развитию воспалительных заболеваний. Данные об индивидуальных особенностях устойчивости самок лабораторных животных и лиц женского пола к гипоксии и ее взаимосвязи с реакциями иммунной системы как в норме, так и при воспалительных заболеваниях в литературе отсутствуют. Однако известно, что по сравнению с мужчинами у женщин и самок лабораторных животных реже развиваются и легче протекают острые инфекционно-воспалительные заболевания, что может определяться более высокой устойчивостью самок к гипоксии. Цель — выявить особенности морфофункциональных изменений тимуса и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при системном воспалительном ответе, индуцированном введением ЛПС, у самок крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии.

Устойчивости к гипоксии половозрелых самок крыс Вистар определяли по времени жизни в вентилируемой барокамере «на высоте» 11 500 м. К высокоустойчивым к гипоксии относили крыс, время жизни которых составляло более 180 с, к низкоустойчивым — менее 20 с. Через месяц после определения устойчивости к гипоксии самкам в фазу диэструса внутрибрюшинно вводили липополисахарид *E. coli* O26:B6 в дозе 1,5 мг/кг. Животных выводили из эксперимента через сутки после введения ЛПС путем внутримышечного введения золетила в дозе 15 мг/кг. На препаратах тимуса оценивали объемную долю коркового и мозгового вещества, в печени определяли площадь некрозов, в легких подсчитывали число нейтрофилов в междольково-артериальных перегородках. Определяли содержание в сыворотке крови кортикостерона, тестостерона, TGF- β . Проводили цитофлуориметрическую оценку относительного и абсолютного количества основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови. Оценивали число апоптотически гибнущих клеток тимуса. Для статистической обработки полученных данных использовали программу Statistica 8.0, использовали критерии множественного сравнения Краскела—Уоллиса, Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Как у высоко-, так и у низкоустойчивых к гипоксии самок развитие системного воспалительного ответа сопровождается умеренно выраженной акцидентальной инволюцией тимуса, апоптозом тимоцитов, увеличением абсолютного числа NK, повышением содержания тестостерона и кортикостеро-

Адрес для переписки:

Косырева Анна Михайловна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
морфологии человека»
117418, Россия, Москва, ул. Цюрупы, 3.
Тел.: 8 (926) 950-17-50.
Факс: 8 (499) 120-80-65.
E-mail: kosyreva.a@list.ru

Address for correspondence:

Kosyreva Anna M.
Research Institute of Human Morphology
117418, Russian Federation, Moscow, Tsurupa str., 3.
Phone: 7 (926) 950-17-50.
Fax: 7 (499) 120-80-65.
E-mail: kosyreva.a@list.ru

Образец цитирования:

А.М. Косырева, Д.Ш. Джалилова, О.В. Макарова,
А.С. Сладкопеевцев «Морфофункциональные изменения
тимуса и содержание субпопуляций лимфоцитов
в крови у самок крыс Вистар с разной устойчивостью
к гипоксии при системном воспалительном ответе»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4.
С. 643–652. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-643-652
© Косырева А.М. и соавт., 2019

For citation:

A.M. Kosyreva, D.Sh. Dzhaliilova, O.V. Makarova,
A.S. Sladkopevtsev "Morpho-functional changes of thymus
and contents of blood lymphocyte subpopulations in female
Wistar rats with different resistance to hypoxia in systemic
inflammatory response", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4,
pp. 643–652. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-643-652
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-643-652

на. По сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии самок введение ЛПС приводит к более тяжелым проявлениям системного воспаления — выраженной воспалительной реакции в легких и высоким показателем площади некрозов в печени, что сопровождается увеличением числа регуляторных Т-лимфоцитов и Т-хелперов на фоне более выраженной акцидентальной инволюции тимуса и апоптотической гибели тимоцитов. У высокоустойчивых к гипоксии самок системные проявления воспаления менее выражены, что, по-видимому, связано с активацией миграции лимфоцитов из тимуса и крови в очаг воспаления и развитием более эффективного иммунного ответа.

Вывод: иммунные реакции при системном воспалительном ответе, индуцированном ЛПС, у самок крыс Вистар зависят от устойчивости их к гипоксии, что необходимо использовать для разработки подходов к персонализированной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний у лиц женского пола.

Ключевые слова: тимус, регуляторные Т-лимфоциты, Т-хелперы, устойчивость к гипоксии, самки, системный воспалительный ответ, ЛПС

MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES OF THYMUS AND CONTENTS OF BLOOD LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN FEMALE WISTAR RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA IN SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE

Kosyreva A.M., Dzhililova D.Sh., Makarova O.V., Sladkopevtsev A.S.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Hypoxia and immune reactions are closely interrelated at molecular, cellular and organism levels, and the individuals differ in resistance to oxygen deficiency. Animals with high and low resistance to hypoxia have different adaptive capabilities and predisposition to the development of inflammatory diseases. Data on the individual characteristics of hypoxia resistance in female laboratory animals and humans, and its relationship to immune system reactions in both normal conditions and inflammatory diseases are not available in the literature. It is known, however, that acute infectious and inflammatory diseases develop at lesser rates and are less severe in women and female laboratory animals than in males, which can be explained by higher resistance of females to hypoxia. The aim of our study is to reveal the features of morpho-functional thymus changes, and subpopulation of peripheral blood lymphocytes in systemic inflammatory response induced by LPS administration to female Wistar rats with different resistance to hypoxia.

Resistance of mature female Wistar rats to hypoxia was determined as a survival period in a ventilated low-pressure chamber simulating high altitude condition (11 500 m). The rats with a lifetime "at high altitude" of > 180 s have been classified as highly resistant to hypoxia, and the animals surviving for < 20 seconds were designated low-resistant. One month after determining the hypoxia resistance, the females were injected intraperitoneally with *E. coli* O26:B6 lipopolysaccharide (LPS) at a dose of 1.5 mg/kg during the dioestrus phase. The animals were withdrawn from the experiment by i/m Zoletyl injection (15 mg/kg) one day after LPS administration. The relative volume fractions of thymic cortex and medulla were evaluated; the areas of necrosis were determined in the liver, and the number of neutrophils in the interalveolar septa was counted in the lungs. The serum contents of corticosterone, testosterone, TGF- β were determined. A flow cytometry evaluation of the relative and absolute numbers was performed for major subpopulations of lymphocytes in peripheral blood. The number of apoptotically dying cells of the thymus was assessed. For statistical processing of the obtained data, the Statistica 8.0 software was applied, using criteria of multiple comparisons by Kruskal–Wallis and Dann. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

In both high- and low-resistant to hypoxia females, the development of a systemic inflammatory response was accompanied by a moderately severe thymic involution, apoptosis of thymocytes, an increase in the absolute number of NK, and rise of testosterone and corticosterone contents. LPS injection into low-resistant rats, if compared to females highly resistant to hypoxia, led to more severe manifestations of systemic inflammation, i.e., a pronounced inflammatory reaction in the lungs and a more extensive liver necrotic area accompanied by increased absolute numbers of regulatory T lymphocytes and T helper cells, and more pronounced thymic accidental involution with apoptotic death of thymocytes. Systemic manifestations of inflammation were less pronounced in hypoxia-resistant female rats, which was apparently associated with activation of lymphocyte

migration from the thymus and blood to the inflammation focus, and development of more effective immune response.

Conclusion: immune reactions in the systemic inflammatory response induced by LPS in female Wistar rats depend on individual resistance to hypoxia. These data should be used to develop approaches to personalized therapy of infectious and inflammatory diseases in women.

Keywords: thymus, T regulatory lymphocytes, T helpers, resistance to hypoxia, females, systemic inflammatory response, lipopolysaccharide

Введение

В развитии системных воспалительных реакций и сепсиса ключевую роль играет гипоксия, возникающая в результате микроциркуляторных нарушений, обусловленных диссеминированным внутрисосудистым свертыванием [11]. Выраженность гипоксических повреждений тканей и органов зависит не только от микроциркуляторных нарушений, но и во многом определяется индивидуальной устойчивостью к гипоксии, что не учитывается при терапии и в экспериментальных исследованиях. Известно, что гипоксия и иммунные реакции тесно взаимосвязаны между собой на молекулярном, клеточном и организменном уровнях [14], а особи отличаются по устойчивости к недостатку кислорода [4, 13], в том числе по содержанию фактора, индуцируемого гипоксией, — HIF-1 α . Животные с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии имеют различные адаптационные возможности и предрасположенность к развитию воспалительных заболеваний: у низкоустойчивых животных после гипоксической нагрузки повышается содержание маркера окислительного стресса 8-изопростана, что сопряжено с повреждением клеточных макромолекул и увеличением уровня TGF- β [3]. При введении ЛПС в клетки печени у низкоустойчивых к гипоксии самцов крыс Вистар наблюдается более выраженное повышение уровня экспрессии HIF-1 α , чем у высокоустойчивых животных, что может определять индивидуальные особенности течения воспалительных заболеваний. Так, показано, что при сепсисе уровень экспрессии HIF-1 α в моноцитах положительно коррелирует с выраженностью иммуносупрессии: HIF-1 α активирует IRAK-M — негативный регулятор Toll-подобных рецепторов — TLR [21]. HIF-1 α также может активировать NF- κ B (ядерный фактор, определяющий развитие провоспалительного иммунного ответа), поскольку ингибиторы, способствующие убиквитин-зависимому разрушению HIF-1 α , контролируют также активность киназного комплекса IKK, отвечающего за регуляцию NF- κ B [12, 17]. По данным Peyssonnaud и соавт. [18], при системных инфекциях, таких как сепсис, высокий уровень HIF-1 α коррелирует с неблагоприятным прогнозом и активацией провоспалительных реакций, о чем свидетель-

ствует повышение в сыворотке крови содержания провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α и снижение противовоспалительного — IL-10. Исходя из этого, можно предположить, что у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных выраженность воспалительного ответа может различаться, так же как и морфофункциональное состояние иммунной системы в норме и при системном воспалительном ответе.

Немногочисленными исследованиями показано, что, помимо индивидуальных различий устойчивости к гипоксии, существуют и половые различия. Установлено, что после остановки сердца одинаковой длительности у самок в постреанимационном периоде повышение уровня экспрессии нейротрофического фактора мозга — BDNF и гибель нейронов выражены меньше, чем у самцов, что косвенно отражает более высокую устойчивость нервных клеток ЦНС к гипоксии у самок [1]. Данные об индивидуальных особенностях устойчивости самок лабораторных животных и лиц женского пола к гипоксии и ее взаимосвязи с реакциями иммунной системы как в норме, так и при воспалительных заболеваниях в литературе отсутствуют. Однако известно, что по сравнению с мужчинами у женщин и самок лабораторных животных реже развиваются и легче протекают острые инфекционно-воспалительные заболевания [2, 5, 24], что может определяться более высокой устойчивостью самок к гипоксии.

Цель исследования — выявить особенности морфофункциональных изменений тимуса и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при системном воспалительном ответе, индуцированном введением ЛПС, у самок крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии.

Материалы и методы

Исследования проведены на половозрелых самках ($n = 60$) крыс Вистар, массой тела 200–250 г, с устойчивым 4-дневным эстральным циклом. Фазу эстрального цикла определяли по влагалищным мазкам. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г. На проведение эксперимента было получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ

«НИИ морфологии человека» (протокол № 18а от 22.12.2016 г.). Крыс содержали в пластиковых клетках (60 × 18,5 × 38 см) социальными группами по 6 голов в каждой. Температура в помещении вивария поддерживалась в пределах 18–22 °С, влажность — 50–65%. Доступ к воде и пище был свободным.

С целью определения устойчивости к гипоксии крыс Вистар помещали в вентилируемую барокамеру «на высоту» 11 500 м [7]. Подъем «на высоту» осуществляли со скоростью 80 м/с. В помещении, где проводилось тестирование, поддерживалась температура 20–22 °С. Устойчивость к гипоксии определяли по времени жизни «на высоте», соответствующему временному интервалу от момента подъема до принятия животным бокового положения. К высокоустойчивым к гипоксии относили крыс, время жизни которых «на высоте» составляло более 180 с (n = 16), к низкоустойчивым — менее 20 с (n = 20). Среднеустойчивых к гипоксии крыс (n = 24) в экспериментах не использовали. С целью исключения влияния физиологических колебаний женских

половых гормонов в течение эстрального цикла тестирование самок в барокамере проводили в две фазы эстрального цикла — диэструсе и проэструсе (рис. 1).

Через месяц после определения устойчивости к гипоксии самкам в фазу диэструса внутрибрюшинно вводили липополисахарид *E. coli* O26:B6 (Sigma, США) в дозе 1,5 мг/кг, вызывающей развитие воспалительного процесса и дистрофических изменений в органах-мишенях — печени и легких [8]. Выбор фазы эстрального цикла определялся тем, что, по нашим данным, по сравнению с другими фазами эстрального цикла введение ЛПС в фазу диэструса приводит к более выраженным воспалительным изменениям в органах-мишенях — печени и легких [6]. Животным контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Для оценки структурных изменений тимуса и субпопуляционного состава лимфоцитов при системном воспалительном ответе животных выводили из эксперимента через сутки после введения ЛПС путем внутримышечного введения золетила в дозе 15 мг/кг (Virbac Sante Animale, Франция).

Для морфологического исследования проводили забор фрагментов тимуса, печени и легких, фиксировали их в жидкости Буэна (легкие — в жидкости Карнуа), изготавливали гистологические срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином. Получали цифровые изображения гистологических срезов тимуса и печени, проводили их компьютерный морфометрический анализ в программном пакете для обработки биомедицинских изображений ImageJ (NIH) 1.51h в варианте Fiji. На препаратах тимуса оценивали объемную долю коркового и мозгового вещества методом точечного счета при ув. 100. В печени определяли площадь некрозов при ув. 200. В легких подсчитывали число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках на стандартное поле зрения (25 000 мкм²) при ув. 400.

Методом иммуноферментного анализа определяли содержание в сыворотке крови стероидных гормонов — кортикостерона (Cloud-Clone Corp., США), тестостерона (Cusabio, КНР), а также противовоспалительного цитокина — TGF-β (eBioscience, США).

Проводили цитофлуориметрическую оценку относительного и абсолютного количества основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) с использованием следующих антител (eBioscience): anti-Rat CD3 (маркер Т-лимфоцитов); anti-Rat CD4 (маркер Т-хелперов); anti-Rat CD8a (маркер цитотоксических Т-клеток); anti-Rat CD45R (маркер В-лимфоцитов); anti-Rat CD314 (маркер нату-

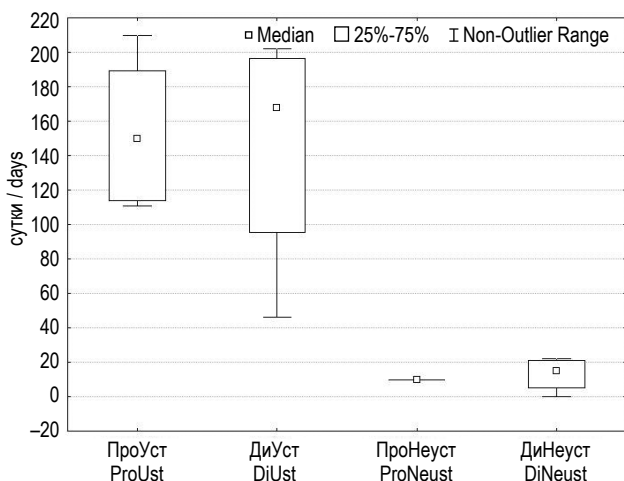


Рисунок 1. Время жизни в барокамере «на высоте» 11 500 м самок крыс Вистар в фазу проэструса (Про) и диэструса (Ди)

Примечание. ПроУст – устойчивые к гипоксии, оценка времени жизни проводилась в фазу проэструса; ДиУст – устойчивые к гипоксии, оценка времени жизни проводилась в фазу диэструса; ПроНеуст – неустойчивые к гипоксии, оценка времени жизни проводилась в фазу проэструса; ДиНеуст – неустойчивые к гипоксии, оценка времени жизни проводилась в фазу диэструса.

Figure 1. Life time in a pressure chamber “at an altitude” of 11 500 m of female Wistar rats in the phase of proestrus (Pro) and dioestrus (Di)

Note. ProUst, resistant to hypoxia, life time evaluation was carried out in the phase of proestrus; DiUst, resistant to hypoxia, life time evaluation was carried out in the dioestrus phase; ProNeust, unstable to hypoxia, the evaluation of the lifetime was carried out in the phase of proestrus; DiNeust, unstable to hypoxia, an estimate of the lifetime was carried out in the dioestrus phase.

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ КОРТИКОСТЕРОНА, ТЕСТОСТЕРОНА И TGF- β В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У САМОК КРЫС ВИСТАР С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ ДО И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛПС

TABLE 1. CONCENTRATION OF CORTICOSTERONE, TESTOSTERONE AND TGF- β IN THE SERUM OF FEMALE WISTAR RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA BEFORE AND AFTER LPS INJECTION

Показатели Indicators	Высокоустойчивые High-resistant		Низкоустойчивые Low-resistant		P
	Контрольная ¹ Control group ¹	ЛПС ² LPS ²	Контрольная ³ Control group ³	ЛПС ⁴ LPS ⁴	
Кортикостерон, нг/мл Corticosterone, ng/ml	70,7 (64,8-73,0)	86,9 (75,6-105,4)	68,6 (60,8-74,5)	100,3 (93,9-129,7)	0,03 ¹⁻² 0,009 ³⁻⁴
Тестостерон, нг/мл Testosterone, ng/ml	0,89 (0,6-1,0)	1,28 (1,2-1,3)	0,88 (0,6-1,1)	1,6 (1,2-2,6)	0,049 ³⁻⁴
TGF- β , нг/мл TGF- β , ng/ml	29,9 (27,6-43,0)	59,9 (26,4-77,6)	75,0 (74,7-85,5)	68,2 (25,7-73,3)	0,03 ¹⁻³

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ОТНОСИТЕЛЬНОЕ ЧИСЛО АПОПТОТИЧЕСКИ ГИБНУЩИХ ТИМОЦИТОВ У САМОК КРЫС ВИСТАР С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ ДО И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛПС

TABLE 2. CONTENT OF MAIN SUBPOPULATIONS OF LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD AND THE RELATIVE NUMBER OF APOPTOTICALLY DYING THYMOCYTES IN FEMALE WISTAR RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA BEFORE AND AFTER LPS INJECTION

Абс. число, млн/мл Abs. number, 10 ⁶ /ml	Высокоустойчивые High-resistant		Низкоустойчивые Low-resistant		P
	Контрольная ¹ Control group ¹	ЛПС ² LPS ²	Контрольная ¹ Control group ¹	ЛПС ² LPS ²	
CD3 ⁺ T-ЛФ CD3 ⁺ T cells	4,3 (3,4-6,1)	2,6 (1,4-3,2)	6,3 (3,8-7,4)	4,7 (4,3-7,1)	0,03 ¹⁻² 0,03 ²⁻⁴
CD3 ⁺ CD4 ⁺ Tх-ЛФ CD3 ⁺ CD4 ⁺ Th cells	1,8 (1,6-2,5)	1,5 (0,8-1,6)	1,8 (1,7-2,8)	2,6 (2,4-2,6)	0,04 ²⁻⁴
CD3 ⁺ CD8 ⁺ Тц-ЛФ CD3 ⁺ CD8 ⁺ Tc cells	2,1 (1,5-2,5)	1,0 (0,5-1,5)	3,5 (2,1-5,6)	2,0 (1,8-2,9)	0,03 ¹⁻²
CD314 ⁺ NK	0,31 (0,25-0,31)	1,8 (0,9-2,5)	0,89 (0,85-0,94)	2,7 (2,03-3,97)	0,03 ¹⁻² 0,009 ³⁻⁴ 0,01 ¹⁻³
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg-ЛФ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg	0,006 (0,005-0,01)	0,003 (0,002-0,004)	0,006 (0,002-0,008)	0,01 (0,009-0,03)	0,03 ¹⁻² 0,03 ³⁻⁴ 0,01 ²⁻⁴
Апоптоз тимоцитов, % Apoptosis of thymocytes, %	1,3 (1,1-1,3)	2,9 (2,5-3,5)	1,4 (0,4-1,4)	6,0 (4,8-6,5)	0,02 ¹⁻² 0,01 ³⁻⁴ 0,01 ²⁻⁴

Примечание. Т-ЛФ – Т-лимфоциты; Тх-ЛФ – Т-лимфоциты хелперы; Тц-ЛФ – цитотоксические Т-лимфоциты; NK – натуральные киллеры; Treg-ЛФ – регуляторные Т-лимфоциты.

Note. T cells, T lymphocytes; Th cells, T helpers; Tc cells, cytotoxic T lymphocytes; NK, natural killers; Treg, regulatory T lymphocytes.

ральных киллеров – NK); anti-Rat CD25 (маркер активированных Т-клеток); anti-Mouse/Rat FoxP3 (маркер регуляторных Т-клеток). Лизис эритроцитов в образцах цельной крови с ЭДТА проводили с помощью раствора OptiLyse C Lysis Solution (Beckman Coulter).

Оценивали число апоптотически гибнущих клеток тимуса (Annexin⁺PI) с помощью набора Annexin V FITC Kit (Beckman Coulter, США) на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США).

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Statistica 8.0.

Характер распределения показателей определяли по критерию Колмогорова—Смирнова. Данные выражали в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$. Для установления достоверности различий между показателями, в зависимости от характера распределения полученных данных, использовали критерии множественного сравнения Краскела—Уоллиса, Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При тестировании самок крыс Вистар в вентилируемой барокамере популяция животных разделилась на высоко- (время жизни — 185,5 с (180-220)) и низкоустойчивых (время жизни — 20 с (10-20)); $p = 0,006$ к гипоксии. По сравнению с высокоустойчивыми низкоустойчивые к гипоксии самки характеризовались более высоким содержанием противовоспалительного цитокина TGF- β в сыворотке, абсолютным числом NK-клеток в периферической крови и низкой объемной долей коркового вещества тимуса (табл. 1, 2; рис. 2).

Через сутки после введения ЛПС у низкоустойчивых к гипоксии самок выраженность воспалительной реакции в легких и патологических изменений в печени была выше: в легких обнаруживалась более выраженная инфильтрация межальвеолярных перегородок нейтрофилами

(рис. 3), а площадь некрозов в печени была статистически значимо выше (рис. 4).

Через сутки после введения ЛПС в сыворотке крови как у высоко-, так и у низкоустойчивых к гипоксии самок увеличилось содержание противовоспалительных гормонов — кортикостерона и тестостерона, тогда как концентрация TGF- β не изменилась (табл. 1).

В тимусе высоко- и низкоустойчивых к гипоксии самок с системным воспалительным ответом наблюдалась умеренно выраженная инволюция с сужением коркового вещества и картиной «звездного неба», представленной гибнущими тимоцитами, фрагментами погибших клеток и фагоцитирующих их макрофагами. При морфометрическом исследовании было показано, что у высокоустойчивых к гипоксии самок введение ЛПС приводило к статистически значимому снижению показателя объемной доли коркового вещества тимуса, тогда как у низкоустойчивых самок этот показатель не изменялся (рис. 2). Однако по данным проточной цитофлуориметрии через сутки после введения ЛПС содержание апоптотически гибнущих Annexin⁺ клеток, выделенных из тимуса, было выше у самок с низкой устойчивостью к гипоксии (табл. 2).

В периферической крови у высокоустойчивых к гипоксии самок введение ЛПС приводило к снижению абсолютного количества

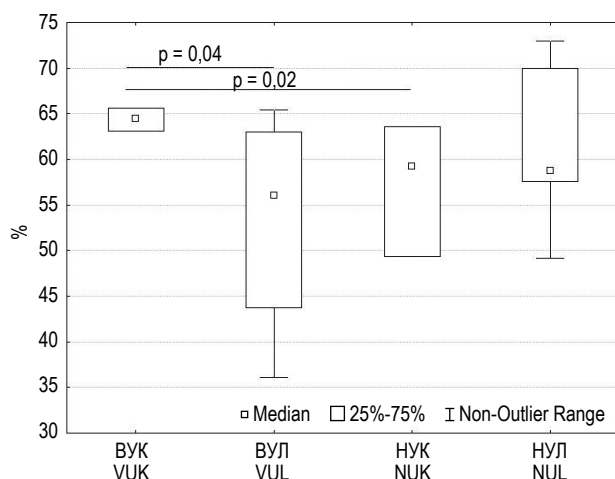


Рисунок 2. Объемная доля коркового вещества тимуса самок крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии контрольной группы и через сутки после введения ЛПС. Примечание. ВУК — высокоустойчивые, контрольная группа; ВУЛ — высокоустойчивые, ЛПС; НУК — низкоустойчивые, контрольная группа; НУЛ — низкоустойчивые, ЛПС.

Figure 2. Volume fraction of the thymic cortex of female Wistar rats with different resistance to hypoxia of the control group and in a day after the LPS injection

Note. VUK, high-resistant, control group; VUL, high-resistant, LPS; NUK, low-resistant, control group; NUL, low-resistant, LPS.

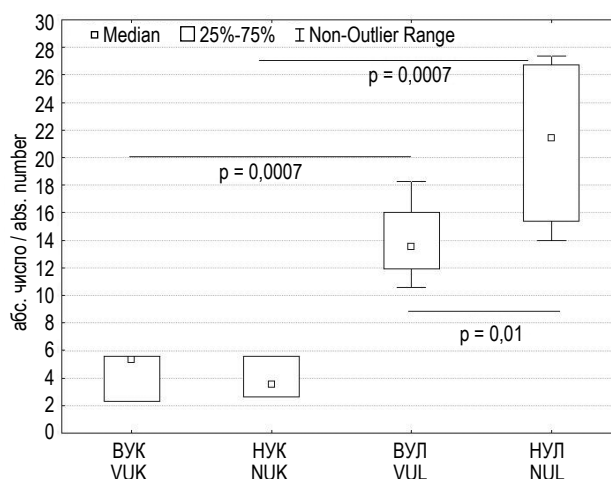


Рисунок 3. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у высоко- (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии самок крыс Вистар контрольной группы (ВУК, НУК) и на 1-е сут. после введения ЛПС (ВУЛ, НУЛ)

Figure 3. The number of neutrophils in the interalveolar septa of the lungs in high (VU) and low-resistant (NU) to hypoxia female Wistar rats of the control group (VUK, NUK) and on the 1st day after the LPS injection (VUL, NUL)

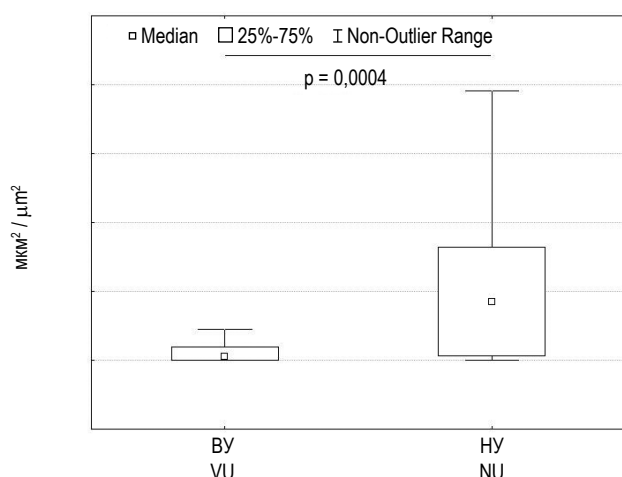


Рисунок 4. Площадь некрозов ($\mu\text{м}^2$) в печени у высоко- (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии самок крыс Вистар на 1-е сут. после введения ЛПС

Figure 4. The area of necrosis (μm^2) in the liver in high (VU) and low-resistant (NU) to the hypoxia female Wistar rats on the 1st day after the LPS injection

Т-лимфоцитов, в том числе Т-хелперов и регуляторных, на фоне повышения NK-клеток. Напротив, у низкоустойчивых к гипоксии самок развитие системного воспалительного ответа характеризовалось повышением в крови содержания Т-хелперов и регуляторных Т-лимфоцитов, что также сопровождалось увеличением числа NK-клеток (табл. 2).

Таким образом, индуцированный ЛПС системный воспалительный ответ у высоко- и низкоустойчивых к гипоксии самок характеризуется иммунными изменениями разной выраженности и направленности. Как у высоко-, так и у низкоустойчивых к гипоксии самок развитие системного воспалительного ответа сопровождается умеренно выраженной акцидентальной инволюцией тимуса, апоптозом тимоцитов, увеличением абсолютного числа клеток врожденного иммунитета — NK, повышением содержания иммуносупрессорных стероидных гормонов — тестостерона и кортикостерона. Однако у высокоустойчивых самок акцидентальная инволюция тимуса менее выражена, о чем свидетельствует показатель апоптотической гибели тимоцитов. В периферической крови у них наблюдается снижение количества Т-хелперов и регуляторных Т-лимфоцитов, что сочетается с менее выраженными воспалительными и патологическими изменениями в органах-мишенях, тогда как у низкоустойчивых к гипоксии самок развитие более выраженного системного воспаления сопровождается увеличением числа регуляторных Т-лимфоцитов и Т-хелперов.

Обсуждение

Таким образом, в физиологических условиях по сравнению с высокоустойчивыми низкоустойчивые к гипоксии самки крыс Вистар характеризуются более высоким содержанием TGF- β в сыворотке крови, числом NK-клеток и узким корковым веществом тимуса.

TGF- β — семейство белков, которые регулируют различные биологические процессы, такие как рост и развитие, тканевой гомеостаз и реакции иммунной системы, в том числе пролиферацию, дифференцировку, функционирование всех субпопуляций лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток, таким образом, модулируя врожденный, антиген-независимый, и адаптивный, антиген-зависимый иммунитет [16, 26]. Известно, что в условиях гипоксии TGF- β индуцирует связывание HIF-1 α с промотором гена *FoxP3* CD4⁺ Т-лимфоцитов, в результате чего активируется дифференцировка Т-регуляторных клеток [10]. По нашим данным, в крови самок с разной устойчивостью к гипоксии различий в содержании Т-лимфоцитов, в том числе Т-регуляторных клеток, выявлено не было, однако высокое содержание TGF- β в сыворотке крови у низкоустойчивых к гипоксии самок, по-видимому, связано с большей функциональной активностью Т-регуляторных клеток, чем у высокоустойчивых к гипоксии крыс.

NK-клетки модулируют врожденный иммунитет путем активации апоптоза в инфицированных или трансформированных клетках, а их функционирование и дифференцировка положительно коррелируют с уровнем экспрессии HIF-1 α [15]. Другими исследованиями выявлено негативное влияние гипоксии на количество и цитолитическую активность NK-клеток [20]. Данные о различиях в содержании NK-клеток в крови у самок крыс с разной устойчивостью к гипоксии в литературе не представлены.

По нашим данным, корковое вещество тимуса, которое представлено дубль-позитивными Т-лимфоцитами, уже у самок с низкой устойчивостью к гипоксии, чем с высокой. В литературе показано, что у детей с врожденным пороком сердца, у которых насыщение кислородом было ниже 85% (условия гипоксии), в тимусе преобладает мозговое вещество, тогда как у детей с насыщением кислорода более 95%, напротив, корковое вещество было шире [9]. Выявленные морфофункциональные особенности тимуса у животных с разной устойчивостью к гипоксии, очевидно, зависят от многих факторов, определяющих процессы пролиферации, дифференцировки и миграции тимоцитов.

Полученные данные свидетельствуют о непосредственной взаимосвязи устойчивости

к гипоксии и особенностей иммунных реакций в норме, что при развитии инфекционно-воспалительных заболеваний у лиц с разной устойчивостью к гипоксии может определять течение и исход заболевания. Поэтому мы исследовали иммунные реакции при системном воспалительном ответе, индуцированном ЛПС, у самок крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии.

Нами показано, что как у высоко-, так и у низкоустойчивых к гипоксии самок развитие системного воспалительного ответа сопровождается умеренно выраженной акцидентальной инволюцией тимуса, апоптозом тимоцитов, увеличением абсолютного числа клеток врожденного иммунитета — НК, повышением содержания иммуносупрессорных стероидных гормонов — тестостерона и кортикостерона.

Развитие более тяжелого системного воспалительного ответа у низкоустойчивых к гипоксии самок характеризуется более выраженным апоптозом тимоцитов. По данным А.В. Сеуган и соавт. [9], в условиях гипоксии в корковом веществе тимуса увеличивается число Bcl2-положительных клеток, что свидетельствует об индуцированной гипоксией клеточной гибели. В нашей работе показано, что в ответ на введение ЛПС в тимусе у низкоустойчивых крыс не происходит изменения объемной доли коркового вещества, однако выраженность апоптотической гибели тимоцитов выше, чем у самок с высокой устойчивостью к гипоксии. Вероятно, это связано с компенсаторной активацией пролиферации тимоцитов у низкоустойчивых к гипоксии самок, тогда как у высокоустойчивых крыс сужение коркового вещества тимуса может быть опосредовано активацией процессов дифференцировки и миграции Т-лимфоцитов.

На 1-е сутки развития системного воспалительного ответа по сравнению с низкоустойчивыми к гипоксии самками в периферической крови у высокоустойчивых животных наблюдается снижение количества Т-хелперов и регуляторных Т-лимфоцитов. Т-лимфоциты из крови мигрируют в очаг воспаления, где, взаимодействуя с эпителиальными, дендритными клетками, регу-

лируют развитие воспалительных реакций. Функционирование Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов супрессируется Т-регуляторными лимфоцитами, при недостаточности которых воспалительные реакции могут быть чрезмерно выраженными [19]. Тогда как у низкоустойчивых к гипоксии самок развитие системного воспалительного ответа сопровождается увеличением в периферической крови Т-хелперов и регуляторных Т-лимфоцитов. По данным литературы, у больных сепсисом наблюдается увеличение регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови, что, по мнению авторов, является неблагоприятным прогностическим критерием [22, 23, 25]. Показано, что HIF-1 α , уровень экспрессии которого увеличивается у низкоустойчивых к гипоксии самцов в ранние сроки после введения ЛПС, активирует дифференцировку регуляторных Т-клеток [15].

Таким образом, иммунные реакции при системном воспалительном ответе, индуцированном ЛПС, у самок крыс Вистар зависят от устойчивости их к гипоксии. Нами впервые показано, что развитие более тяжелого воспалительного ответа у низкоустойчивых к гипоксии самок сопровождается выраженной апоптотической гибелью тимоцитов и увеличением числа Т-хелперов и регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови, что является неблагоприятным прогностическим фактором. Тогда как у высокоустойчивых к гипоксии самок акцидентальная инволюция тимуса характеризуется менее выраженной гибелью лимфоцитов и сужением коркового вещества за счет активации миграции Т-лимфоцитов в очаг воспаления, о чем свидетельствует снижение абсолютного количества Т-хелперов и регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови. Требуется дальнейшее исследование механизмов развития иммунного ответа у высоко- и низкоустойчивых самок при системном воспалительном ответе, однако полученные данные являются базовыми для разработки подходов к персонализированной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний у лиц женского пола.

Список литературы / References

1. Аврущенко М.Ш., Острова И.В., Гречко А.В. Гендерные особенности постреанимационных изменений экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF) // Общая реаниматология, 2017. Т. 13, № 5. С. 44-57. [Avrushchenko M.S., Ostrova I.V., Grechko A.V. Gender peculiarities of postresuscitation in the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2017, Vol. 13, no. 5, pp. 44-57. (In Russ.)]
2. Гао Ю., Постовалова Е.А., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Половые различия морфологических изменений и иммунных нарушений при экспериментальном остром язвенном колите // Клиническая и экспериментальная морфология, 2016. Т. 17, № 1. С. 37-43. [Gao Yu., Postovalova E.A., Dobrynina M.T., Makarova O.V. Sex-related differences in morphological changes and immune disorders during experimental acute

ulcerative colitis. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya = Clinical and Experimental Morphology*, 2016, Vol. 17, no. 1, pp. 37-43. (In Russ.)]

3. Джалилова Д.Ш., Диатроптов М.Е., Цветков И.С., Макарова О.В., Кузнецов С.Л. Экспрессия генов *hif-1a*, *nf-kb* и *vegf* в печени и содержание HIF-1 α , эритропоэтина, VEGF, TGF- β , 8-изопростана и кортикостерона в сыворотке крови высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2018. Т. 165, № 6. С. 742-747. [Dzhalilova D.Sh., Diatroptov M.E., Tsvetkov I.S., Makarova O.V., Kuznetsov S.L. Expression of *hif-1a*, *nf-kb* and *vegf* genes in the liver and the content of HIF-1 α , erythropoietin, VEGF, TGF- β , 8-isoprostane and corticosterone in the blood serum in tolerant and susceptible to hypoxia Wistar rats. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2018, Vol. 165, no. 6, pp. 742-747. (In Russ.)]

4. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности динамики содержания HIF-1 α в неокортексе крыс при различных режимах гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2012. Т. 154, № 12. С. 681-686. [Kirova Yu.I., Germanova E.L., Lukyanova L.D. Phenotypic features of the dynamics of HIF-1 α levels in rat neocortex in different hypoxia regimens. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2012, Vol. 154, no. 12, pp. 681-686. (In Russ.)]

5. Косырева А.М., Симонова Е.Ю., Макарова О.В. Половые различия реакции иммунной системы и легких при экспериментальном остром эндотоксикозе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2012. Т. 153, № 3. С. 318-321. [Kosyreva A.M., Simonova E.Yu., Makarova O.V. Gender differences in pulmonary and immune response in acute experimental endotoxemia. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2012, Vol. 153, no. 3, pp. 318-321. (In Russ.)]

6. Косырева А.М., Диатроптов М.Е. Морфологические проявления системного воспалительного ответа в печени и легких крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла // Иммунология, 2013. Т. 34, № 2. С. 111-114. [Kosyreva A.M., Diatroptov M.E. Morphological development of systemic inflammatory response syndrome in the liver and lung of Wistar rats in the different stages of estrous cycle. *Immunologiya = Immunology*, 2013, Vol. 34, no. 2, pp. 111-114. (In Russ.)]

7. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И. (2011) Влияние гипоксического preconditionирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2011. Т. 151, № 3. С. 263-268. [Lukyanova L.D., Kirova Yu.I. Effect of hypoxic preconditioning on free radical processes in tissues of rats with different resistance to hypoxia. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2011, Vol. 151, no. 3, pp. 263-268. (In Russ.)]

8. Писарев В.Б., Богомолова Н.В., Новочадов В.В. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога. Волгоград, 2008. 308 с. [Pisarev V.B., Bogomolova N.V., Novochadov V.V. Bacterial endotoxemia: pathologist's view. Volgograd, 2008. 308 p.]

9. Ceyran A.B., Şenol S., Güzelmeriç F., Tunçer E., Tongut A., Özbek B., Şavluk O., Aydın A., Ceyran H. Effects of hypoxia and its relationship with apoptosis, stem cells, and angiogenesis on the thymus of children with congenital heart defects: a morphological and immunohistochemical study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, Vol. 8, no. 7, pp. 8038-8047.

10. Clambey E.T., McNamee E.N., Westrich J.A., Glover L.E., Campbell E.L., Jedlicka P., de Zoeten E.F., Cambier J.C., Stenmark K.R., Colgan S.P., Eltzschig H.K. Hypoxia-inducible factor-1-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, pp. E2784-E2793.

11. Cinel I., Opal S.M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit. Care Med.*, 2009, Vol. 37, no. 1, pp. 291-304.

12. Cummins E.P., Berra E., Comerford K.M., Ginouves A., Fitzgerald K.T., Seeballuck F., Godson C., Nielsen J.E., Moynagh P., Pouyssegur J., Taylor C.T. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 48, pp. 18154-18159.

13. Jain K., Suryakumar G., Prasad R., Ganju L. Upregulation of cytoprotective defense mechanisms and hypoxia-responsive proteins imparts tolerance to acute hypobaric hypoxia. *High Alt. Med. Biol.*, 2013, Vol. 14, no. 1, pp. 65-77.

14. Kiers H.D., Scheffer G.J., van der Hoeven J.G., Eltzschig H.K., Pickkers P., Kox M. Immunologic consequences of hypoxia during critical illness. *Anesthesiology*, 2016, Vol. 125, no. 1, pp. 237-249.

15. Krzywinska E., Stockmann C. Hypoxia, Metabolism and immune cell function. *Biomedicine*, 2018, Vol. 6, no. 2, p. 56.

16. Kubickova L., Sedlarikova L., Hajek R., Sevcikova S. TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J. Transl. Med.*, 2012, Vol. 10, p. 183.

17. Oliver K.M., Taylor C.T., Cummins E.P. Hypoxia. Regulation of NF κ B signalling during inflammation: the role of hydroxylases. *Arthritis Res. Ther.*, 2009, Vol. 11, no. 1, p. 215.

18. Peyssonnaud C., Cejudo-Martin P., Doedens A., Zinkernagel A.S., Johnson R.S., Nizet V. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1 α in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 12, pp. 7516-7519.

19. Rubtsov Y.P., Rasmussen J.P., Chi E.Y., Fontenot J., Castelli L., Ye X., Treuting P., Siewe L., Roers A., Henderson W.R., Muller W., Rudensky A.Y. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, 2008, Vol. 28, no. 4, pp. 546-558.
20. Sceneay J., Chow M.T., Chen A., Halse H.M., Wong C.S.F., Andrews D.M., Sloan E.K., Parker B.S., Bowtell D.D., Smyth M.J., Möller A. Primary tumor hypoxia recruits CD11b⁺/Ly6C^{med}/Ly6G⁺ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Res.*, 2012, Vol. 72, no. 16, pp. 3906-3911.
21. Shalova I.N., Lim J.Y., Chittethath M., Zinkernagel A.S., Beasley F., Hernández-Jiménez E., Toledano V., Cubillos-Zapata C., Rapisarda A., Chen J., Duan K., Yang H., Poidinger M., Melillo G., Nizet V., Arnalich F., López-Collazo E., Biswas S.K. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Immunity*, 2015, Vol. 42, no. 3, pp. 484-498.
22. Tatura R., Zeschnigk M., Adamzik M., Probst-Kepper M., Buer J., Kehrmann J. Quantification of regulatory T cells in septic patients by real-time PCR-based methylation assay and flow cytometry. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, e49962. doi: 10.1371/journal.pone.0049962.
23. Tatura R., Zeschnigk M., Hansen W., Steinmann J., Vidigal P.G., Hutzler M., Pastille E., Westendorf A.M., Buer J., Kehrmann J. Relevance of Foxp3⁺ regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. *Immunology*, 2015, Vol. 146, no. 1, pp. 144-156.
24. Vázquez-Martínez E.R., García-Gómez E., Camacho-Arroyo I., González-Pedrajo B. Sexual dimorphism in bacterial infections. *Biol. Sex Differ.*, 2018, Vol. 9, no. 1, p. 27.
25. Venet F., Chung C.S., Kherouf H., Geeraert A., Malcus C., Poitevin F., Bohe J., Lepape A., Avala A., Monneret G. Increased circulating regulatory T cells (CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.*, 2009, Vol. 35, no. 4, pp. 678-686.
26. Yang L., Pang Y., Moses H.L. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.*, 2010, Vol. 31, pp. 220-227.

Авторы:

Косырева А.М. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Джалилова Д.Ш. — младший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Макарова О.В. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Сладкопеев А.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории патологии клетки ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Authors:

Kosyreva A.M., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Dzhalilova D.Sh., Junior Research Associate, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Makarova O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Sladkopevtsev A.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Поступила 14.09.2018
Отправлена на доработку 19.09.2018
Принята к печати 19.09.2018

Received 14.09.2018
Revision received 19.09.2018
Accepted 19.09.2018

СИГНАЛИНГ ЧЕРЕЗ РЕЦЕПТОР К ФАКТОРУ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ 1-ГО ТИПА КАК НОВЫЙ МЕХАНИЗМ ПОДАВЛЕНИЯ Т-КЛЕТОК ПРИ ОПУХОЛЕВОМ НЕОАНГИОГЕНЕЗЕ

**Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Баторов Е.В.,
Останин А.А.**

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

Резюме. Выявление иммуномодулирующей активности факторов роста эндотелия сосудов (VEGFs) раскрывает новую роль неоангиогенеза в опухолевой прогрессии. Большинство эффектов VEGF на Т-клетки опосредуется через рецепторы VEGF-R2. Фактор роста плаценты (PlGF) принадлежит к семейству VEGFs и является селективным лигандом VEGF-R1. С целью изучения роли VEGF-R1-сигналинга в регуляции Т-клеточных функций исследовали влияние PlGF на пролиферацию Т-клеток доноров. Показано, что PlGF в широком диапазоне доз ингибирует пролиферацию Т-лимфоцитов в культурах анти-CD3-стимулированных моноклеарных клеток, подавляя пролиферативный ответ как CD4⁺, так и CD8⁺Т-клеток. При этом супрессорный эффект PlGF обусловлен прямым взаимодействием фактора с VEGFR-1 на Т-клетках, что подтверждается экспрессией VEGFR-1 Т-лимфоцитами (особенно после их активации) и блокированием супрессорного эффекта PlGF нейтрализующими анти-VEGFR-1-антителами. Учитывая повышенный уровень PlGF при многих опухолях, данный фактор может играть важную роль в иммуномодуляции при опухолевом росте, опосредуя свой эффект через VEGFR-1 сигнальный путь.

Ключевые слова: VEGF, VEGF-R1, PlGF, Т-клетки, иммуносупрессия

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-1 SIGNALING AS A NOVEL MECHANISM OF T CELL SUPPRESSION IN TUMOR NEOANGIOGENESIS

**Chernykh E.R., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Batorov E.V.,
Ostanin A.A.**

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

Abstract. The immunomodulatory activity of vascular endothelial growth factors (VEGFs) reveals a new role of neoangiogenesis in tumor development. Most of VEGF effects on T cells are mediated through the

Адрес для переписки:

Черных Елена Рэмовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 236-03-29.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Chernykh Elena R.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 236-03-29.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Р. Черных, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова,
Е.В. Баторов, А.А. Останин «Сигналинг через
рецептор к фактору роста эндотелия сосудов 1-го
типа как новый механизм подавления Т-клеток
при опухолевом неоангиогенезе» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 653-660.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-653-660

© Черных Е.Р. и соавт., 2019

For citation:

E.R. Chernykh, O.Yu. Leplina, M.A. Tikhonova, E.V. Batorov,
A.A. Ostanin "Vascular endothelial growth factor receptor-1
signaling as a novel mechanism of T cell suppression in
tumor neoangiogenesis", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4,
pp. 653-660. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-653-660

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-653-660

VEGF-R2 receptors. Placental growth factor (PlGF) belongs to the VEGFs family and is a selective ligand for VEGF-R1. In order to study the role of VEGF-R1-signaling in the regulation of T cell functions, the effect of PlGF on the proliferation of donor T cell has been investigated. PlGF has been shown to inhibit the proliferation of T lymphocytes in cultures of anti-CD3-stimulated mononuclear cells in a wide dose range, suppressing the proliferative response of both CD4⁺ and CD8⁺T cells. The suppressive effect of PlGF was mediated through the direct interaction with VEGFR-1 on T cells that was evidenced by the expression of VEGFR-1 by T lymphocytes (especially after their activation) and by blocking the suppressive effect of PlGF with neutralizing anti-VEGFR-1 antibodies. Given the increased levels of PlGF in many tumors, this factor may play an important role in immunomodulation during tumor growth, mediating its effect through the VEGFR-1 signaling pathway.

Keywords: VEGF, VEGF-R1, PlGF, T cells, immunosuppression

Введение

Неоангиогенез является неотъемлемым условием роста опухоли, ее инвазии и метастазирования и опосредуется с участием проангиогенных факторов, среди которых ключевая роль отводится семейству факторов роста эндотелия сосудов (VEGFs) [2, 7]. Взаимодействие VEGFs со своими рецепторами (VEGFR) активирует пролиферацию, миграцию и дифференцировку эндотелиальных клеток, а также рекрутирование костномозговых эндотелиальных предшественников в зоны васкулогенеза, способствуя образованию новых сосудов. Для многих типов опухолей, экспрессирующих VEGF и VEGFR, VEGF/VEGFR сигнальный путь выступает в качестве аутокринного механизма поддержания роста опухолевых клеток [9, 12]. Апробация антиангиогенных препаратов в качестве таргетной терапии показала, что их противоопухолевый эффект во многом обусловлен уменьшением иммуносупрессии [14, 19, 23], свидетельствуя, таким образом, об иммуномодулирующей активности VEGFs.

Семейство VEGFs включает несколько факторов — VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и фактор роста плаценты (PlGF). Центральная роль среди этих факторов отводится VEGF-A, который в литературе обозначается как VEGF. Иммуномодулирующие эффекты VEGFs реализуются через связывание с двумя рецепторами — VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (Flk-1, KDR) на гемопоэтических предшественниках и иммунных клетках [23]. Показано, что VEGF способен подавлять созревание дендритных клеток, индуцировать накопление миелоидных супрессорных клеток и регуляторных Т-клеток, вызывать атрофию тимуса, а также оказывать прямые эффекты на Т-клетки [21]. Ингибирующий эффект VEGF-A на Т-лимфоциты опосредуется через VEGFR-2 сигнальный путь [6, 22], тогда как роль VEGFR-1-сигналинга в модуляции функциональной активности Т-клеток остается неясной.

Между тем, лигандом для VEGFR-1, который взаимодействует только с этим рецептором, является PlGF, также принадлежащий к семейству VEGFs. Поэтому исследование влияния PlGF на функции Т-клеток представляет собой уникальную возможность изучения роли VEGFR-1-сигналинга в регуляции Т-лимфоцитов.

PlGF продуцируется опухолевыми и стромальными клетками большинства солидных опухолей и его уровень прямо коррелирует с опухолевой стадией, метастатической инвазией и обратно — с выживаемостью больных [3, 4]. PlGF аналогично VEGF способен усиливать опухолевый рост за счет стимуляции неоангиогенеза и пролиферации опухолевых клеток. Однако PlGF/VEGFR-1-опосредованные иммуномодулирующие эффекты остаются менее изученными и в основном касаются влияния PlGF на клетки миелоидного ряда — моноциты, дендритные клетки (ДК), макрофаги [5, 11]. В то же время эффекты PlGF в отношении функции Т-клеток практически не исследованы.

Исходя из этого, с целью изучения роли VEGF-R1-сигналинга в регуляции Т-клеточных функций в настоящей работе исследовали влияние PlGF на пролиферацию Т-лимфоцитов.

Материалы и методы

В исследование были включены 42 здоровых донора крови. Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли центрифугированием цельной, гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина ($\rho = 1,078$). МНК культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований при температуре 37 °C и 5% CO₂. Полная культуральная среда состояла из среды RPMI-1640, дополненной 10% инактивированной сыворотки доноров АВ (IV) группы, 2 мМ HEPES-буфера, 0,3 мг/мл глутамина (все реакти-

вы фирмы Sigma) и гентамицином (100 мкг/мл). Количество МНК, вносимых в лунку, составляло $0,1 \times 10^6$ клеток в 0,15 мл культуральной среды. Для стимуляции клеток использовали растворимые моноклональные анти-CD3-антитела (IC0-90, ТОО «Медбиоспектр», Москва) в концентрации 1 мкг/мл. PlGF использовали в диапазоне доз от 0,01 до 100 нг/мл (R&D System). Интенсивность пролиферации оценивали на 5 сутки по включению в нуклеопротейидные фракции ^3H -тимидина, вносимого за 18 часов до окончания культивирования в дозе 1 мкг/мл. Подсчет радиоактивности производили с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика SL-30 (Intertech, Франция). Результаты (имп/мин) представляли в виде среднего значения триплета (трех идентичных культур).

Пролиферацию CD4- и CD8-субпопуляций Т-лимфоцитов оценивали цитофлуориметрически по разведению флуоресцентной метки CFSE [5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl Ester]. Для этого МНК перед культивированием метили флуорохромом (витальным красителем) CFSE (Molecular probes, США) в конечной концентрации 2 мкМ в RPMI-1640 в течение 15 минут, затем 3-кратно отмывали в RPMI с 10% FCS (БиолоТ, Санкт-Петербург). МНК, меченные CFSE, культивировали в концентрации 1×10^6 /мл в 96-луночных планшетах в отсутствие или присутствии анти-CD3 (1 мкг/мл) в течение 5 суток и по завершении культивирования клетки окрашивали PE-мечеными анти-CD3, APC-мечеными анти-CD4 и PerCP-мечеными анти-CD8 моноклональными антителами (BD, США). Анализ количества делений проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) в гейтах CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, определяя процент клеток, содержащих, как минимум, в 2 раза меньше флуорохрома, чем исходно меченые клетки. Результат выражали в виде процентного содержания делящихся клеток к общему количеству клеток в исследуемой области.

Экспрессию VEGFR-1 на Т-лимфоцитах оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием FITC-(CD8), PE-(CD4) и APC-(VEGFR-1) меченых моноклональных антител (BD, США).

В отдельной серии экспериментов исследовали влияние нейтрализующих анти-VEGFR-1-антител (анти-VEGFR-1) на супрессорный эффект PlGF. Для этого в культуры МНК, стимулированные анти-CD3, добавляли PlGF (5 нг/мл) и культивировали в отсутствие и присутствии нейтрализующих анти-VEGFR-1-антител (VEGF R1/Fit-1-антитела; 2,5 мкг/мл; R&D System),

вносимых совместно с PlGF либо через 24 ч после начала культивирования.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0 для Windows. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический W-критерий Вилкоксона (для связанных выборок) и U-критерий Манна-Уитни (для несвязанных выборок). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Влияние PlGF на пролиферацию Т-клеток исследовали в культурах МНК, стимулированных через Т-клеточный рецептор анти-CD3-антителами. По сравнению с контрольными анти-CD3-стимулированными культурами PlGF в дозе 10 пг/мл достоверно подавлял пролиферацию МНК с наибольшим супрессорным эффектом в диапазоне доз от 1 до 5 нг/мл (рис. 1А). При анализе PlGF в дозе 5 нг/мл ($n = 22$) супрессорный эффект варьировал от 25 до 76%, составляя на уровне медианы 45 % (рис. 1Б).

Чтобы выяснить, какие субпопуляции Т-клеток подвержены ингибирующему действию PlGF, исследовали влияние фактора на пролиферативный ответ CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов в анти-CD3-стимулированных культурах. Для этого МНК метили витальным красителем CFSE и оценивали пролиферацию методом проточной цитофлуориметрии в гейтах CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток в отсутствие и присутствии PlGF. Относительное содержание пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов в интактных культурах МНК не превышало 1%, а при стимуляции анти-CD3-антителами возрастало до 70,6 и 59,9% соответственно. В присутствии PlGF количество пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток достоверно снижалось (рис. 2). Супрессорный эффект PlGF в отношении CD8⁺Т-лимфоцитов составлял в среднем 28% (IQR 8-39%) и был сопоставим с эффектом фактора на пролиферацию CD4⁺Т-клеток (30%; IQR 25-40%; $p_U = 0,3$). Таким образом, обе субпопуляции Т-лимфоцитов характеризовались чувствительностью к супрессорному действию PlGF.

Учитывая, что неперенным условием прямого влияния PlGF на Т-клетки должно быть наличие на Т-лимфоцитах VEGFR-1, исследовали экспрессию данного рецептора. Проведенная серия экспериментов предусматривала оценку CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, экспрессирующих VEGFR-1, среди свежeweделенных МНК, а также среди интактных и анти-CD3-активированных

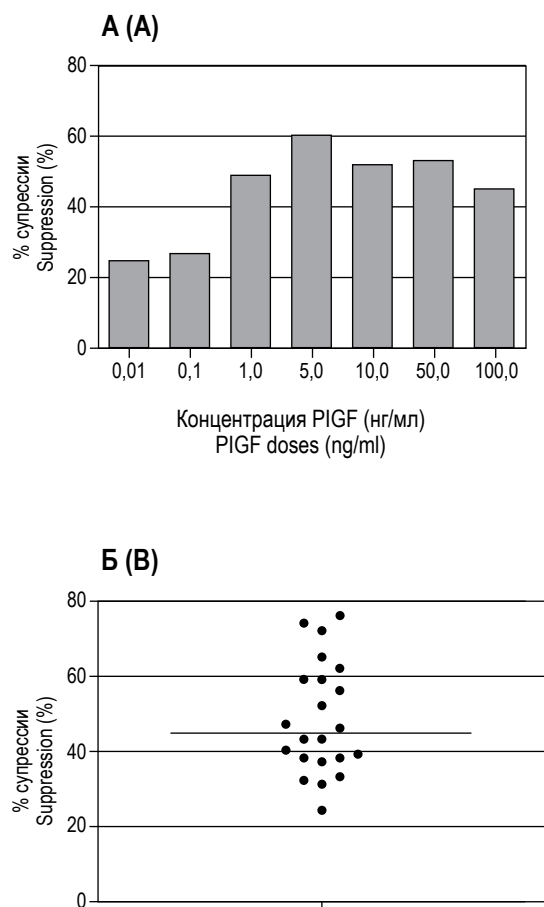


Рисунок 1. Влияние PIGF на пролиферативный ответ анти-CD3-стимулированных МНК

Примечание. А – дозозависимый эффект PIGF; данные представлены в виде медианных значений (n = 6); Б – супрессорный эффект PIGF в дозе 5 нг/мл (n = 22); данные представлены в виде медианы и индивидуальных значений.

Figure 1. The effect of PIGF on the proliferative response of anti-CD3-stimulated MNCs

Note. A, dose-dependent effect of PIGF; data are presented as median values (n = 6); B, suppressive effect of PIGF (5 ng/ml; n = 22); data are presented as median and individual values.

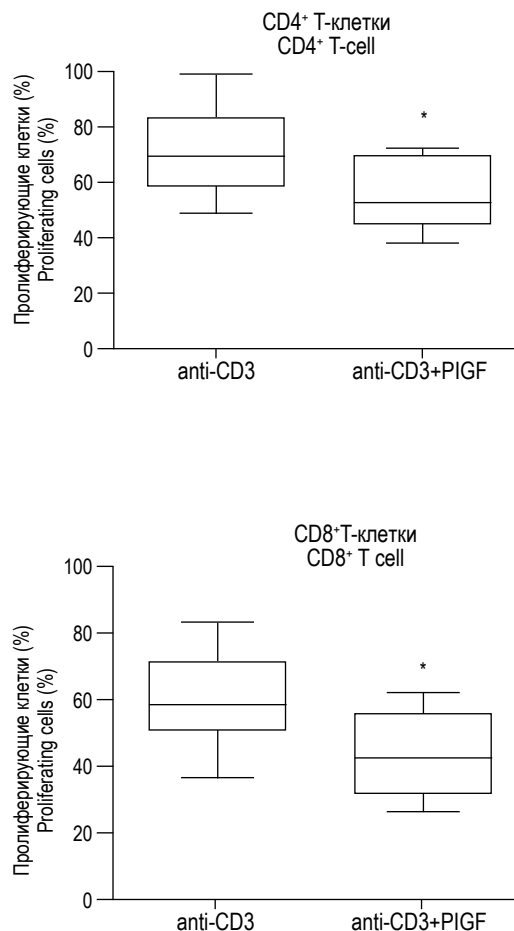


Рисунок 2. Супрессорный эффект PIGF (5 нг/мл) на пролиферативный ответ CD4 и CD8 Т-клеток в культурах анти-CD3-стимулированных МНК

Примечание. Данные представлены в виде медианы, IQR и диапазона минимальных и максимальных значений (n = 6). * – p < 0,05 (W-критерий Вилкоксона).

Figure 2. The suppressive effect of PIGF (5 ng/ml) on the proliferative response of CD4 and CD8 T cells in anti-CD3-stimulated MNC cultures

Note. Data are presented as median, IQR and range of minimum and maximum values (n = 6). *, p < 0.05 (Wilcoxon W-test).

МНК в динамике 3-суточного культивирования. В свежевыделенных МНК относительное содержание CD4⁺VEGFR-1⁺ и CD8⁺VEGFR-1⁺ клеток было низким и составляло 1,29 (0,2-4,4) и 0,51 (0,2-2,2)% соответственно. В нестимулированных культурах МНК относительное количество CD4⁺VEGFR-1⁺ и CD8⁺VEGFR-1⁺ клеток достоверно возрастало (рис. 3), достигая максимума через 48 часов. Так, доля CD4⁺VEGFR-1⁺Т-клеток через 24 ч увеличивалась до 2,7% (IQR 1,0-7,5%;

p_U = 0,017), через 48 ч – до 6,15% (IQR 2,0-11,0%; p_U = 0,017) и к 72 ч незначительно снижалась. Относительное содержание CD8⁺VEGFR-1⁺Т-клеток через 24 ч повышалось до 3% (IQR 0,54-8,5%; p_U = 0,027), через 48 ч достигало 7,8% (IQR 2,5-11,5%; p_U = 0,027), а к 72 ч снижалось до 2,1% (2,5-11,5%; p_U = 0,058). Стимуляция МНК анти-CD3-антителами приводила к усилению экспрессии VEGFR-1 на CD4 и CD8 Т-клетках. Относительное содержание CD4⁺VEGFR-1⁺

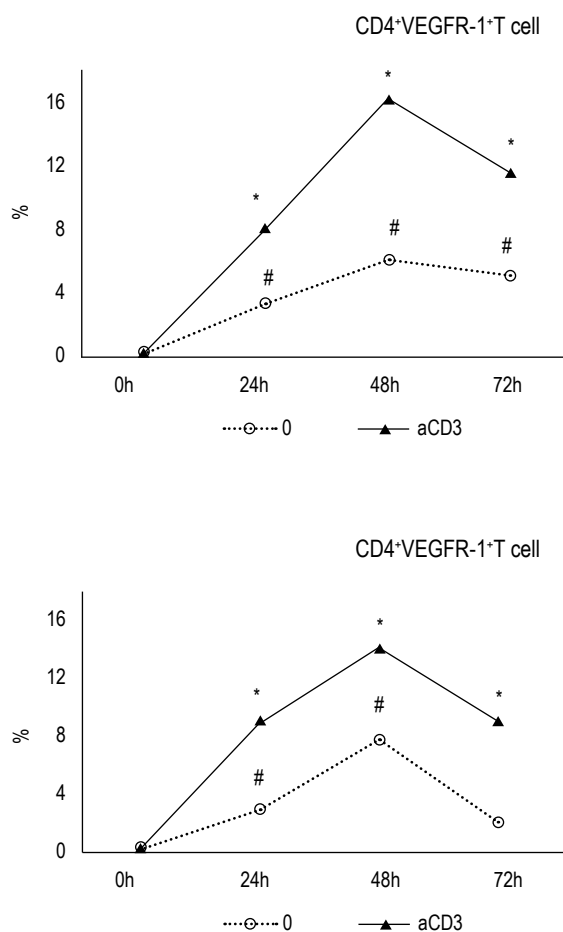


Рисунок 3. Экспрессия VEGFR-1 на CD4⁺ и CD8⁺Т-клетках в нестимулированных (0) и анти-CD3-стимулированных (aCD3) культурах МНК (n = 8)

Примечание. * $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с нестимулированными МНК; # $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению со свежеевыделенными МНК (U-критерий Манна–Уитни).

Figure 3. Expression of VEGFR-1 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells in unstimulated (0) and anti-CD3-stimulated (aCD3) cultures of MNC (n = 8)

Note. * $p < 0,05$, the significance of differences compared with unstimulated MNCs; # $p < 0,05$, significance of differences compared with freshly isolated MNCs (Mann–Whitney U-test).

и CD8⁺VEGFR-1⁺Т-клеток достоверно возросло через 24 ч, достигало максимальных значений через 48 ч культивирования и к 72 ч умеренно снижалось. При этом доля CD4⁺VEGFR-1⁺ и CD8⁺VEGFR-1⁺Т-клеток на всех исследуемых временных точках была достоверно выше, чем в нестимулированных культурах МНК.

Чтобы подтвердить причастность VEGFR-1 сигнального пути к подавлению пролиферации Т-клеток, в заключении исследовали эффект

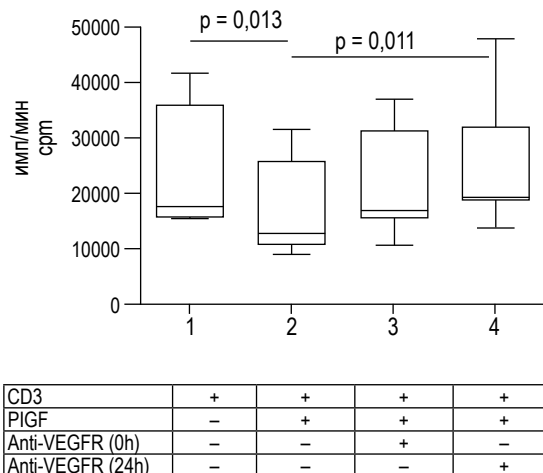


Рисунок 4. Влияние нейтрализующих анти-VEGFR-1-антител на супрессорную активность PIGF

Примечание. Данные представлены в виде медианы, IQR и диапазона минимальных и максимальных значений (n = 8). МНК стимулировали анти-CD3-антителами в отсутствие (1) и присутствии (2) PIGF (5 нг/мл). Нейтрализующие анти-VEGFR-1 (2,5 мкг/мл) антитела добавляли либо совместно с PIGF (3), либо через 24 ч культивирования (4). p – U-критерий Манна–Уитни.

Figure 4. The effect of neutralizing anti-VEGFR-1 antibodies on the PIGF suppressive activity

Note. Data are presented as median, IQR and range of minimum and maximum values (n = 8). MNCs were stimulated with anti-CD3 antibodies in the absence (1) and the presence of (2) PIGF (5 ng/ml). Neutralizing anti-VEGFR-1 (2.5 μ g/ml) antibodies were added together with PIGF (3), or after 24 hours of cultivation (4). p, Mann–Whitney U-test.

блокирования VEGFR-1 на способность PIGF ингибировать пролиферацию активированных Т-клеток. Для этого супрессорный эффект PIGF в культурах анти-CD3-стимулированных МНК исследовали в отсутствие и присутствии нейтрализующих антител против VEGFR-1 (рис. 4). Видно, что в присутствии PIGF интенсивность анти-CD3-индуцированного пролиферативного ответа значительно снижалась в среднем на 31% (IQR 26-38%, $p_U = 0,013$). В присутствии нейтрализующих анти-VEGFR-1-антител супрессорный эффект PIGF уменьшался до 9% (IQR 3-25%) при добавлении нейтрализующих антител совместно с фактором и до 3% (IQR 0-16%) – при добавлении через 24 ч от начала культивирования. Более выраженное подавление супрессорной активности PIGF в последнем случае объясняется, по-видимому, более высокой экспрессией VEGFR-1 на Т-клетках через 24 ч после анти-CD3-стимуляции.

Обсуждение

Неоангиогенез, так же как и способность «избегания» иммунного надзора, являются характерными атрибутами опухолевых клеток [8]. С этой точки зрения исследование иммуномодулирующих свойств проангиогенных факторов представляет исключительный интерес в плане раскрытия новых механизмов опухолевого роста.

Работы по оценке влияния VEGF на функции Т-клеток немногочисленны и проведены в основном на экспериментальных животных. Так, имеются сообщения об атрофии тимуса [17] и снижении количества и функции Т-клеток в селезенке на фоне продолжительного введения VEGF [10], а также способности VEGF усиливать экспрессию коингибиторных (чек-поинт) молекул (PD-1, Tim-3, CTLA-4) на CD8⁺Т-клетках [22]. Иммуносупрессивный эффект VEGF во всех этих исследованиях опосредовался через VEGFR-2 сигнальный путь. У человека в исследованиях *in vitro* также продемонстрирован прямой ингибирующий эффект VEGF-A на пролиферацию и цитотоксическую активность анти-CD3-активированных Т-клеток, который отменялся при блокировании VEGFR-2 [6, 24]. Участие VEGFR-1 сигнального пути в подавлении функций Т-клеток обсуждается в литературе в контексте непрямого эффекта VEGF, опосредованного дендритными клетками. Так, показано, что ДК экспрессируют VEGFR-1, и VEGF/VEGFR-1 сигналинг блокирует активацию транскрипционного фактора NF-κB, ингибируя созревание ДК [5, 18].

Полученные нами результаты впервые демонстрируют, что PlGF ингибирует пролиферацию Т-клеток в культурах МНК, стимулированных анти-CD3-антителами, подавляя функции как CD4⁺, так и CD8⁺Т-клеток. При этом супрессорный эффект PlGF обусловлен прямым взаимодействием фактора с VEGFR-1 на Т-клетках, что подтверждается экспрессией VEGFR-1 Т-лимфоцитами и нивелированием супрессорного эффекта PlGF при блокировании VEGFR-1 нейтрализующими антителами.

Сведения об экспрессии VEGFR-1 на Т-клетках неоднозначны. Ранние исследования на Т-клеточных линиях грызунов не выявили экспрессии мРНК VEGFR-1 [16], хотя впоследствии Vignon T. и соавт. показали, что анти-CD3-активированные CD8⁺Т-клетки мышей-опухоленосителей экспрессируют VEGFR-1 и VEGFR-2 на высоком уровне [22]. Относительно данных у человека, Ziogas A.C. и соавт., исследуя Т-клетки доноров и Т-лимфоциты асцитной жидкости пациенток с раком яичника, не выявили на них VEGFR-1 [24]. В то же время Basu A. и соавт. показали, что Т-клетки периферической крови после активации экспрессируют

как VEGFR-2, так и VEGFR-1 [1], что согласуется с нашими данными.

VEGFR-1 ранее рассматривался исключительно как рецептор-ловушка, поскольку по сравнению с VEGFR-2 имеет более высокую аффинность в сочетании с низкой тирозинкиназной активностью. Однако впоследствии было показано, что PlGF при связывании с VEGFR-1 может образовывать гетеродимер с VEGFR-2, и использовать различные сигнальные пути через активацию Erk/MAPкиназ, PI3K/Akt, PLCγ, и p38/MAPкиназ [20, 21]. Полученные нами данные впервые демонстрируют значение VEGFR-1 в подавлении пролиферации Т-лимфоцитов. Нами также показано, что ингибирующее действие PlGF на пролиферацию Т-клеток осуществляется путем прямого связывания с VEGFR-1, поскольку нейтрализующие антитела к VEGFR-1 блокируют его супрессорный эффект.

Согласно данным литературы, PlGF, аналогично VEGF, способен усиливать опухолевый рост за счет стимуляции неоангиогенеза и пролиферации опухолевых клеток. Однако PlGF/VEGFR1-опосредованные иммуномодулирующие эффекты остаются малоизученными и в основном касаются влияния PlGF на клетки миелоидного ряда [4]. В частности, в исследованиях *in vitro* показана способность PlGF ингибировать дифференцировку и созревание ДК мышей и человека [5, 15], а также индуцировать рекрутирование и M2-фенотип макрофагов в опухолевом микроокружении [11]. С этой точки зрения полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют, что сигналинг через VEGFR-1 может обуславливать прямой ингибирующий эффект на Т-клетки.

Гиперэкспрессия PlGF, а также его взаимосвязь с опухолевой прогрессией продемонстрированы при многих онкологических заболеваниях и объясняются проангиогенной активностью и способностью фактора стимулировать рост опухолевых клеток [15]. Кроме того, недавние исследования показали, что PlGF, усиливая эпителиально-мезенхимальный транзит, играет важную роль в формировании стволовых опухолевых клеток [13]. Выявленный в настоящем исследовании прямой ингибирующий эффект PlGF на Т-клетки является еще одним механизмом, посредством которого PlGF может способствовать опухолевому росту.

Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ 18-44-540005 «Влияние фактора роста плаценты (PlGF) на функции Т-клеток человека и роль VEGF-R1-сигнального пути в реализации эффектов PlGF как новый механизм иммуносупрессии при неоангиогенезе».

Список литературы / References

1. Basu A., Hoerning A., Datta D., Edelbauer M., Stack M., Calzadilla K., Pal S., Briscoe D. Cutting edge: vascular endothelial growth factor-mediated signaling in human CD45RO⁺CD4⁺ T cells promotes Akt and ERK activation and costimulates IFN-gamma production. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 2, pp. 545-549.
2. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 2005, Vol. 69, Suppl. 3, pp. 4-10.
3. de Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp. Mol. Med.*, 2012, Vol. 44, no. 1, pp. 1-9.
4. Dewerchin M., Carmeliet P. Placental growth factor in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets.*, 2014, Vol. 18, no. 11, pp. 1339-1354.
5. Dikov M., Ohm J., Ray N. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 1, pp. 215-222.
6. Gavalas N., Tsiatas M., Tsitsilonis O., Politi E., Ioannou K., Ziogas A., Rodolakis A., Vlahos G., Thomakos N., Haidopoulos D., Terpos E., Antsaklis A., Dimopoulos M.A., Bamias A. VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2. *Br. J. Cancer*, 2012, Vol. 107, no. 11, pp. 1869-1875.
7. Gourley M., Williamson J. Angiogenesis: new targets for the development of anticancer chemotherapies. *Curr. Pharm. Des.*, 2000, Vol. 6, no. 4, pp. 417-439.
8. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, Vol. 100, no. 1, pp. 57-70.
9. Hoff P., Machado K. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treat. Rev.*, 2012, Vol. 38, no. 7, pp. 825-833.
10. Huang Y., Chen X., Dikov M., Novitskiy S., Mosse C., Yang L. Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 2, pp. 624-631.
11. Incio J., Tam J., Rahbari N., Suboj P., McManus D.T., Chin S., Vardam T.D., Batista A., Babykutty S., Jung K., Khachatryan A., Hato T., Ligibel J.A., Krop I.E., Puchner S.B., Schlett C.L., Hoffmann U., Ancukiewicz M., Shibuya M., Carmeliet P., Soares R., Duda D.G., Jain R.K., Fukumura D. PlGF/VEGFR-1 signaling promotes macrophage polarization and accelerated tumor progression in obesity. *Clin. Cancer Res.*, 2016, Vol. 22, no. 12, pp. 2993-3004.
12. Lee S., Jeong D., Han Y-S., Baek M. Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Ann. Surg. Treat. Res.*, 2015, Vol. 89, no. 1, pp. 1-8.
13. Li H., Jin Y., Hu Y., Jiang L., Liu F., Zhang Y., Hao Y., Chen S., Wu X., Liu Y. The PLGF/c-MYC/miR-19a axis promotes metastasis and stemness in gallbladder cancer. *Cancer Sci.*, 2018, Vol. 109, no. 5, pp. 1532-1544.
14. Li Y.L., Zhao H., Ren X. Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? *Cancer Biol. Med.*, 2016, Vol. 13, no. 2, pp. 206-214.
15. Lin Y-L, Liang Y-C, Chiang B-L. Placental growth factor down-regulates type 1 T helper immune response by modulating the function of dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 82, no. 6, pp. 1473-2480.
16. Mor E., Quintana F.J., Cohen I.R. Angiogenesis inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 7, pp. 4618-4623.
17. Ohm J.E., Gabrilovich D.I., Sempowski G.D., Kisseleva E., Parman K.S., Nadaf S., Carbone D.P. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood*, 2003, Vol. 101, no. 12, pp. 4878-4886.
18. Oyama T., Ran S., Ishida T., Nadaf S., Kerr L., Carbone D.P., Gabrilovich D.I. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 160, no. 3, pp. 1224-1232.
19. Ozao-Choy J., Ma G., Kao J., Wang G.X., Meseck M., Sung M., Schwartz M., Divino C., Pan P., Chen S. The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res.*, 2009, Vol. 69, no. 6, pp. 2514-2522.
20. Tchaikovski V., Fellbrich G., Waltenberger J. The molecular basis of VEGFR-1 signal transduction pathways in primary human monocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2008, Vol. 28, no. 2, pp. 322-328.
21. Voron T., Marcheteau E., Pernot S., Colussi O., Tartour E., Taieb J., Terme M. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front Oncol.*, 2014, Vol. 4, p. 70.
22. Voron T., Colussi O., Marcheteau E., Pernot S., Nizard M., Pointet A.L., Latreche S., Bergaya S., Benhamouda N., Tanchot C., Stockmann C., Combe P., Berger A., Zinzindohoue F., Yagita H., Tartour E., Taieb J., Terme M. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8⁺ T cells in tumors. *J. Exp. Med.*, 2015, Vol. 212, no. 2, pp. 139-148.

23. Yang J., Yan J., Liu B. Targeting VEGF/VEGFR to modulate antitumor immunity. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, p. 978.
24. Ziogas A.C., Gavalas N.G., Tsiatas M., Tsitsilonis O., Politi E., Terpos E., Rodolakis A., Vlahos G., Thomakos N., Haidopoulos D., Antsaklis A., Dimopoulos M.A., Bamias A. VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor Type 2. *Int. J. Cancer.*, 2012, Vol. 130, no. 4, pp. 857-864.

Авторы:

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Леплина О.Ю. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Leplina O.Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 28.01.2019
Принята к печати 07.03.2019

Received 28.01.2019
Accepted 07.03.2019

РЕАКЦИЯ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК НА РЕГУЛЯТОРНЫЙ СИГНАЛ ИНТЕРЛЕЙКИНА 1 КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Шанин С.Н., Корнева Е.А.

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

Резюме. Количественная оценка пролиферативной активности лимфоцитов — важный и едва ли не единственный показатель уровня функциональной активности не только этих клеток, но и иммунной системы в целом.

Целью настоящего исследования явилось разработка адекватного физиологического теста для определения степени функциональной активности лимфоидных клеток. Выбор IL-1 в качестве активатора пролиферации связан с наличием рецепторов к нему у лимфоидных клеток, ключевой ролью этого цитокина в инициации широкого спектра биологических эффектов иммунной системы на антиген, в том числе участие в межклеточной кооперации при иммунном ответе и дистантным действием в отношении различных периферических клеточных систем. Установлено, что лиганд-рецепторное взаимодействие IL-1 рецептором 1 типа активирует нейтральную сфингомиелиназу, иницируя тем самым сфингомиелиновый путь сигнальной трансдукции в лимфоцитах. Степень активации этого фермента различается в зависимости от вида стрессорного воздействия и коррелирует с изменениями вектора гуморального иммунного ответа и пролиферативной активности лимфоцитов. При стрессах, вызывающих развитие иммуносупрессии как у мышей, так и у крыс, уровень rIL-1 повышается, но активность нейтральной сфингомиелиназы и пролиферации лимфоидных клеток существенно снижается. Изменение степени пролиферации лимфоцитов стало маркером тяжести патологического процесса в клинике. Установлена высокая степень корреляции низкой интенсивности пролиферации лимфоцитов периферической крови в ответ на действие IL-1 и неблагоприятного исхода заболевания у пациентов, перенесших тяжелую сочетанную травму, и детей с гнойной формой менингита. Таким образом, степень пролиферации лимфоцитов в ответ на действие регуляторного сигнала IL-1 может быть использована как для анализа эффективности препаратов-иммуномодуляторов, так и в клинической и научной практике как показатель, имеющий диагностическое и прогностическое значение.

Ключевые слова: пролиферация лимфоцитов, IL-1, стресс, травма, менингит

RESPONSE OF LYMPHOID CELLS TO REGULATORY SIGNAL OF INTERLEUKIN 1 AS AN INDEX OF LYMPHOCYTE ACTIVITY

Shanin S.N., Korneva E.A.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Intensity of lymphocyte proliferative activity is an important and almost the only index of their functional activity levels, and of immune system in general. The aim of this study was to develop an adequate

Адрес для переписки:

Шанин Сергей Николаевич
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 9а.
Тел.: 8 (812) 234-15-83.
Факс: 8 (812) 234-94-93.
E-mail: shanins@yandex.ru

Address for correspondence:

Shanin Sergey N.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 9a.
Phone: 7 (812) 234-15-83.
Fax: 7 (812) 234-94-93.
E-mail: shanins@yandex.ru

Образец цитирования:

С.Н. Шанин, Е.А. Корнева «Реакция лимфоидных клеток на регуляторный сигнал интерлейкина 1 как показатель их функциональной активности» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 661-668. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-661-668
© Шанин С.Н., Корнева Е.А., 2019

For citation:

S.N. Shanin, E.A. Korneva "Response of lymphoid cells to regulatory signal of Interleukin 1 as an index of lymphocyte activity", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 661-668. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-661-668
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-661-668

physiological test to determine the degree of functional activity for lymphoid cells. The choice of IL-1 as an activator of proliferation is justified by the presence of IL-1 receptors on lymphoid cell membranes, as well as the key role of this cytokine for initiation of a wide range of biological effects of antigens upon immune system, including participation in intercellular cooperation and distant actions upon different cell populations. It was found that the ligand-receptor interaction of IL-1 with type I receptor activates neutral sphingomyelinase, and the sphingomyelin pathway of signal transduction in lymphocytes. The degree of this enzyme activation depends on the type of stress and correlates with changes of humoral immune response vector and proliferative activity of lymphocytes. The level of IL-1 increases, but the activity of neutral sphingomyelinase and lymphoid cell proliferation is significantly reduced after application of immunosuppressive stress factors in murine and rat models. Variable degree of lymphocyte proliferation has become a severity marker of pathological process in clinical settings. High degree of correlation between the low intensity of peripheral blood lymphocyte proliferation in response to IL-1 action, and unfavorable disease outcome was revealed in the patients with severe combined trauma and children with purulent meningitis. Thus, the degree of lymphocyte proliferation in response to regulatory signal of IL-1 may be used both for analysis of immune modulator efficiency, as well as diagnostic and prognostic indicators in clinical practice.

Keywords: lymphocyte proliferation, IL-1, stress, injury, meningitis

Введение

Лимфоциты — единственный тип клеток крови, для которых пролиферация в периферических тканях является физиологической нормой и обязательным этапом развития иммунного ответа. Количественная оценка степени пролиферации этих клеток при действии регуляторных цитокинов характеризует уровень их функциональной активации.

Как известно, пролиферация лимфоцитов происходит при действии антигенов, этот процесс опосредован цитокинами, продукция которых стимулируется, и они влияют на рецепторный аппарат лимфоцитарных клеток. Важнейшим свойством IL-1 является стимуляция пролиферации лимфоцитов. Хотя IL-1 не считается фактором роста Т- и В-лимфоцитов, но индуцирует синтез IL-2 и IL-4 и усиливает экспрессию их рецепторов на мембранах активированных лимфоцитов [6, 12]. Вместе с тем на мембранах лимфоцитов экспрессируются рецепторы к IL-1, к которым относятся рецепторы I и II типа, а также аксессуарный белок, являющийся второй субъединицей комплекса рецептора I типа для IL-1 [5, 17]. Количество рецепторов I типа для IL-1 на одной клетке очень невелико, при этом биологический ответ клетки на действие цитокина проявляется даже при связывании IL-1β с 2-3 % экспрессированных рецепторов I типа [14].

IL-1 является ключевым цитокином, инициирующим развитие широкого спектра биологических эффектов на повреждающее воздействие. В присутствии IL-1 усиливается активность естественных киллеров (ЕКК) — субпопуляции лимфоцитов костномозгового происхождения, участвующих в противоопухолевом иммунитете. Влияние IL-1 на цитолитическую активность NK и продукцию ими γ-интерферона увеличи-

вается при его одновременном действии с IL-2, IL-12 и TNFα. [13]. Под действием IL-1 профессиональные фагоциты — макрофаги — выделяют простагландины, лейкотриены и реактивные производные кислорода. Нейтрофильные гранулоциты отвечают на действие IL-1 метаболическим взрывом и дегрануляцией. Он вызывает хемотаксис лимфоцитов, мононуклеарных фагоцитов и нейтрофилов. В то же самое время IL-1 усиливает адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам, способствуя, таким образом, их выходу из костного мозга в циркуляцию и возникновению лейкоцитарных инфильтратов [20, 21, 24]. К клеткам, в которых IL-1 инициирует пролиферацию и синтез простагландинов, относятся фибробласты, клетки мезоглии клубочкового аппарата почек, синовиальные клетки больных ревматоидным артритом, клетки эпителия [18]. Интерлейкин-1, будучи провоспалительным цитокином, индуцирует синтез белков острой фазы гепатоцитами, а также экспрессию генов печеночных белков, продуцируемых в ответ на повреждение, инфекцию, и других патологических процессов — С-реактивного белка и сывороточного амилоида А, синтез которых при действии IL-1 увеличивается в сотни раз [25].

Экспрессия IL-1 в тканях здорового организма очень незначительна. Тем не менее повышение продукции IL-1 наблюдается при овуляции и физической нагрузке [6]. И, хотя экспрессия провоспалительных цитокинов, в том числе и IL-1, в мозге в норме очень низка (но возрастает при стрессе, инфекции и повреждении), уже сформировалось представление о том, что IL-1 необходим для нормальной деятельности мозга [4, 26].

Помимо участия в местной межклеточной кооперации при иммунном ответе и дистантных эффектах в отношении различных периферических клеточных систем, IL-1 обладает еще и цен-

тральным действием на структуры головного мозга. IL-1 экспрессируется на клетках различных структур головного мозга, включая нейроны, на мембранах которых представлены и рецепторы к этому цитокину [15, 16, 19]. IL-1 — эндогенный пироген, осуществляющий запуск и поддержание лихорадочной реакции путем прямого воздействия на терморегулирующие клетки медиальной преоптической области (МПО) переднего гипоталамуса [13]. Активирующее влияние IL-1 на глюкокортикоидную функцию ГНАКС, выражающееся в инициации повышения уровня АКТГ и кортикостероидов в плазме крови [8, 11], обусловлено его центральным действием на гипоталамические структуры мозга. Важным в биологической характеристике IL-1 является его вовлечение в развитие стрессорной реакции [8] как значимого компонента реализации взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем. В частности, именно IL-1 — один из передатчиков информации от иммунной системы к нервной [3, 8, 10].

Целью настоящего исследования явилось разработка функционального теста для определения степени активности лимфоидных клеток, которая в большой мере характеризует и уровень активности иммунной системы в целом. Принципиальным отличием от общепринятых методов определения интенсивности пролиферации лимфоцитов является использование IL-1 как физиологически адекватного активатора этого процесса.

Материалы и методы

В работе использованы лимфоциты, полученные из селезенки и крови стрессированных животных, а также венозной крови пациентов клиники НИИ детских инфекций и НИИ скорой помощи.

Выделение спленоцитов из селезенки крыс

Крыс декапитировали, в стерильных условиях вскрывали брюшную полость и удаляли селезенку. Из полученных селезенки выделяли спленоциты путем мягкого раздавливания в стеклянном гомогенизаторе с 2 мл среды RPMI-1640, содержащей 2 мМ глутамин, в асептических условиях, на холоде. Полученную суспензию фильтровали через стерильный марлевый фильтр, отмывали, центрифугируя 10 мин при 2000 об/мин и 4 °С. Эритроциты, присутствующие в суспензии клеток, лизировали добавлением стерильного 0,83% раствора NH_4Cl . Полученные спленоциты дважды отмывали от лизата центрифугированием по 10 мин при 2000 об/мин в 20 мл свежей среды RPMI-1640. После подсчета количества клеток в камере Горяева (производственная фирма «Линза», Россия) на инвертированном микро-

скопе МИБ-Р (ОАО «ЛОМО», Россия), спленоциты разводили в среде RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной фетальной сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург) из расчета 1×10^7 клеток/мл.

Выделение лимфоцитов из крови

В гепаринизированную кровь добавляли среду Хенкса и выделяли клетки в градиенте плотности (1,090 г/куб. см) смеси фиколл-верографина центрифугированием в течение 40 мин при 700 г и 18 °С. Полученные клетки отмывали в среде Хенкса трехразовым центрифугированием по 10 мин при 500 г и 4 °С. Выделенные мононуклеары (моноциты и лимфоциты) ресуспендировали в среде для культивирования клеток на основе RPMI-1640 (Sigma), содержащей 10% фетальной сыворотки (Sigma), пенициллин (100 ЕД/мл), 2 мМ глутамин, в концентрации 1 млн клеток/мл и преинкубировали 2 часа при 37 °С в атмосфере 5% углекислого газа для отделения прилипающих клеток (моноцитов).

Полученные лимфоциты селезенки и крови культивировали в 96-луночных планшетах. В каждую лунку вносили 100 мкл суспензии лимфоцитов (приблизительно 0,3 млн клеток) в среде для культивирования, 50 мкл митогена конканавалина А (ConA, 0,625 мкг/мл) и 50 мкл нативного препарата IL-1 β кролика (НИИЭМ РАМН) в дозе 0,06 мкг/мл или 50 мкл рекомбинантного препарата IL-1 β (pIL-1 β , Institute for Drug Research, Budapest, Hungary) в дозе 250 нг/мл. Контролем служили культуры лимфоцитов без IL-1 β и без митогена. Клетки культивировали в инкубаторе при 37 °С, в атмосфере, содержащей 5% CO_2 и 100% влажности. Через 56 часов в культуру вносили меченный тритием тимидин из расчета 5 мККи/мл («Изотоп», РФ). Через 16 часов клетки переносили на фильтры с помощью полуавтоматического харвестера (Scatron, США). Включение меченого тимидина оценивали с помощью сцинтилляционного β -счетчика (Beckman, США). Реакцию учитывали количественно по включению метки в ДНК лимфоцитов с использованием толуоловой сцинтилляционной смеси [22].

Таким образом, особенностью примененного метода стала оценка эффекта действия IL-1 на процесс пролиферации лимфоцитов, поскольку изменение степени пролиферативной активности лимфоидных клеток является наиболее информативным показателем функциональной активности иммунной системы в целом в норме и при различных формах патологии.

Результаты

Применение различных моделей экспериментального стресса позволило оценить влияние ин-

тенсивности стресса на активность пролиферации лимфоцитов, индуцированной IL-1.

Интенсивное комбинированное (иммобилизация и охлаждение) стрессорное воздействие приводит к развитию у животных выраженной супрессии гуморального иммунного ответа и сопровождается развитием классических проявлений стресса — повышением уровня глюкокортикоидных гормонов в крови, острыми изъязвлениями желудочно-кишечного тракта и снижением массы тимуса.

Кратковременный ротационный стресс, не вызывающий развития иммуносупрессии, также приводит к повышению концентрации кортикостерона в крови в течение 2-х часов после окончания воздействия — сопоставимое по интенсивности, но менее длительное, чем при комбинированном стрессе. Однако при этом не отмечается появления деструкций секреторного отдела слизистой желудка, не изменяется масса тимуса животных.

И в том и в другом случаях наблюдали повышение концентрации IL-1 в крови. Эти данные позволяют рассматривать стресс-индуцированную продукцию IL-1 как одно из характерных проявлений стресса наряду с такими классическими его проявлениями, как повышение концентрации глюкокортикоидных гормонов и катехоламинов в крови, появление острых изъязвлений желудочно-кишечного тракта, инволюция тимико-лимфатического аппарата и нейтрофилез [2].

При стрессорных воздействиях, вызывающих развитие иммуносупрессии, несмотря на повышение уровня IL-1 в сыворотке, наблюдается выраженное угнетение реакции лимфоидных клеток-мишеней на действие IL-1 β *in vitro* [23]. Пролиферативная активность лимфоцитов под действием субоптимальной дозы ConA (вызывающей увеличение включения метки в делящиеся клетки на 50-70%), в условиях стресса, не изменялась по сравнению с клетками интактных животных (рис. 1).

Поскольку рецепторы к IL-1 представлены на мембранах лимфоидных клеток, изучена трансдукция его сигнала в лимфоцитах и эффекты действия на функции лимфоидных клеток. Так, исследования трансдукции сигнала IL-1 β по сфингомиелиновому пути в нервных и иммунокомпетентных клетках животных позволили заключить, что действие IL-1 β на тимоциты опосредовано рецептором IL-1 I типа, а трансдукция сигнала цитокина в клетку осуществляется и по сфингомиелиновому пути (табл. 1).

Эти данные свидетельствуют о прямом действии IL-1 на мембраны лимфоидных клеток, а вектор изменения интенсивности передачи сигнала по сфингомиелиновому пути совпадает с характером изменений иммунологических реакций.

Угнетение реакции лимфоидных клеток на регуляторный сигнал IL-1 можно купировать с помощью иммуномодуляторов, например дегрина.

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА И ВЛИЯНИЕ rIL-1 β НА АКТИВНОСТЬ НЕЙТРАЛЬНОЙ СФИНГОМИЕЛИНАЗЫ (Н-СМазы) В МЕМБРАННОЙ ФРАКЦИИ ТИМОЦИТОВ ИНТАКТНЫХ МЫШЕЙ И МЫШЕЙ, ПОДВЕРГНУТЫХ РОТАЦИОННОМУ И КОМБИНИРОВАННОМУ СТРЕССУ

TABLE 1. CHANGES IN HUMORAL IMMUNE RESPONSE INTENSITY AND THE EFFECT OF rIL-1 β ON NEUTRAL SPHINGOMYELINASE ACTIVITY (N-SMase) IN THE MEMBRANE FRACTION OF LYMPHOCYTES OF INTACT MICE AND MICE SUBJECTED TO ROTATIONAL AND COMBINED STRESS

Экспериментальные группы Experimental groups	Антитело-образующие клетки селезенки (%) Antibody-forming cells of the spleen (%)	Титры антител в сыворотке крови (%) Antibody titers in blood serum (%)	Концентрация rIL-1 (Моль) Concentration of rIL-1 (M)			
			10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
			Активность Н-СМазы (%) Neutral sphingomyelinase activity (%)			
Интактные Intact	100	100	9,7 $\pm$ 0,5	28,9 $\pm$ 8,8*	40,2 $\pm$ 11,5*	30,0 $\pm$ 12,4*
Ротационный стресс Rotational stress	141 $\pm$ 14 [#]	157 $\pm$ 21 [#]	—	—	45,0 $\pm$ 6,6*	—
Комбинированный стресс Combined stress	49 $\pm$ 15 [#]	22 $\pm$ 6 [#]	—	—	22,1 $\pm$ 4,2	—

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с базальным уровнем; [#] — $p < 0,05$ по сравнению с интактными животными.

Note. *, $p < 0,05$ as compared with the basal level; [#], $p < 0,05$ as compared with the intact animals.

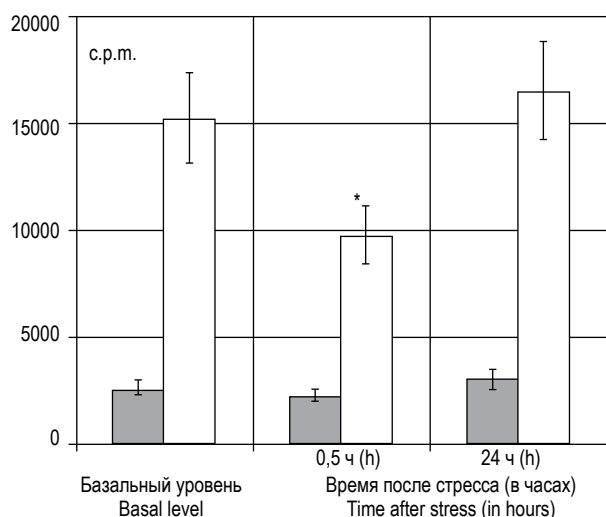


Рисунок 1. Процесс пролиферации лимфоцитов периферической крови крыс, индуцированный введением в культуру клеток ConA и rIL-1β при комбинированном (иммуносупрессирующем) стрессе
Примечание. По оси абсцисс – время после стрессорного воздействия (в часах); по оси ординат – количество распадов ³H-тимидина, захваченного делящимися лимфоцитами (с.р.м. – count per minute).

■ лимфоциты, стимулированные ConA (0,75 мкг/мл);
■ лимфоциты, стимулированные ConA (0,75 мкг/мл) + rIL-1β (6 нг/мл).

* – $p < 0,05$ по сравнению с базальным уровнем.

Figure 1. The process of peripheral blood lymphocyte proliferation in rats induced by the introduction of ConA and rIL-1β into the cells culture in combined (immunosuppressive) stress

Note. Abscissa, time after stress (in hours). Ordinate, number of decays of ³H-thymidine captured by dividing lymphocytes (c.p.m. – count per minute).

■ lymphocytes, stimulated by ConA (0.75 mkg/ml);
■ lymphocytes, stimulated by ConA (0.75 mkg/ml) + rIL-1β (6 ng/ml).

*, $p < 0.05$ as compared with the basal level.

Применение этого препарата непосредственно после стрессорного воздействия ведет к восстановлению интенсивности пролиферации лимфоцитов на действие IL-1, не изменяя при этом реакцию клеток на субоптимальную дозу ConA (рис. 2).

Изменение пролиферативной активности лимфоцитов имеет диагностическое и прогностическое значение в клинике. Как выяснилось, реакция лимфоцитов периферической крови на регуляторный сигнал IL-1 у детей, больных ОРВИ и серозным менингитом, в ответ на комитогенное действие IL-1β в первые дни заболевания подавлена по сравнению с реакцией клеток здоровых детей и нормализуется к 5-14-му дню заболевания [1].

Отличие интенсивности пролиферации лимфоцитов крови детей, больных гнойным менин-

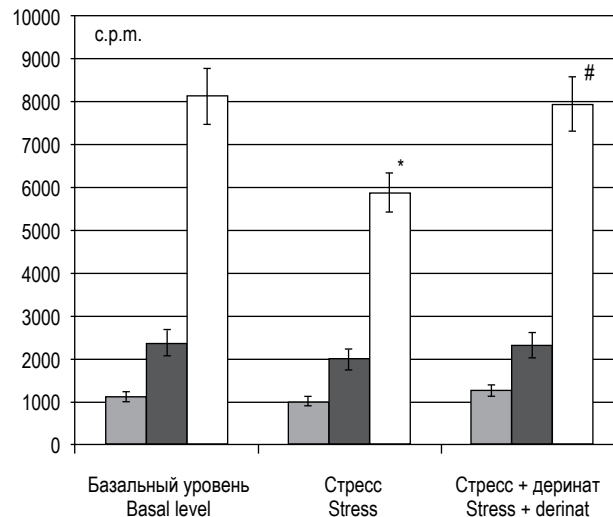


Рисунок 2. Пролиферации спленоцитов крыс Wistar *in vitro* после 30-минутного охлаждения и введения дерината (10 мг/кг массы тела)

Примечание. По оси абсцисс – группы животных; по оси ординат – количество распадов ³H-тимидина, захваченного делящимися лимфоцитами (с.р.м. – count per minute)

■ нестимулированные лимфоциты;
■ лимфоциты, стимулированные ConA (0,75 мкг/мл);
■ лимфоциты, стимулированные ConA (0,75 мкг/мл) + rIL-1β (6 нг/мл).

* – $p < 0,05$ – по сравнению с показателями у контрольных животных;

– $p < 0,05$ – по сравнению с показателями у стрессированных животных.

Figure 2. Proliferation of Wistar rat splenocytes *in vitro* after 30-min of cooling stress and the introduction of Derinat (10 mg/kg body weight)

Note. Abscissa, groups of animals. Ordinate, number of decays of ³H-thymidine captured by dividing lymphocytes (c.p.m. – count per minute).

■ unstimulated lymphocytes;
■ lymphocytes, stimulated by ConA (0.75 mkg/ml);
■ lymphocytes, stimulated by ConA (0.75 mkg/ml) + rIL-1β (6 ng/ml).

*, $p < 0.05$ as compared with control animals;

#, $p < 0.05$ as compared with stressed animals.

гитом, от этой реакции у здоровых детей, при ОРВИ и серозном менингите, заключается в более выраженной активации пролиферации клеток под влиянием ConA в первые дни заболевания, а также в тенденции к спонтанной пролиферации лимфоцитов (без ConA и IL-1β), становившейся достоверной по отношению к пролиферации лимфоцитов детей, больных серозным менингитом, к 12-14-м суткам наблюдения и лечения. Полученные результаты также свидетельствуют об однотипном характере изменения этой активности клеток у детей, больных ОРВИ и серозным менингитом, и ее отличии от изменения активности пролиферации при гнойном менингите (рис. 3).

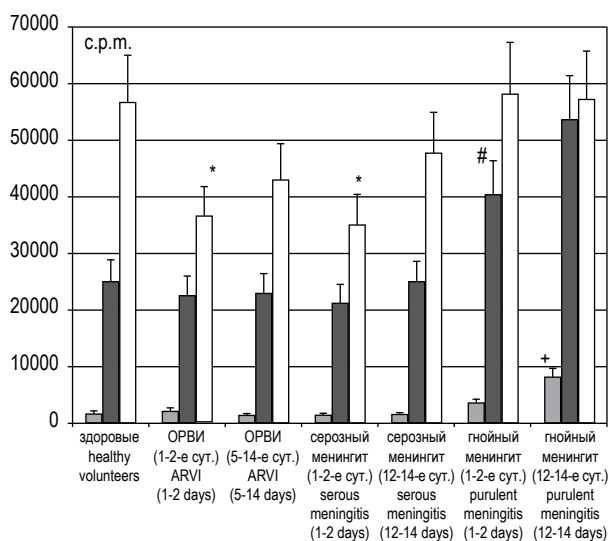


Рисунок 3. Интенсивность пролиферативной реакции лимфоцитов крови на регуляторный сигнал rIL-1β *in vitro* у детей с ОРВИ, серозной и гнойной формами менингита

Примечание. По оси абсцисс – группы пациентов; по оси ординат – количество распадов ³H-тимидина, захваченного делящимися лимфоцитами (с.р.м. – count per minute).

□ нестимулированные лимфоциты;
■ лимфоциты, стимулированные ConA (0,75 мкг/мл);
▒ лимфоциты, стимулированные ConA (0,75 мкг/мл) + rIL-1β (6 нг/мл).

* – $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми детьми;
+ – $p < 0,05$ по сравнению с детьми, больными ОРВИ (5-14 сут.) и серозным менингитом (12-14 сут.);
– $p < 0,05$ по сравнению с детьми, больными ОРВИ (1-2 сут.) и серозным менингитом (1-2 сут.).

Figure 3. Intensity of proliferative reaction of blood lymphocytes to regulatory signal rIL-1β *in vitro* in children with ARVI, serous and purulent forms of meningitis

Note. Abscissa, groups of patients. Ordinate, number of decays of ³H-thymidine captured by dividing lymphocytes (c.p.m. – count per minute).

□ unstimulated lymphocytes;
■ lymphocytes, stimulated by ConA (0.75 mcg/ml);
▒ lymphocytes, stimulated by ConA (0.75 mcg/ml) + rIL-1β (6 ng/ml).

*, $p < 0.05$ as compared with healthy children;
+, $p < 0.05$ as compared with children of ARVI group (5-14 days) and serous meningitis group (12-14 days);
#, $p < 0.05$ as compared with children of ARVI group (1-2 days) and serous meningitis group (1-2 days).

У пациентов с острой кровопотерей констатирована активация процессов трансформации и пролиферации лимфоцитов крови, более выраженных, чем у больных с тяжелой сочетанной травмой. Эти результаты, полученные совместно с сотрудниками Института скорой помощи, согласуются с данными о снижении пролиферативной активности Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов после тяжелых хирургических вмешательств [7].

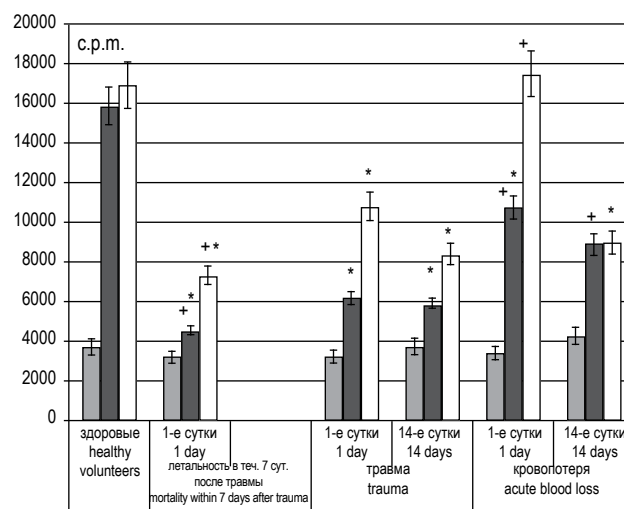


Рисунок 4. Изменение пролиферативного ответа лимфоцитов периферической крови на действие rIL-1β у пациентов после тяжелой сочетанной травмы и острой кровопотери

Примечание. По оси абсцисс – группы пациентов; по оси ординат – количество распадов ³H-тимидина, захваченного делящимися лимфоцитами (с.р.м. – count per minute).

□ лимфоциты, стимулированные ConA (0,75 мкг/мл);
■ лимфоциты, стимулированные ConA (0,75 мкг/мл) + rIL-1β (6 нг/мл).

* – $p < 0,05$ по сравнению с теми же показателями у здоровых доноров;

+ – $p < 0,05$ по сравнению с теми же показателями у больных с тяжелой сочетанной травмой.

Figure 4. Changes in the proliferative response of peripheral blood lymphocytes to the action of rIL-1β in patients after severe combined trauma and acute blood loss

Note. Abscissa, groups of patients. Ordinate, number of decays of ³H-thymidine captured by dividing lymphocytes (c.p.m. – count per minute).

□ lymphocytes, stimulated by ConA (0.75 mcg/ml);
■ lymphocytes, stimulated by ConA (0.75 mcg/ml) + rIL-1β (6 ng/ml).

*, $p < 0.05$ as compared with the same indicators in healthy donors;

+, $p < 0.05$ as compared with the same indicators in patients with severe combined trauma.

Анализ изменения ответной реакции лимфоцитов на регуляторное влияние цитокина IL-1β позволил выявить высокую степень корреляции низкой интенсивности пролиферации лимфоцитов периферической крови в ответ на действие IL-1 и неблагоприятного исхода заболевания (рис. 4).

Обсуждение

Таким образом, степень активации процесса пролиферации лимфоцитов, инициированная действием регуляторного сигнала – цитокина IL-1, является информативным показателем функциональной активности клеток иммунной

системы и, вероятно, уровня активности иммунной системы в целом. IL-1 является раннедействующим медиатором иммунного ответа, инициирующим иммунную реакцию, регулирующим функции Т- и В-лимфоцитов, усиливающим процесс антителообразования — увеличение количества антителообразующих клеток в селезенке и повышение титров антител в сыворотке крови, а также стимулирующим продукцию других факторов роста и дифференцировки, влияющих на Т- и В-клетки, прежде всего IL-2 и IL-4 [6, 12].

При этом эффективность процесса активации защитных функций зависит не только от скорости продукции и уровня IL-1, но и от чувствительности клеток-мишеней к его действию. Так, эффекты действия IL-1 на лимфоидные клетки различаются при различных вариантах стрессорного воздействия, что коррелирует с изменениями вектора гуморального иммунного ответа на Т-зависимый антиген (эритроциты барана) у крыс. При стрессах, вызывающих развитие иммуносупрессии, продукция IL-1 повышается, но клетки-мишени не реагируют на это событие адекватно: активации процесса пролиферации лимфоидных клеток в ответ на действие цитокина не происходит, по-видимому, в результате на-

рушения лиганд-рецепторных отношений на их мембране.

Изменения этого функционального показателя являются маркером тяжести патологического процесса, о чем свидетельствуют результаты клинических исследований детей с различными формами менингита и пациентов, перенесших тяжелую сочетанную травму или острую кровопотерю.

Приведенные экспериментальные и клинические данные позволяют заключить, что степень пролиферации лимфоидных клеток в ответ на действие регуляторного сигнала IL-1 является диагностически значимым тестом для оценки функциональной активности иммунной системы. Следует подчеркнуть физиологическую адекватность этого метода, поскольку речь идет об эффектах действия IL-1 — процессе, происходящем в целостном организме в условиях патологии. Этот метод может быть использован для анализа эффективности новых препаратов, обладающих иммуномодулирующим действием, а также в клинической и научной практике как индикатор степени активации лимфоцитов в ответ на регуляторный сигнал, что имеет диагностическое и прогностическое значение.

Список литературы / References

1. Ботерашвили Н.М., Рыбакина Е.Г., Шанин С.Н., Козинец И.А., Сорокина М.Н., Иванова В.В. Продукция и эффекты действия интерлейкина-1 при серозных и гнойных менингитах у детей // Медицинская иммунология, 2000. Т. 2, № 3. С. 321-328. [Boterashvili N.M., Rybakina E.G., Shanin S.N., Kozinets I.A., Sorokina M.N., Ivanova V.V. Interleukin 1 production and action in infants with serous and purulent meningitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, Vol. 2, no. 3, pp. 321-328. (In Russ.)]
2. Корнева Е.А., Шанин С.Н., Рыбакина Е.Г. Интерлейкин-1 в реализации стресс-индуцированных изменений функций иммунной системы // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2000. Т. 86, № 3. С. 292-302. [Korneva E.A., Shanin S.N., Rybakina E.G. Interleukin-1 in realisation of stress-induced changes in functions of the immune system. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova = Sechenov Russian Journal of Physiology*, 2000, Vol. 86, no. 3, pp. 292-302. (In Russ.)]
3. Корнева Е.А. Нейроиммунофизиология вчера и сегодня // Клиническая патофизиология, 2016. Т. 22, № 1. С. 7-19. [Korneva E.A. Neuroimmunophysiology yesterday and present days. *Klinicheskaya patofiziologiya = Clinical Pathophysiology*, 2016, Vol. 22, no. 1, pp. 7-19. (In Russ.)]
4. Левин С.Г., Годухин О.В. Модулирующее действие цитокинов на механизмы синаптической пластичности в мозге // Биохимия, 2017. Т. 82, № 3. С. 397-409. [Levin S.G., Godukhin O.V. Modulating effect of cytokines on mechanisms of synaptic plasticity in the brain. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2017, Vol. 82, no. 3, pp. 397-409. (In Russ.)]
5. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1. Физиология. Патология. Клиника. СПб.: Фолиант, 2011. 480 с. [Simbirtsev A.S. Interleukin 1. Physiology. Pathology. Clinic]. St. Petersburg: Foliant, 2011. 480 p.
6. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases]. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.
7. Травматическая болезнь и ее осложнения / Под ред. Селезнева С.А., Багненко С.Ф., Шапота Ю.Б., Курьгина А.А. СПб.: Политехника, 2004. 414 с. [Traumatic disease and its complications / ed. Seleznev S.A., Bagnenko S.F., Shapot Yu.B., Kurygin A.A.]. St. Petersburg: Polytechnica, 2004. 414 p.
8. Besedovsky H.O., Del Rey A., Sorkin E., Dinarello C.A. Immunoregulatory feedback between Interleukin 1 and glucocorticoid hormones. *Science*, 1986, Vol. 223, no. 4764, pp. 652-654.
9. Black P.H. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav. Immun.*, 2002, Vol. 16, no. 6, pp. 622-653.
10. Capuron L., Miller A.H. Immune system to brain signaling: neuro-psychopharmacological implications. *Pharmacol. Therapeut*, 2011, Vol. 130, no. 2, pp. 226-238.

11. Del Rey A., Verdenhalven M., Lörwald A.C., Meyer C., Hernangómez M., Randolph A., Brain-borne IL-1 adjusts glucoregulation and provides fuel support to astrocytes and neurons in an autocrine/paracrine manner. *Mol. Psychiatry*, 2016, Vol. 21, pp. 1309-1320.
12. Dinarello C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 27, pp. 519-550.
13. Dinarello C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 14, pp. 3720-3732.
14. Dinarello C.A. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Semin. Immunol.*, 2013, Vol. 25, no. 6, pp. 389-393.
15. Dunn A.J. Cytokine activation of the HPA axis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000, Vol. 917, no. 1, pp. 608-617.
16. Gentile A., Freseghna D., Musella A., Sepman H., Bullitta S., de Vito F., Fantozzi R., Usiello A., Maccarrone M., Mercuri N.B., Lutz B., Mandolesi G., Centonze D. Interaction between interleukin-1beta and type-1 cannabinoid receptor is involved in anxiety-like behavior in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroinflammation*, 2016, Vol. 13, no. 1, pp. 231-244.
17. Greenfeder S.A., Nunes P., Kwee L., Labow M., Chizzonite R.A., Ju G. Molecular cloning and characterisation of a second subunit of the Interleukin 1 receptor complex. *J. Biol. Chem.*, 1995, Vol. 270, pp. 13757-13785.
18. Guo H., Callaway J.B., Ting J.P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.*, 2015, Vol. 21, no. 7, pp. 677-687.
19. Hewett S.J., Jackman N.A., Claycomb R.J. Interleukin-1beta in central nervous system injury and repair. *Eur. J. Neurodegener. Dis.*, 2012, Vol. 1, no. 2, pp. 195-211.
20. Oleszycka E., Moran H.B., Tynan G.A., Hearnden C.H., Coutts G., Campbell M., Allan S.M., Scott C.J., Lavelle E.C. IL-1alpha and inflammasome-independent IL-1beta promote neutrophil infiltration following alum vaccination. *FEBS J.*, 2016, 283, pp. 9-24.
21. Palomo J., Dietrich D., Martin P., Palmer G., Gabay C. The interleukin (IL)-1 cytokine family – balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine*, 2015, Vol. 76, no. 1, pp. 25-37.
22. Rosenwasser L.J., Dinarello C.A. Ability of human leukocytic pyrogen to enhance phytohemagglutinin induced murine thymocyte proliferation. *Cell Immunol.*, 1981, Vol. 63, no. 1, pp. 134-142.
23. Rybakina E.G., Shanin S.N., Korneva E.A. Cellular, molecular and signaling mechanisms in neuro-immune interactions under stress. *Adv. Neuroimmune Biol.*, 2012, Vol. 3, no. 3-4, pp. 235-241.
24. So A., Dumusc A., Nasi S. The role of IL-1 in gout: from bench to bedside. *Rheumatology (Oxford)*, 2018, Vol. 57, Suppl. 1, pp. i12-i19.
25. Tan Q., Hu J., Yu X., Guan W., Lu H., Yu Y., Zang G., Tang Z. The role of IL-1 family members and Kupffer cells in liver regeneration. *BioMed Res. Int.*, 2016, Vol. 2016, 6495793, 6 p. doi: 10.1155/2016/6495793.
26. Wang X., Fu S., Wang Y., Yu P., Hu J., Gu W., Xu X.M., Lu P. Interleukin-1beta mediates proliferation and differentiation of multipotent neural precursor cells through the activation of SAPK/JNK pathway. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2007, Vol. 36, no. 3, pp. 343-354.

Авторы:

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

Корнева Е.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

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

Korneva E.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Chief Research Associate, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 10.02.2019

Отправлена на доработку 05.03.2019

Принята к печати 28.05.2019

Received 10.02.2019

Revision received 05.03.2019

Accepted 28.05.2019

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОВЕЗИКУЛ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ НК-КЛЕТКАМИ

**Соколов Д.И.^{1,2}, Маркова К.Л.¹, Михайлова В.А.^{1,2}, Вязьмина Л.П.¹,
Милютина Ю.П.¹, Козырева А.Р.¹, Жданова А.А.¹, Малыгина Д.А.¹,
Онохин К.В.³, Иванова А.Н.⁴, Корневский А.В.¹, Сельков С.А.^{1,2}**

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

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

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

⁴ Ресурсный научный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий» ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Среди множества клеток, являющихся источниками микровезикул (МВ), особый интерес представляют естественные киллеры (НК-клетки) — субпопуляция лимфоцитов, осуществляющая контактный цитоллиз вирус-инфицированных и опухолевых клеток. Каждая из популяций НК-клеток обладает уникальным репертуаром рецепторов на своей поверхности, а, следовательно, и функциями. Функционирование НК-клеток регулируется широким диапазоном активирующих и ингибирующих рецепторов, которые экспрессируются на их поверхности. Экзоцитоз содержимого литических гранул при контакте с клеткой-мишенью — самый распространенный механизм цитоллиза мишени НК-клетками. В настоящее время имеются косвенные данные о способности НК-клеток продуцировать МВ с фенотипом CD56. В плазме периферической крови обнаружены МВ лейкоцитарного происхождения с различным фенотипом. Следует отметить, что до сих пор остаются неразрешенными вопросы о составе и функциях таких МВ. Целью настоящего исследования явилось изучение фенотипа, состава и функциональной активности микровезикул, образуемых естественными киллерами. Сравнительный анализ спонтанной экспрессии рецепторов при помощи проточной цитофлуориметрии показал, что МВ, как и клетки-источники (НК-клетки линии NK-92), обладают сходным профилем экспрессии молекул CD56 и CD16, но отличаются более выраженной экспрессией CD119 и CD11b и менее выраженной экспрессией CD18. Культивирование клеток линии NK-92 в присутствии индукторов (TNF α , IL-1 β , IFN γ , PMA) приводило к изменению фенотипа как самих клеток, так и МВ, образуемых ими. По данным проведенного Western Blot analysis в присутствии указанных индукторов

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Д.И. Соколов, К.Л. Маркова, В.А. Михайлова,
Л.П. Вязьмина, Ю.П. Милютина, А.Р. Козырева,
А.А. Жданова, Д.А. Малыгина, К.В. Онохин,
А.Н. Иванова, А.В. Корневский, С.А. Сельков
«Фенотипические и функциональные характеристики
микровезикул, продуцируемых НК-клетками»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4.
С. 669-688. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-669-688
© Соколов Д.И. и соавт., 2019

For citation:

D.I. Sokolov, K.L. Markova, V.A. Mikhailova, L.P. Vyazmina,
Yu.P. Milyutina, A.R. Kozyreva, A.A. Zhdanova,
D.A. Malygina, K.V. Onokhin, A.N. Ivanova, A.V. Korenevsky,
S.A. Selkov "Phenotypic and functional characteristics of
microvesicles produced by natural killer cells", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019,
Vol. 21, no. 4, pp. 669-688.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-669-688
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-669-688

также изменялось содержание перфорины и гранзима В (GrB) в составе МВ. Анализ цитотоксической активности клеток линии NK-92 в отношении клеток линии K562 показал, что МВ, полученные от активированных TNF α клеток линии NK-92, повышают цитотоксичность активированных TNF α клеток линии NK-92 по сравнению с уровнем их цитотоксичности в отношении клеток линии K562 без МВ, что совпадает с обнаруженным нами повышенным содержанием GrB в МВ, полученных от активированных TNF α клеток линии NK-92. Суммируя полученные данные, следует отметить, что в зависимости от типа индуктора NK-клетки линии NK-92 продуцируют микрочастицы, разные по фенотипу и составу. Изменение состава МВ может приводить к изменению их функциональной активности, в частности к усилению цитотоксической активности NK-клеток.

Ключевые слова: NK-клетки, микровезикулы, гранзим В, перфорин, цитотоксичность, цитокины

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF MICROVESICLES PRODUCED BY NATURAL KILLER CELLS

Sokolov D.I.^{a, b}, Markova K.L.^a, Mikhailova V.A.^{a, b}, Vyazmina L.P.^a, Milyutina Yu.P.^a, Kozyreva A.R.^a, Zhdanova A.A.^a, Malygina D.A.^a, Onokhin K.V.^c, Ivanova A.N.^d, Korenevsky A.V.^a, Selkov S.A.^{a, b}

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

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

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

^d Research and Resource Center for Development of Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Natural killer (NK) cells are of special interest among a multitude of microvesicle (MV) source cells. NK cells are a lymphocyte subpopulation performing contact cytotoxicity of virus-infected cells and tumor cells. Each of the NK cell populations has a unique receptor repertoire on its surface and, thus, unique functions. During their contact with a target cell, the most common mechanism of cytotoxicity is an exocytosis of lytic granules. However, some indirect evidence suggests that MV with CD56 phenotype and leukocyte-derived MV with various phenotypes are present in the peripheral blood plasma. This research is aimed to study the phenotype, composition and cytotoxic activity of microvesicles produced by NK cells. The analysis of receptor expression showed that MV, as well as source cells of the NK-92 cell line, had a similar CD56 molecule expression profile. The expression profile in MV differs from the same in source cells by higher CD119 and CD11b expression and by lower CD18 expression. Culturing of NK-92 cells in the presence of PMA, IL-1 β , TNF α , IFN γ resulted in alterations of cell phenotypes and MV. Immunoblots revealed a change of perforin and granzyme B (GrB) in MV. The analysis of the cytotoxic activity of NK-92 cells in a natural killer in vitro assay employing K562 target cells demonstrated that MV obtained from TNF α -activated cells of the NK-92 cell line increased the cytotoxicity of the same TNF α -activated NK-92 cells regarding cytotoxicity levels. This coincides with the previously revealed increased content of GrB in MV obtained from TNF α -activated cells of the NK-92 cell line. To sum up depending on the cytokine NK-92 cells produce MV that differ in their phenotype, composition and activity. Any changes in MV composition can result in changes in their functional activity: in particular, changes can increase the cytotoxic activity of NK cells of the NK-92 cell line. Thus, besides a well-known and proved way for GrB delivery to a target cell, we can suggest an additional way — the transportation of GrB within MV.

Keywords: NK cells, microvesicles, granzyme B, perforin, cytotoxic activity, cytokine

The research was supported by the Research and resource center for Molecular and Cell Technologies under St. Petersburg State University. All the authors have read the the journal's authorship agreement. The manuscript has been reviewed and approved by all the authors. All the authors have read the journal's policy on disclosure of potential conflicts of interest. The authors declare that they have no conflicts of interest.

The stages of the research supported by the Russian Science Foundation grant No. 17-15-01230: the evaluation of phenotypic characteristics of unstimulated NK cells of the NK-92 cell line and microvesicles produced by them, the granulometric analysis of microvesicles, the analysis of protein content in microvesicles, Western Blot analysis of unstimulated microvesicles produced by NK

cells, microvesicle sorting, transmission electron microscopy. The stages of the research supported by the Russian Foundation for Basic Research grant No. 17-04-00679: the cell culture, the evaluation of phenotypic characteristics of activated NK cells of the NK-92 cell line and microvesicles produced by them, atomic force microscopy, Western Blot analysis of microvesicles produced by activated NK cells, the assessment of cytotoxicity in cells of the NK-92 cell line and in microvesicles produced by them towards the K562 cell line. The work was partially carried out within the State Program No. AAAA-A19-119021290116-1 (financing of cell culture). The funders did not take any participation in the research design, data collection and analysis, publication or preparation of the manuscript.

Introduction

K cells are a lymphocyte subpopulation performing contact cytotoxicity of virus-infected cells and tumor cells. This subpopulation is the source of cytokines, stimulates other cells and participates in the immune response implementation [13, 52, 81]. As specific markers of human NK cell differentiation, CD56, KIR [76], and CD16 [38] have been identified. . Currently, literature data describe over 48 NK cell populations. However, only two populations are traditionally distinguished that differ in the ratio of CD56 and CD16 membrane molecules on their surfaces: CD56^{bright}/CD16^{dim/-} and CD56^{dim/low}/CD16^{bright} [12, 38, 66]. Each of the NK cell populations has a unique receptor repertoire on its surface and, thus, unique functions. During their contact with a target cell, the most common mechanism of cytotoxicity is an exocytosis of lytic granules [23, 31]. These granules include amines, proteoglycans, catecholamines, enzymes, and hormones, but the main components are perforin, granzyme and granulysin [31, 55, 61].

Perforin and GrB are proteins included in lytic granules also called "secretory lysosomes". These granules are localized in the NK cell cytoplasm, are covered with a bilayered membrane, contain enzymes typical for lysosomes, as well as perforin, granzymes, Fas ligand (FasL; CD178) [5], TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL; CD253) [42], granulysin, and small anti-microbial peptides [31]. These granules are divided into three types: type I granules (50-700 nm) are mostly filled with a dense core surrounded by a thin layer of vesicles, while type II granules (200-1000 nm) are characterized by multiple vesicles and membrane whorls. The intermediate granules have a dense core, although smaller than that in type I granules, and multiple vesicles that are not as abundant as those in type II granules [31, 46]. The exocytosis of lytic granules upon their contact with a target cell is the most common mechanism of target cell cytotoxicity by NK cells. Perforin is localized in secretory granules

in the inactivated state at pH < 5. Perforin subunits assemble into a membrane-attacking complex at pH = 7 in the presence of Ca²⁺ ions in the immunologic synapse zone between a cytotoxic lymphocyte and a target cell [72]. As a result, perforin creates pores in the target cell membrane [47, 55]. Granzymes and granulysins are injected into the target cell cytoplasm through the perforin pores. Granzyme initiates the apoptosis of the target cell. After the contents of natural killer granules get into the target cell, apoptosis and phosphatidylserine on the cell surface as a signal for phagocytes are induced [7, 31, 47]. Granzyme B (GrB) is a serine proteinase initiating the apoptosis in the target cell due to the activation of the mitochondrial pathway, the activation of effector caspases (the most common pathway for a mouse cell), or the splitting of intracellular substrates (ROCK1, α -tubulin, filamin, etc.) [22, 24, 61]. (Patho) physiological properties of GrB were also described: extracellular matrix breakdown (activity toward vitronectin, fibronectin, and laminin), participation in the proinflammatory reaction induction through IL-1 α breakdown [24], splitting of C3 and C5 components of a complement [49], and modulation of coagulation processes due to the effect of the von Willebrand factor on the expression [24]. GrB can be stimulated by IL-1 β , IL-18, TNF α , IFN α , IFN γ , PMA, and LPS. The irreversible interaction between GrB and PI-9, a proteinase inhibitor, forms a stable inactive serpin-proteinase complex [55]. Thus, just like perforin, GrB in NK cells is located only within secretory granules comparable to MV by their sizes (50-1000 nm) and cannot be located in the cytoplasm as an active enzyme.

Cell-derived microvesicles (MV) are a relatively new object of research that represents vesicular fragments of a plasma membrane 100 (150)-1000 nm in diameter, while exosomes are less than 100 (150) nm in size [20, 21, 69, 70]. It was demonstrated that MV are produced by cells both in an unstimulated state and as a result of activation; both at physiological processes and at pathologies [43, 44, 48, 54, 57, 64, 69]. It has been established that MV contain both membrane molecules expressed by a source cell and cytoplasmic molecules: lipids, class I and II MHC molecules, chemokines, cytokines, growth factors, transcription factors, microRNA [8, 14, 21, 63], and messenger RNA [1, 68, 75]. It was demonstrated that MV participate in the regulation of target cell function. Moreover, they are involved in clotting [64, 69], inflammatory [2, 67], immune response [63], neogenesis [8, 32, 45], and carcinogenesis [3, 11, 50] processes. Among numerous cells being the source of MV, leukocytes are of particular interest due to the diversity of their receptor and effector functions. With our study, we provide the evidence of the capacity of NK cells to produce MV. However, some indirect

evidence suggests that MV with CD56 phenotype [40] and leukocyte-derived MV with various phenotypes are present in the peripheral blood plasma [9, 33, 40, 41]. This research is aimed to study the phenotype, composition and functional activity of MV produced by NK cells.

Materials and methods

Cells

NK cells of the NK-92 cell line (ATCC, USA) obtained from large granular lymphocytes of the peripheral blood of a 50-year-old man with a galloping non-Hodgkin's lymphoma were the object of this research [19]. Cells of the NK-92 cell line display the main phenotype and functional characteristics of activated NK cells [19, 28]. To culture them, we used the complete cell culture medium based on the α -modification of the Eagle's minimal essential medium (α -MEME) containing 12.5% inactivated fetal calf serum (FCS), 12.5% inactivated donor horse serum, depleted of MV, 0.2 mM myoinositol, 0.02 mM folic acid, 2 mM L-glutamine, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 10 mM HEPES buffer solution, 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA), and 500 U/ml recombinant IL-2 (Roncoleukinum, Biotech LLC,

Russia). Cells of the NK-92 cell line are a suspension cell culture requiring the subcultivation once every 2 days. The cells were cultured in humid environment at 37°C, and 5% CO₂. Cells of the K-562 cell line were cultured in RPMI 1640, the complete cell culture medium containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 10 mM HEPES buffer solution (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA). Cells of the K562 cell line are a suspension cell culture requiring the subcultivation once every 3 days. The cells were cultured in humid environment at 37°C, and 5% CO₂. Using the trypan blue solution, the cell vitality was evaluated. It was not less than 96%.

Cytokines and inducers

TNF α (10 U/ml, 50 U/ml, 400 U/ml), IFN γ (40 U/ml, 400 U/ml, 1000 U/ml), IL-1 β (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml), and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) (10 ng/ml) were used as inducers. Culturing in the complete cell culture medium without inducers served as controls.

Phenotypic characteristics of NK cells of the NK-92 cell line including microvesicles

NK cells phenotype was evaluated after culturing cells in presence of inducers in humid environment

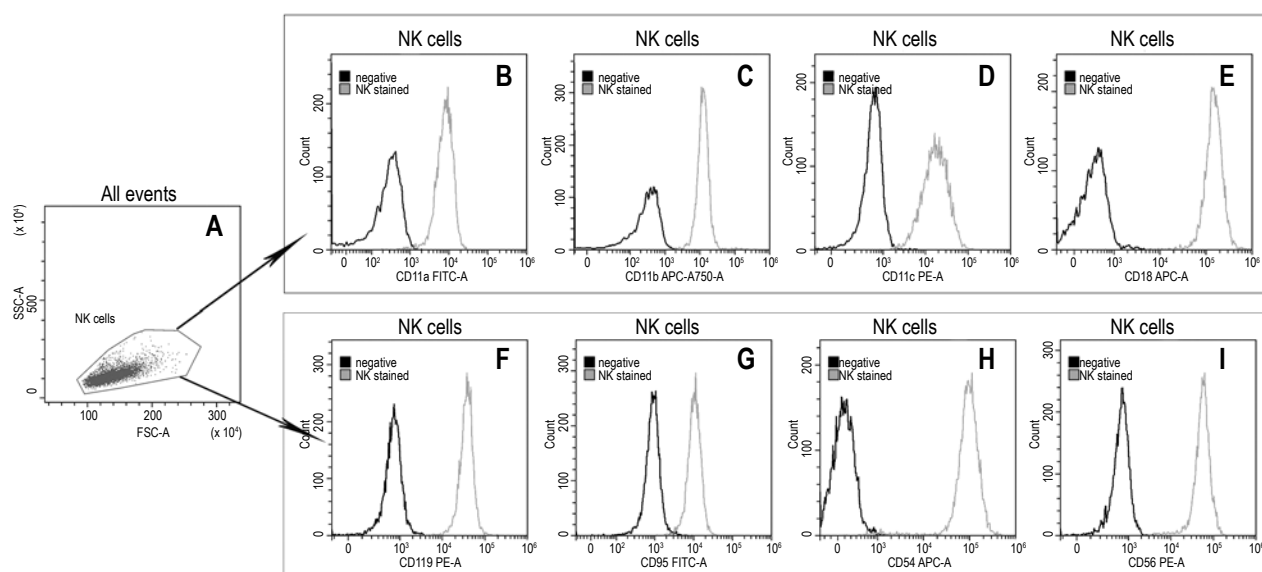


Figure 1. Distribution graphs for NK cells of the NK-92 cell line, unstained and stained with antibodies to CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD119, CD95, CD54, CD56, receptors

Note. For all graphs: isotype controls (BD, USA) were used as negative controls; stained NK cells are NK cells treated with antibodies.

A) Distribution diagram for NK cells of the NK-92 cell line in FSC – SSC coordinates; B) Distribution histogram for NK cells of the NK-92 cell line by the CD11a receptor expression; C) Distribution histogram for NK cells of the NK-92 cell line by the CD11b receptor expression; D) Distribution histogram for NK cells of the NK-92 cell line by the CD11c receptor expression; E) Distribution histogram for NK cells of the NK-92 cell line by the CD18 receptor expression; F) Distribution histogram for NK cells of the NK-92 cell line by the CD119 receptor expression; G) Distribution histogram for NK cells of the NK-92 cell line by the CD95 receptor expression; H) Distribution histogram for NK cells of the NK-92 cell line by the CD54 receptor expression; I) Distribution histogram for NK cells of the NK-92 cell line by the CD56 receptor expression. The compensation matrices were adjusted using BD CompBeads and procedure recommended by the manufacturer of the Cytoflex flow cytometer (Beckman Coulter). The experiment was repeated twice, using triplicates.

at 37 °C and 5% CO₂ for 24 hours as we described before [39]. There is no single standard for the isolation and characterization of MV, so various methodological approaches are currently used. They allow obtaining microparticle fractions that differ in their purity degree and enrichment level [74]. To isolate MV, we used the differential centrifugation method [58, 60] using Hanks' solution without Ca²⁺ and Mg²⁺ (Sigma-Aldrich Chem Co., USA). The obtained supernatants were consecutively centrifuged as we described before [39]. After the second centrifugation, the pellet was washed twice with PBS and centrifuged again at 20 000 g 10° C for 20 minutes. The supernatant was then discarded and the pellet was resuspended in Hank's solution without Ca²⁺ and Mg²⁺ similarly to the method we described before [29]. This procedure allows separating MV from coarse particles of cellular debris and large apoptotic bodies, as well as from exosomes [15, 30]. After that, the obtained cells of the NK-92 cell line and their MV were treated with monoclonal antibodies to CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD119, CD54, CD95, CD56 (BD, USA) in accordance with the instructions of the manufacturer.

We analyzed the intensity of expression of phenotypic marker CD56 by NK cells, as well as the intensity of expression of leukocyte adhesion molecules CD11a, CD11b, CD11c, CD18 typical for all leukocytes. These adhesion molecules can participate in the formation of the immunologic synapse. To evaluate the expression, we chose CD119 and CD95 receptors, and adhesion molecule CD54 as markers of intercellular communication and activation. Isotype controls (BD, USA) were used as negative controls. The receptor expression was assessed using a Cytotflex flow cytometer (Beckman Coulter, USA) as shown before [39]. Working with MV, we filtered all solutions through filters with 0.2 µm pore diameter (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) [70]. The information on the gating strategy for the cells and MV produced by them are specified in Figure 1 and Figure 2. The experiments were repeated twice, using triplicates for each cytokine and control.

Granulometric analysis of microvesicles

The granulometric analysis of microvesicles produced by NK cells of the NK-92 cell line was carried out by the dynamic light scattering method

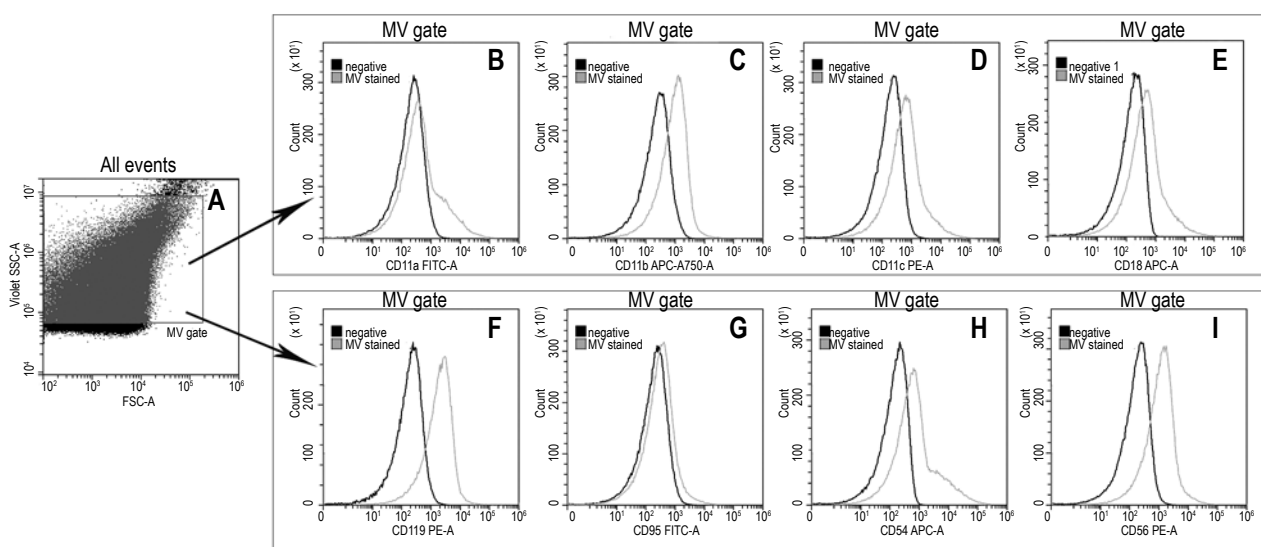


Figure 2. Distribution graphs for microvesicles of NK Cells of the NK-92 cell line, unstained and stained with antibodies to CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD119, CD95, CD54, CD56, receptors

Note. For all graphs: isotype controls (BD, USA) were used as negative controls; negative control (microvesicles untreated with antibodies); stained MV are microvesicles treated with antibodies. A) Distribution diagram for microvesicles produced by NK cells of the NK-92 cell line in FSC – Violet SSC coordinates. The parameter of lateral light scattering (SSC) was detected using 405 nm laser radiation in order to facilitate the determination of small particle sizes; B) Distribution histogram for microvesicles produced by NK cells of the NK-92 cell line by the CD11a receptor expression; C) Distribution histogram for microvesicles produced by NK cells of the NK-92 cell line by the CD11b receptor expression; D) Distribution histogram for microvesicles produced by NK cells of the NK-92 cell line by the CD11c receptor expression; E) Distribution histogram for microvesicles produced by NK cells of the NK-92 cell line by the CD18 receptor expression; F) Distribution histogram for microvesicles produced by NK cells of the NK-92 cell line by the CD119 receptor expression; G) Distribution histogram for microvesicles produced by NK cells of the NK-92 cell line by the CD95 receptor expression; H) Distribution histogram for microvesicles produced by NK cells of the NK-92 cell line by the CD54 receptor expression; I) Distribution histogram for microvesicles produced by NK cells of the NK-92 cell line by the CD56 receptor expression. The compensation matrices were adjusted using BD CompBeads and standard protocol recommended by the manufacturer of the Cytotflex flow cytometer (Beckman Coulter). The experiment was repeated twice, using triplicates.

using Zetasizer NanoZS, the laser correlation spectrometer (Malvern Instruments, UK). MV were isolated as described above.

Atomic force microscopy of microvesicles

Morphometric analysis of MV produced by the NK-92 cell line was carried out by atomic force microscopy method. The suspension of isolated MV in Hanks' solution without Ca^{2+} and Mg^{2+} was spread on grease-free cover glasses covered with polylysine (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) with addition of an equal volume of 10% formalin and dried at 37 °C. Next, the samples were rinsed in distilled water and dried at room temperature. The Integra Aura scanning probe microscope (NT-MDT, Russia) was used to scan the surface of samples in tapping mode in air. The scanning was performed with NSG01-A proximity silicon high-resolution probes (NT-MDT, Russia) with hardness of 5.1 N/m and an average resonating frequency of 150 kHz. The images were processed using Nova software (NT-MDT, Russia).

Transmission electron microscopy (TEM)

10 µl portions of suspension of MV of the NK-92 cell line in Hanks' solution without Ca^{2+} and Mg^{2+} obtained by means of centrifugation at 20 000 g were mixed with 5% glutaraldehyde of an equal volume. 300 mesh copper grids (Electron Microscopy Sciences, USA) with a formvar carbon-shadowed coating were superimposed on the resulting drop and incubated for 5 minutes. The grids were then washed by transferring them to the surface of deionized water drops. After that, the samples were contrasted for 1 minute in the 2% uranium acetate solution. The excess of the contrastor was removed with blotting paper. The images were registered with the Jeol JEM-1400 transmission electron microscope (Japan) at an accelerating voltage of 90 kV and a beam current of 50 mA using the Olympus Veleta side camera (Japan) with a 100 000–250 000× zoom.

Analysis of protein content in microvesicles

The analysis of protein content in microvesicles was conducted through Bradford protein assay using the Qubit fluorometer (Life technologies, USA) [6].

Western Blot analysis

The cells of the NK-92 cell line were cultured in flasks in the complete cell culture medium at a concentration of 400 000 c/ml at 37 °C in the humid environment with 5% CO_2 for 24 hours in the presence of inducers (50 U/ml $\text{TNF}\alpha$, 400 U/ml $\text{IFN}\gamma$, 100 ng/ml $\text{IL-1}\beta$, 10 ng/ml PMA). Culturing in the complete cell culture medium without inducers served as controls. After 24 hours, the cell suspension was centrifuged at 200 g, 22 °C for 10 minutes and washed twice with PBS (pH = 7.4). MV were obtained from supernatant by method specified above and washed twice with cold PBS solution at 20,000g. The obtained cells and MV were lysed in the RIPA buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1%

Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, and 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA)) with addition of Complete protease inhibitor mixture (Roche Diagnostic GmbH, Germany) for 30 minutes with intermittent shaking. The cell lysates were centrifuged at 16 000 g for 10 minutes. Supernatants were stored at -80 °C before the assay. The cell lysate samples with equal protein content were divided using electrophoresis in 10% polyacrylamide gel under denaturing conditions by Laemmli method and were transferred onto PVDF membranes (BioRad, USA). The membranes were blocked with 2% albumin solution (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) in TBST solution (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0.1% Tween20), and then incubated with primary monoclonal antibodies to granzyme B (GrB) (Purified anti-Granzyme B, mouse Ab, 1:1000, Biolegend, USA) or to perforin (Anti-Human Perforin Purified, mouse Ab, 1:1000, eBioscience Inc., CA) at 4 °C for one night in a shaker. Actin (β -actin rabbit Ab, 1:1000, Cell Signaling Technology, USA) was used as a load control. After the reaction with corresponding HRP conjugated secondary antibodies (1:1000, Cell Signaling Technology, USA), the signals were visualized by the enhanced chemiluminescence method (ECL, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The intensity of bands obtained by Western blotting method was determined using the ImageLab software. The data obtained on cell lysates were normalized using β -actin. When studying MV, the samples containing equal volume of total protein were also approved for analysis. All experiments were independently carried out five times. The experimental data were represented as $M \pm m$ ratios between the induced samples and corresponding controls.

Sorting

Microvesicles were sorted using a flow cytometer sorter BD FACS Aria III (BD, USA). The sensitivity of the sorter was increased due to a 405 nm laser and 450/10 filter for the side scatter analysis [70] in compliance with the manufacturer's recommendations (BD, USA). The unit was adjusted as described above using standard gauge particles of 200 nm and 1000 nm in size (Invitrogen, USA) in accordance with the instructions of the unit manufacturer (BD, USA). To start working with MV, all the solutions were filtered through filters with 0.2 µm pore diameter (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA). The information on the unit adjustment with gauge particles is specified in Figure 3. Microvesicles obtained from the cells of the NK-92 cell line by the differential centrifugation method described above were treated with antibodies to CD119 and CD11b marked with PE (BD, USA). Positively stained microvesicles were sorted in the Purity protocol (70 µm nozzle) with the aim of subsequent analysis of the granzyme B (GrB) concentration in the pool of microvesicles expressing

the stated receptors by Western blotting method. Isotype controls (BD, USA) were used as negative controls.

Assessment of cytotoxicity in cells of the NK-92 cell line and microvesicles produced by them in towards cells of the K562 cell line

Cells of the NK-92 cell line were cultured in 75 cm² flasks (BD Falcon, USA) in a volume of 40 ml. The cell concentration was 4×10^5 per 1 ml. We added IL-1 β at a concentration of 1000 U/ml or TNF α at a concentration of 400 U/ml to some flasks with cells of the NK-92 cell line and incubated them for 22 hours at 37 °C and 5% CO₂. Then, both activated and non-activated cells of the NK-92 cell line were centrifuged at 200 g 22 °C for 10 minutes at 22 °C in order to separate the cells from the medium containing MV. After that, the cells were washed with Hanks' solution. As the result, we obtained a sediment containing the cells and supernatant containing MV. MV were obtained from this supernatant by the abovementioned method. We resuspended the sediment containing

MV in 700 mcl of cold α -MEME and measured the protein concentration.

To analyze the cytotoxic activity, the sediment containing cells of the NK-92 cell line, which was obtained after the first centrifugation at 200 g, was washed twice with Hank's solution and resuspended in α -MEME containing 10% FCS, 0.2 mM myoinositol, 0.02 mM folic acid, 2 mM L-glutamine, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 10 mM HEPES buffer solution, and 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA). Cells of the K562 cell line were stained with CFSE green fluorescent dye (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) as described earlier [78]. The dyed cells of the K562 cell line were added at a concentration of 3×10^4 in 25 mcl per one well of a round-bottom 96-well plate (BD, USA). Some wells containing the cells of the K562 cell line were supplemented with cells of the NK-92 cell line at a concentration of 3×10^5 cells in 25 mcl per one well of a round-bottom 96-well plate. Some wells with cells of both NK-92 and K562 cell lines were supplemented with prepared microvesicles so that the total protein

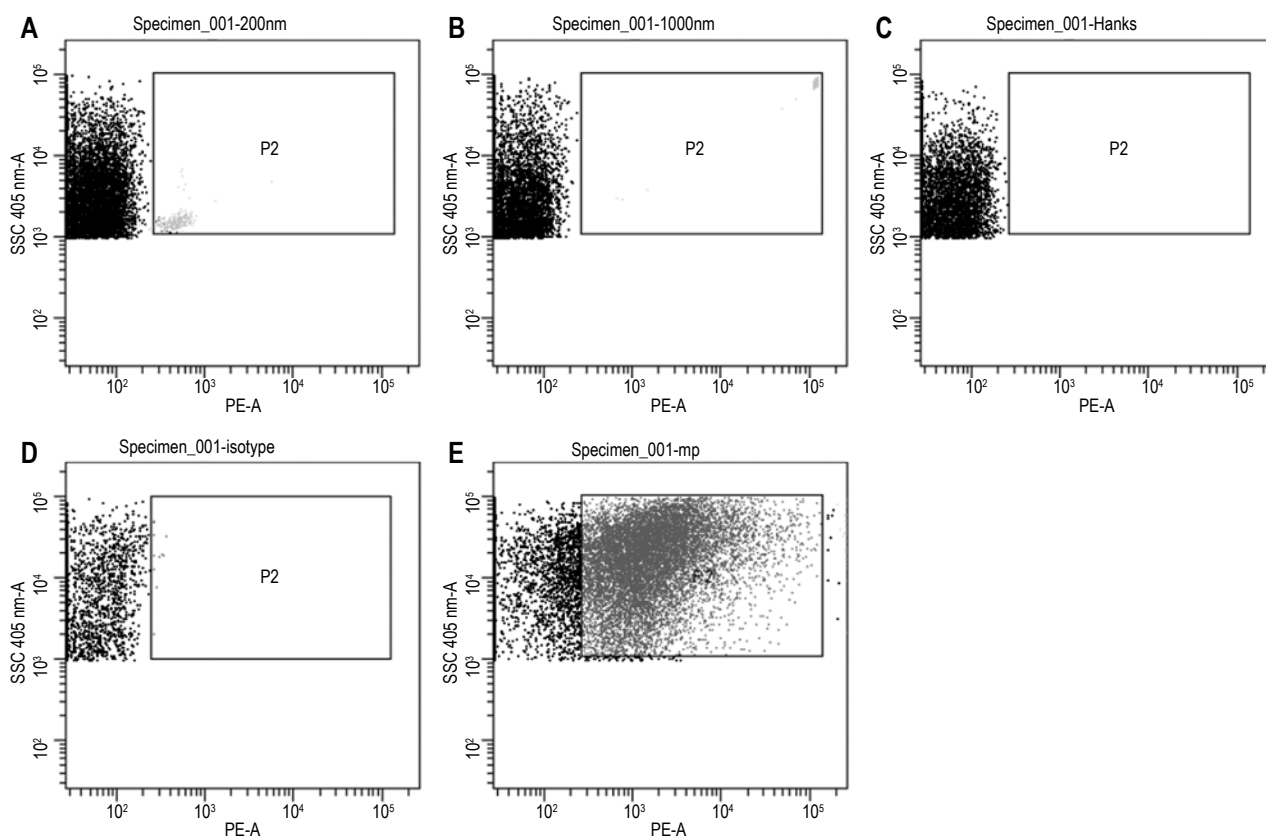


Figure 3. Distribution graphs for gauge particles and microvesicles produced by cells of the NK-92 cell line with the use of the BD FACS Aria III Flow cytometer sorter (BD, USA)

Note. The parameter of lateral light scattering (SSC) was detected using 405 nm laser radiation in order to facilitate the determination of small particle sizes. A) Distribution graph for gauge particles 200 nm in size (PE – SSC); B) Distribution graph for gauge particles 1000 nm in size (PE – SSC); C) Hanks' solution; D) Distribution graph for microvesicles produced by cells of the NK-92 cell line treated with isotype control antibodies (PE – SSC); E) Distribution graph for microvesicles produced by cells of the NK-92 cell line treated with antibodies to CD119 and CD11b, PE-marked, in PE – SSC coordinates.

concentration in them amounted to 400 µg/ml, 200 µg/ml, and 100 µg/ml. Cells of the K562 cell line served as controls (constitutive death). Then, the cells were cultured for 22 hours at 37 °C and 5% CO₂. After that, the cell suspension was treated with Propidium iodide (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) and antibodies to CD45 (FITC) (BD, USA). The level of the K562 cell line death was assessed using the FACS Canto II flow cytometer (BD, USA) by Propidium iodide inclusion, as described above [10, 73, 78]. The experiments were repeated three times with six wells per each combination of cells and MV (n = 3).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica 10 software (Russia). We tested the data distribution for normality using the Shapiro-Wilk's test and then the parametric Student's t-test. The differences under $p < 0.05$ were considered to be significant. For the Western Blot analysis, we conducted a paired comparison of band intensity values in constitutive culture and in the presence of an inducer that were obtained from each sedimentation using the Wilcoxon method.

Results

Granulometric analysis

The granulometric analysis showed that sizes of MV produced by NK cells of the NK-92 cell line lay in the range of 192–458 nm. The peak of MV quantity distribution fell at 297 nm that was in accordance with our previously published data [29]. The analysis of particles in the supernatant obtained after MV sedimentation at 20 000g demonstrated that their sizes lay in the range of 20–184 nm. The peak of the distribution of particle quantity fell at 37 nm that also corresponds to our previously published data [29].

Atomic force microscopy of microvesicles produced by the NK-92 cell line

The population of spherical objects with the height of 39–588 nm and with the mode in the area of 314 nm (Figure 4) was determined on the surface relief and its height distribution histogram within a 10 × 10 µm visual field. The height of the major population of microvesicles lay in the range of 196–392 nm. The sample containing only the Hanks' solution without Ca²⁺ was used as a control. The average size of particles in the control sample was about 22 nm with the mode in the area of 8 nm. Atomic force microscopy was done using MV only from intact cells.

Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) of the MV sediment fraction obtained after centrifugation at 20 000 g allowed to reveal the spherical objects 150–500 nm in diameter (Figure 5), which corresponds to the data obtained by other methods described in the article. TEM was done using MV only from intact cells.

Analysis of protein content in microvesicles and in cells in separate experiments with different inducers

In the experiment with PMA as an inducer, the total protein content in unstimulated cells of the NK-92 cell line (constitutive level) amounted to 60.2±6.1 ng/10³ cells. In the presence of PMA, this content amounted to 91.3±40.0 ng/10³ cells. At that, the total protein content in MV obtained from unstimulated cells of the NK-92 cell line (constitutive level) amounted to 2.5±0.3 ng per 10³ source cells, while in the presence of PMA, this content amounted to 5.0±0.7 ng per 10³ source cells.

In the experiment with TNFα as an inducer, the total protein content in unstimulated cells of the NK-92 cell line (constitutive level) amounted to 94.0± 0.9 ng per 10³ cells. In the presence of TNFα, this content amounted to 191.0±18.1 ng/10³ cells. At that, the total protein content in MV obtained from unstimulated cells of the NK-92 cell line (constitutive level) amounted to 5.0±0.8 ng per 10³ cells, while in the presence of TNFα, this content amounted to 19.6±3.7 ng per 10³ cells.

In the experiment with IL-1β as an inducer, the total protein content in unstimulated cells of the NK-92 cell line (constitutive level) amounted to 61.2±6.3 per 10³ cells. In the presence of IL-1β, this content amounted to 66.3± 6.0 ng/10³ cells. At that, the total protein content in MV obtained from unstimulated cells of the NK-92 cell line (constitutive level) amounted to 4.6±0.6 ng per 10³ cells, and with IL-1β it amounted to 2.6± 0.4 ng per 10³ cells.

Phenotypic characteristics of NK cells of the NK-92 cell line including microvesicles

Almost all NK cells in the NK-92 cell line (96–99%) expressed CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD119, CD54, CD95, CD56 on their surface. The activation of the NK-92 cell line by specific cytokines at different concentrations resulted in a change in the expression of only certain molecules (Figure 6). Thus, the introduction of TNFα resulted in dose-dependent increase in the CD54 and CD95 expression level. The incubation of the NK-92 cell line in the presence of different IL-1β concentrations increased the CD54 and CD95 expression level. However, IL-1β at a concentration of 1000 U/ml decreased the CD18 expression level. The incubation of the NK-92 cell line in the presence of IFNγ decreased the CD11b expression level. The incubation of the NK-92 cell line in the presence of PMA increased the CD11c, CD54, CD95, and CD119 expression level, but decreased the CD56 expression level.

The relative number of MV produced by NK cells of the NK-92 cell line and expressing the analyzed receptors was significantly lower compared to the number of source cells: only 2% of MV expressed CD95 molecule; only 10–20% of MV expressed CD11a, CD11c, and CD18 molecules; only 20–39%

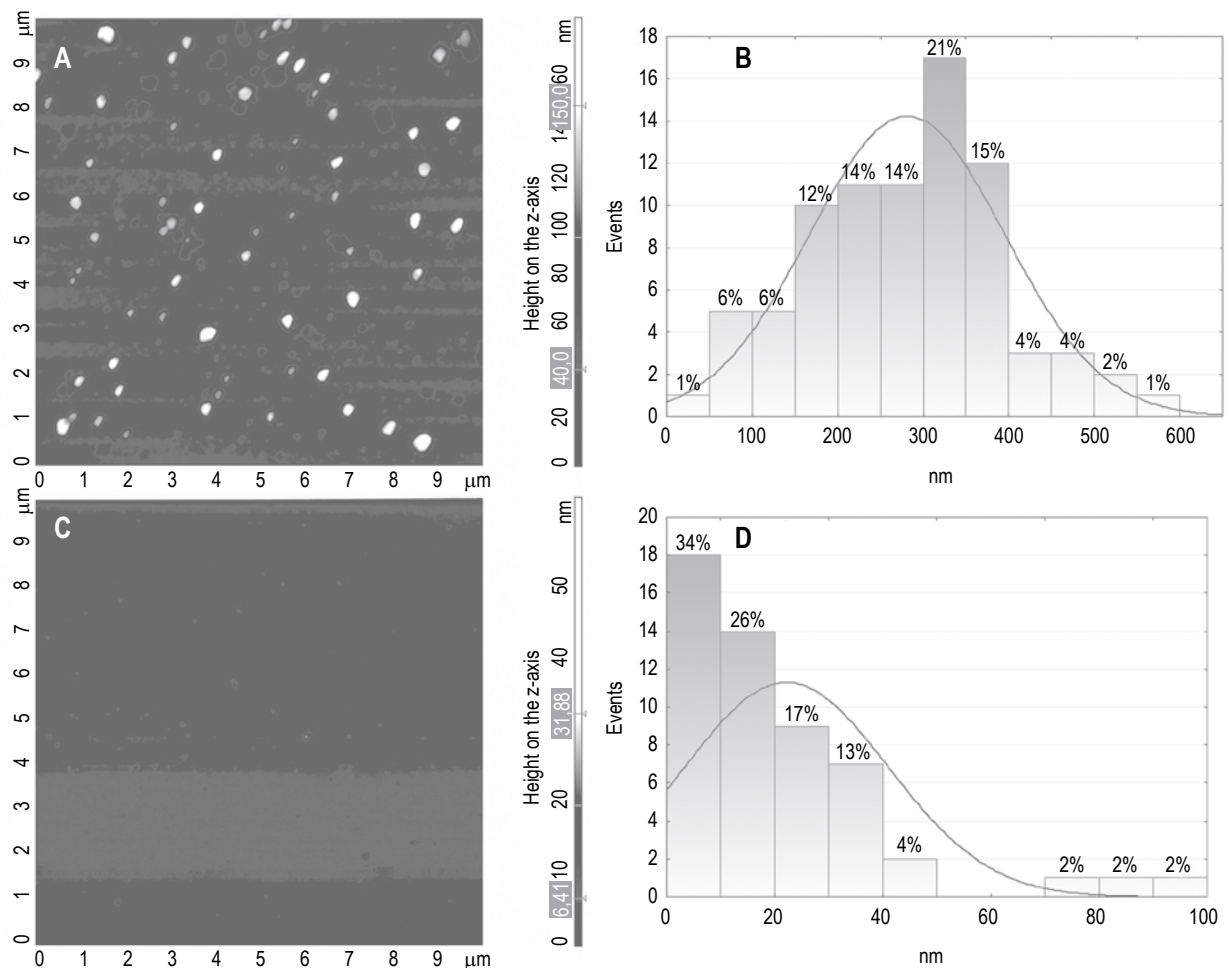


Figure 4. Atomic force microscopy of samples of MV produced by NK-92 cells (n = 5)

Note. Visualization of MV (A) and height distribution histogram (B) within a 10 × 10 μm field of a sample of MV produced by NK-92 cells. Image of a control sample in Hanks' solution (C) and respective height distribution histogram (D).

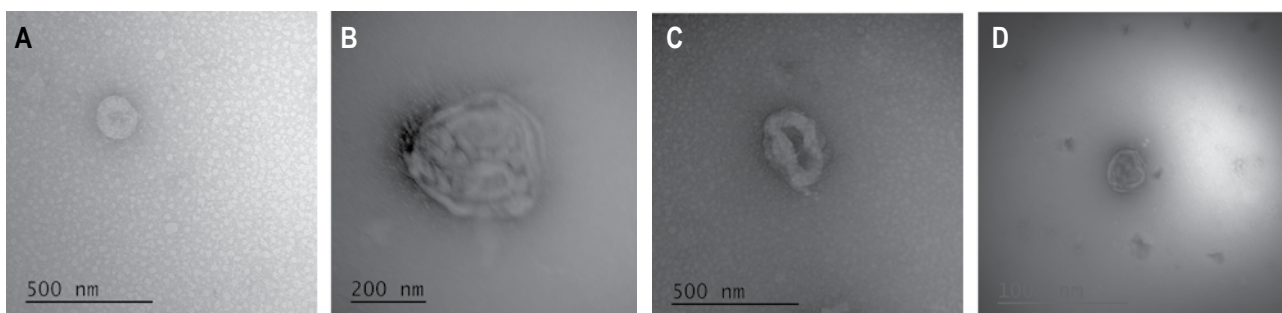


Figure 5. Transmission electron microscopy (TEM) of MV produced by NK-92 cells

of MV expressed CD11b, CD119, CD54, and CD56 molecules. The intensity of the analyzed receptor expression by MV was also lower than the intensity of the expression on the surface of source cells (Supplementary data Figure 6). The activation of the NK-92 cell line by specific cytokines resulted in a change in the expression of only certain molecules by MV produced by the cells of the NK-92 cell line (Supplementary data Figure 7). With that, the

activation of cells of the NK-92 cell line by cytokines had no effect on the relative quantity of MV expressing the analyzed receptors. The comparative profile of the constitutive intensity of the surface molecule expression on both cells of the NK-92 cell line and the MV produced by them is given in the Figure 3. The Figure shows that MV, as well as source cells, have a similar profile of CD56 molecule expression. However, the expression profile in MV differs from

the same in source cells by higher CD119 and CD11b expression and by lower CD18 expression.

Western Blot analysis

Figure 9 shows the change in levels of GrB and perforin in lysates of cells of the NK-92 cell line in the presence of different inducers. For MV content

analysis by Western blot method, we used the inducers, which showed the prominent influence on MV phenotype (PMA, TNF α и IL-1 β). It has been established that when cultured in the presence of PMA, the expression of GrB and perforin in NK cells of the NK-92 cell line increases (1.97-fold

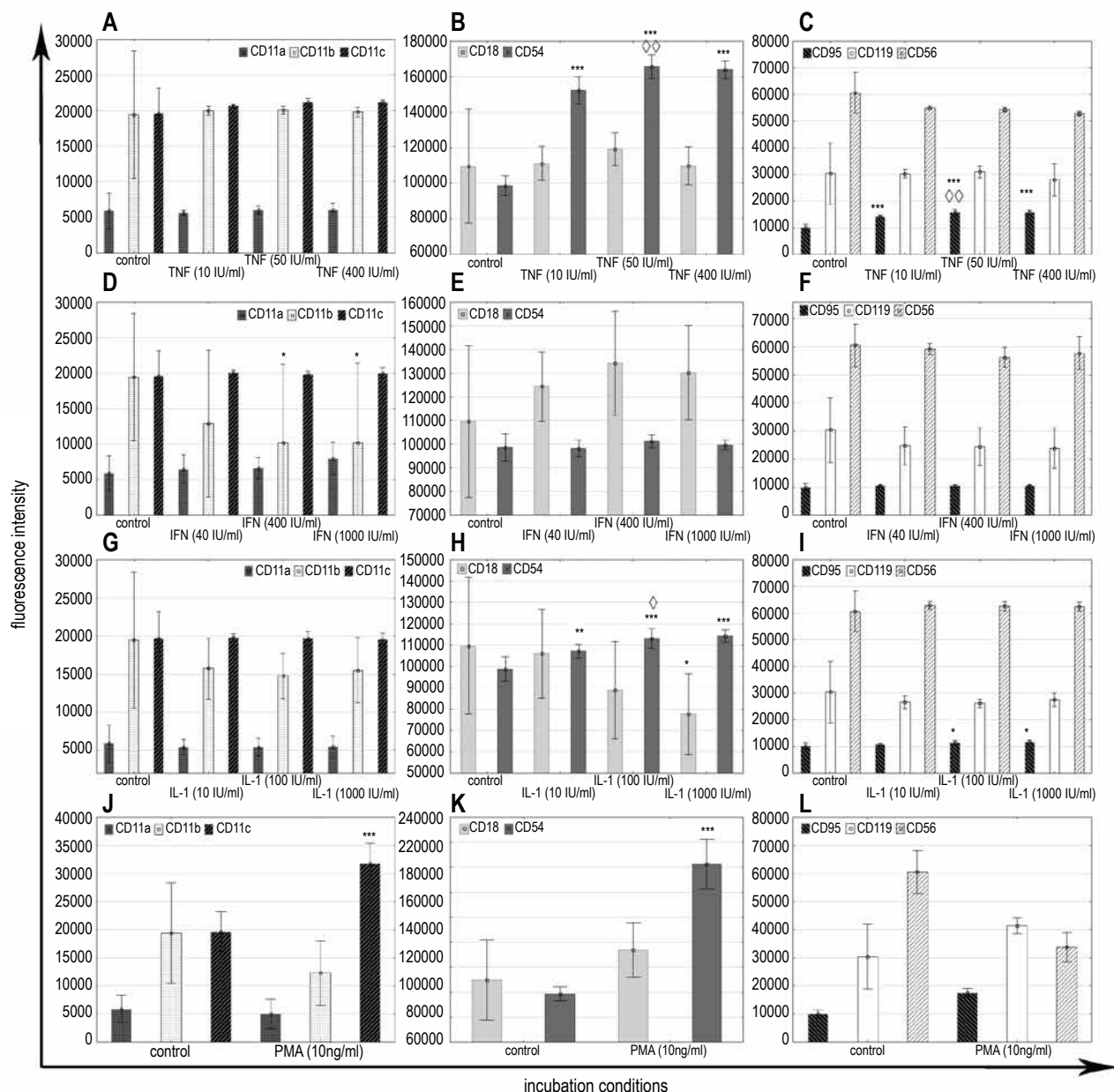


Figure 6. Intensity of surface receptor expression by NK cells of the NK-92 cell line, unstained and stained with antibodies to CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD119, CD95, CD54, CD56 receptors

Note. The data are presented as Mean $\pm$ SD. For all graphs: unstimulated cells – the basic level of surface receptor expression by NK cells; TNF (10 IU/ml; 50 IU/ml; 400 IU/ml) – the level of surface receptor expression by NK cells in the presence of TNF α as an inducer at an appropriate concentration; IFN (40 IU/ml; 400 IU/ml; 1000 IU/ml) – the level of surface receptor expression by NK cells in the presence of IFN γ as an inducer at an appropriate concentration; IL-1 (10 IU/ml; 100 IU/ml; 1000 IU/ml) – the level of surface receptor expression by NK cells in the presence of IL-1 β as an inducer at an appropriate concentration; PMA (10 ng/ml) – the level of surface receptor expression by NK cells in the presence of PMA as an inducer at an appropriate concentration. The significance of differences: the expression of surface receptors by cells in all groups differs from the constitutive expression ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$. The expression of surface receptors in the presence of cytokines differs from that one in the presence of the same cytokines at a lower concentration ◇◇, $p < 0.01$; ◇, $p < 0.05$.

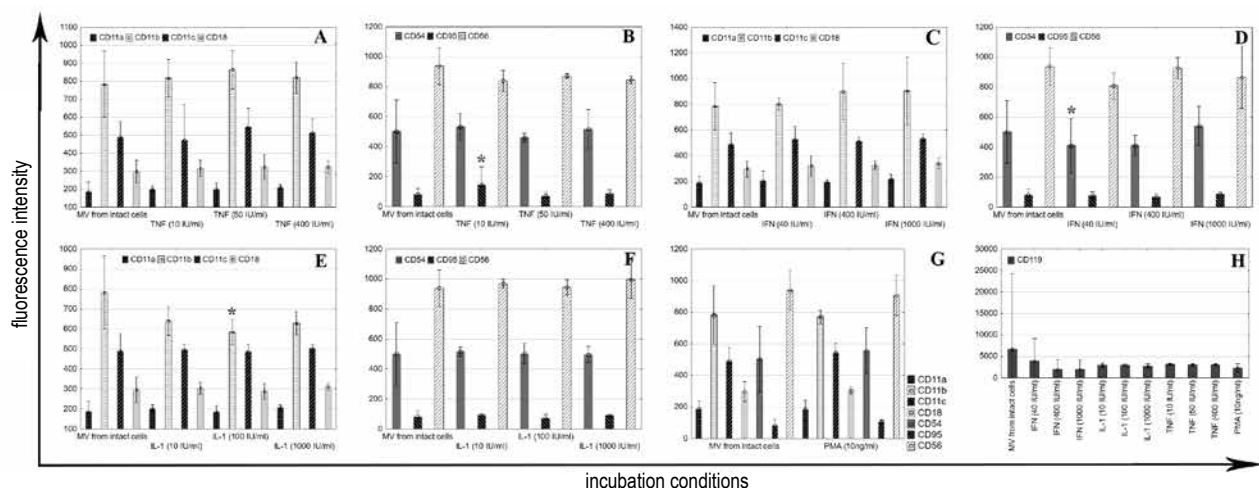


Figure 7. Intensity of surface receptor expression on microvesicles produced by NK cells, unstained and stained with antibodies to CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD119, CD95, CD54, CD56 receptors

Note. The data are presented as Mean $\pm$ SD. For all graphs: MV obtained from unstimulated cells – the basic level of surface receptor expression on MV produced by NK cells; TNF (10 IU/ml; 50 IU/ml; 400 IU/ml) – the level of surface receptor expression on MV produced by NK cells in the presence of TNF α as an inducer at an appropriate concentration; IFN (40 IU/ml; 400 IU/ml; 1000 IU/ml) – the level of surface receptor expression on MV produced by NK cells in the presence of IFN γ as an inducer at an appropriate concentration; IL-1 (10 IU/ml; 100 IU/ml; 1000 IU/ml) – the level of surface receptor expression on MV produced by NK cells in the presence of IL-1 β as an inducer at an appropriate concentration; PMA (10 ng/ml) – the level of surface receptor expression on MV produced by NK cells in the presence of PMA as an inducer at an appropriate concentration. The significance of differences: the expression of surface receptors by cells in all groups differs from the constitutive expression *, $p < 0.05$.

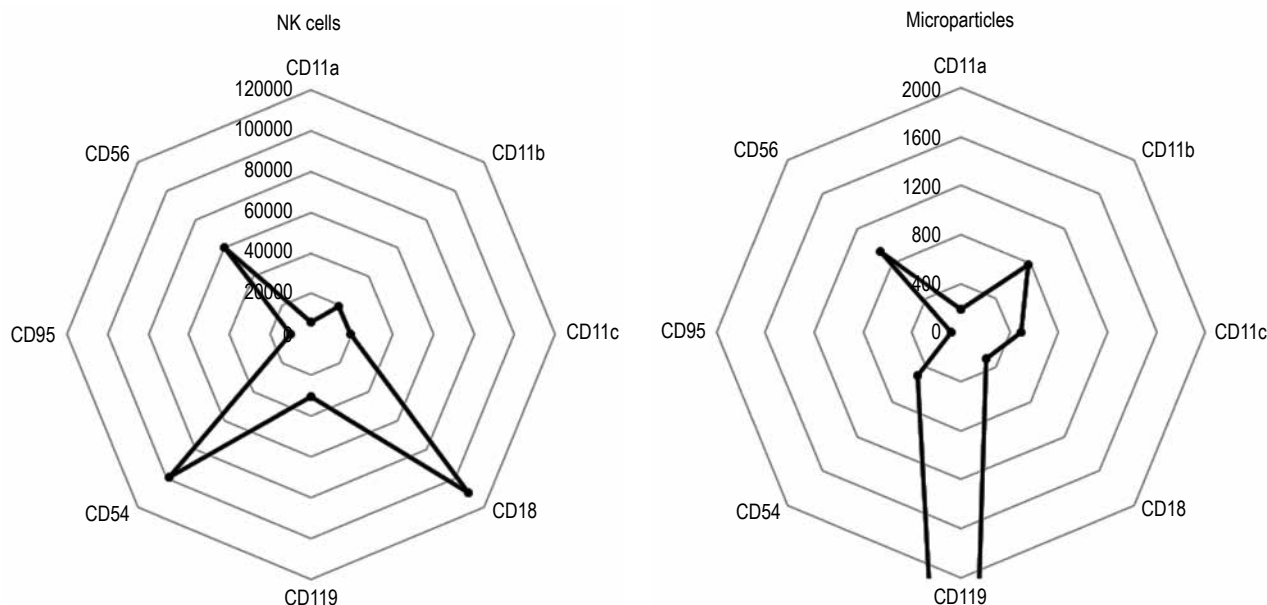


Figure 8. Comparative profile of the constitutive intensity of the surface molecule expression in cells of the NK-92 cell line and in microvesicles produced by them

and 9.7-fold, correspondingly) compared to their constitutive expression level. In addition, the pairwise comparison revealed that the expression of GrB increased (1.53-fold), and the expression of perforin decreased (1.23-fold), when NK cells were cultured in the presence of IL-1 β . When TNF α was added to the culture of NK cells of the NK-92 cell line, no

significant changes in the expression of GrB and perforin were revealed.

Figure 9 shows the change in the expression of GrB and perforin in MV obtained from NK cells of the NK-92 cell line cultured in the presence of various inducers. It has been established that when cultured in the presence of TNF α , the expression

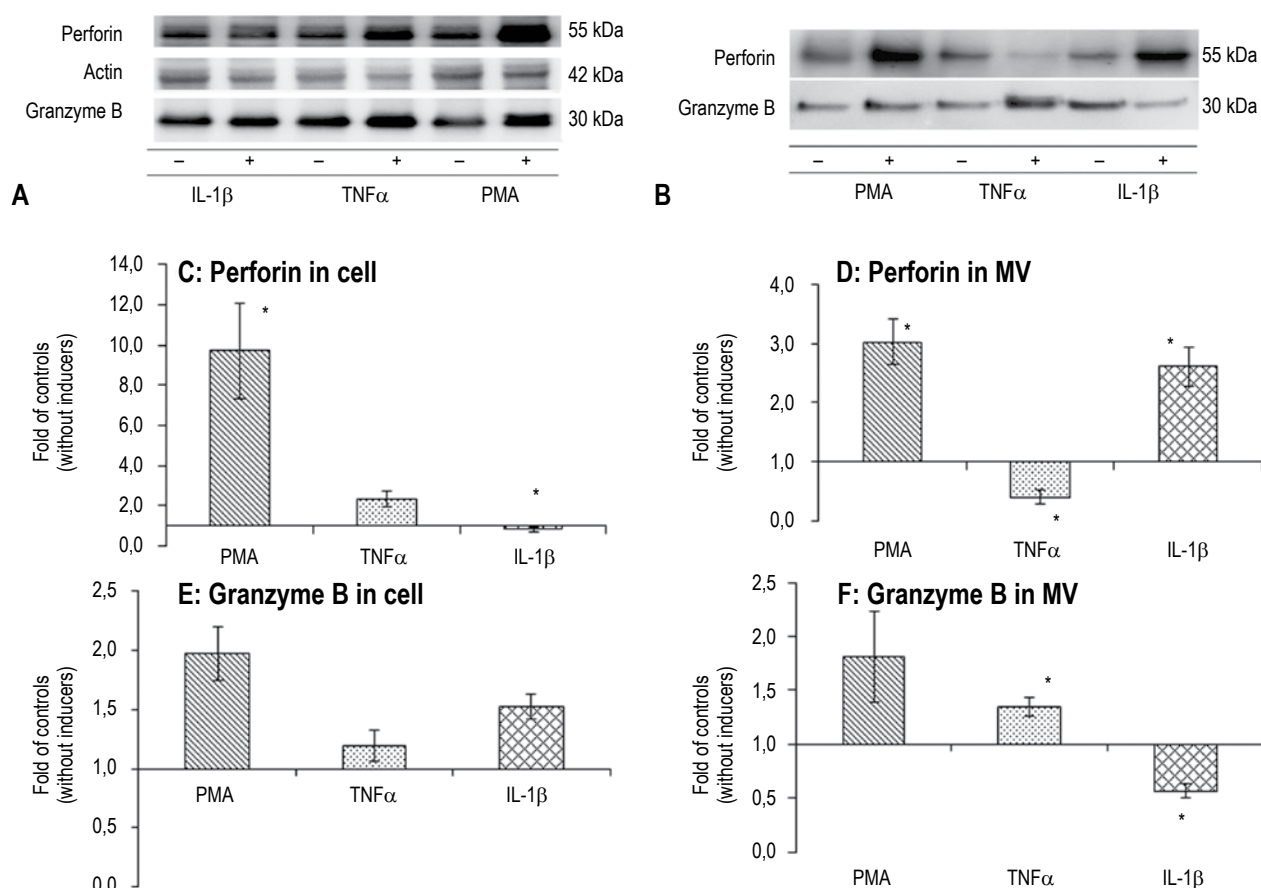


Figure 9. Analysis of perforin and GrB content: Western blotting in lysates of cells of the NK-92 cell line (A) and their microvesicles (B) obtained upon the constitutive cell culturing (-) or in the presence of various inducers (+)

Note. The ratio of Western blotting results by GrB and perforin expression in cells of the NK-92 cell line (C, E) or their microvesicles (D, F) in the presence of inducers to the results of corresponding controls (without inducers). *, $p < 0.05$ – difference from controls (culturing in the presence of the complete cell culture medium only).

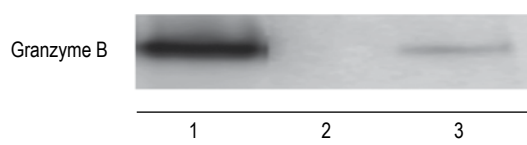


Figure 10. Qualitative analysis of GrB content in lysates from the pool of microvesicles expressing CD119, or CD11b obtained by sorting using the BD FACS Aria III flow cytometer sorter (BD, USA) from the initial mixture of microvesicles produced by the unstimulated cells of the NK-92 cell line

Note. 1, NK-92 cell line (positive controls); 2, lysing buffer solution (negative controls); 3, pool of microvesicles expressing CD119 or CD11b.

of GrB increased (1.34-fold), and the expression of perforin decreased (2.54-fold) (compared to the constitutive level) in MV obtained from the cultured NK cells of the NK-92 cell line. In addition, the pairwise comparison revealed that the expression of GrB decreased (1.76-fold), and the expression of perforin increased (2.60-fold), when NK cells were cultured in the presence of IL-1 β . When cultured in the presence of PMA, the expression of perforin increased (3.00-fold) (compared to the constitutive level) in MV obtained from the cultured NK cells of the NK-92 cell line.

Western Blot analysis of the pool of microvesicles expressing CD119 or CD11b (obtained by sorting with the BD FACS Aria III flow cytometer sorter (BD, USA) from the initial mixture of MV produced by unstimulated cells of the NK-92 cell line) showed the presence of GrB in them (Figure 10).

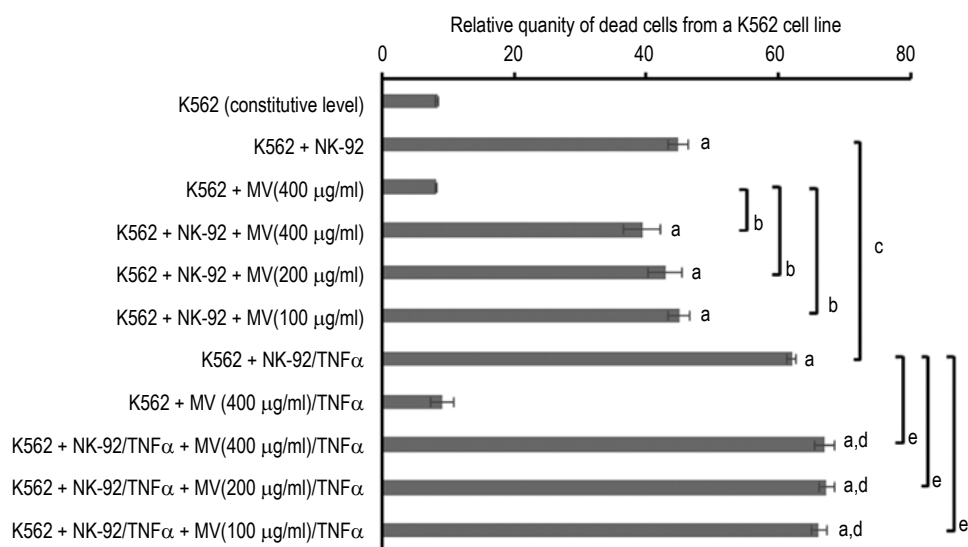


Figure 11. Cytotoxic activity of NK cells of the NK-92 cell line towards cells of the K562 cell line in the presence of microvesicles and TNFα

Note. Legend: K562 (constitutive level) – the quantity of dead K562 cells after the incubation without inducers; K562 + NK-92 – co-culturing of the K562 Cell Line and NK-92 Cell Line; MV – culturing in the presence of MV produced constitutively by cells of the NK-92 cell line; MV/TNFα – culturing in the presence of MV produced by cells of the NK-92 cell line as a result of the TNFα activation; NK-92/TNFα – TNFα-activated cells of the NK-92 cell line. The differences in the figure are shown as follows: a, difference ($p < 0.001$) from the constitutive death of K562; b, difference ($p < 0.001$) from the death while culturing K-562 + MV (400 µg/ml); c, difference ($p < 0.001$) from the death while culturing K-562 + NK-92; d, difference ($p < 0.001$) from the death while culturing K-562 + MV (400 µg/ml)/TNF; e, difference ($p < 0.01$) from the death while culturing K-562 + NK-92/TNF.

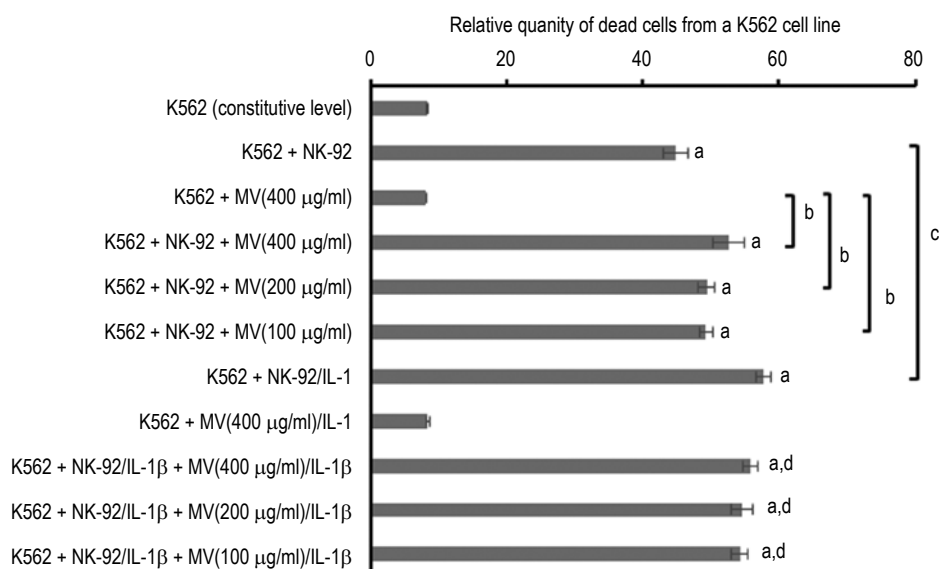


Figure 12. Cytotoxic activity of NK Cells of the NK-92 cell line towards cells of the K562 cell line in the presence of microvesicles and IL-1β

Note. Legend: K562 (constitutive level) – the quantity of dead K562 cells after the incubation without inducers; K562 + NK-92 – co-culturing of the K562 Cell Line and NK-92 Cell Line; MV – culturing in the presence of MV produced constitutively by cells of the NK-92 cell line; MV/IL-1β – culturing in the presence of MV produced by cells of the NK-92 cell line as a result of the IL-1β activation; NK-92/ IL-1β – IL-1β-activated cells of the NK-92 cell line. The differences in the figure are shown as follows: a, difference ($p < 0.001$) from the constitutive death of K562; b, difference ($p < 0.001$) from the death while culturing K-562 + MV (400 µg/ml); c, difference ($p < 0.001$) from the death while culturing K-562 + NK-92; d, difference ($p < 0.001$) from the death while culturing K-562 + MV (400 µg/ml)/IL-1β.

Analysis of cytotoxicity in both cells of the NK-92 cell line and microvesicles produced by them towards cells of the K562 cell line

It has been established that TNF α and IL-1 β cytokines amplified the cytotoxic activity in NK cells of the NK-92 cell line towards cells of the K562 cell line. This coincides with the literature data [18, 26, 27, 53, 62]. MV obtained from unstimulated cells or activated cells of the NK-92 cell line had no effect on the K562 cell line death. MV obtained from unstimulated cells of the NK-92 cell line had no effect on the cytotoxicity of unstimulated cells of the NK-92 cell line. On the contrary, the cytotoxicity of TNF α -activated cells of the NK-92 cell line in the presence of MV obtained from the same TNF α -activated cells of the NK-92 cell line was higher than their cytotoxicity without MV (Figure 11). The analysis of the NK-92 cell line cytotoxic activity towards the K562 cell line showed that MV obtained from unstimulated cells or IL-1 β -activated cells of the NK-92 cell line had no effect on the NK-92 cell line cytotoxic activity (Figure 12).

Discussion

To study the MV produced by NK cells, we used the NK-92 cell line (ATCC, USA). The NK-92 cell line represented the main phenotype and functional characteristics of activated NK cells [19, 28]. The use of the cell line introduced specific restrictions in the extrapolation of the results obtained in the in vivo situation. However, due to the inability to extract enough NK cells from the peripheral blood using a cell sorter, we had to use the NK-92 cell line in order to obtain a large number of MV for the study. The granulometric analysis of MV produced by NK cells of the NK-92 cell line showed that their sizes varied from 190.1 nm to 458.7 nm, while most of MV were 295.3 nm in size. These data complied with the information on sizes of MV produced by various cells [17, 60, 70]. The data obtained by atomic force microscopy method indicated that the major population of microvesicles lay in the range of 196-392 nm in size. The transmission electron microscopy of MV produced by the NK-92 cell line allowed to identify the spherical objects with a diameter of 150-500 nm, which corresponded to the data obtained during the granulometric analysis and atomic force microscopy. It is worth noting that the images obtained using TEM coincided with those presented in the world scientific literature [51, 71]. For example, the Figure 5C shows a typical cup-shaped structure. It was considered a native one for the extracellular vesicles for a long time, but cryoelectron microscopy data showed that this form is a consequence of sample preparation for TEM [71].

The analysis of phenotype of NK cells of the NK-92 cell line in unstimulated state demonstrated that

almost all cells expressed CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD119, CD54, CD95, CD56 with different levels of intensity. These data coincide with the literature data [19, 36, 56, 77, 79, 80]. The activation of NK cells of the NK-92 cell line by inducers resulted in their phenotype alteration: TNF α and IL-1 β stimulated the CD54 and CD95 expression, IL-1 β decreased the CD18 expression, IFN γ decreased the CD11b expression, PMA increased the CD11c, CD54, CD95, and CD119 expression and decreased the CD56 expression. At that, most of the specified data on constitutive and induced expression of receptors by NK cells coincide with the literature data [16, 36, 59].

It should be noted that changes in the phenotype of NK cells of the NK-92 cell line in the presence of inducers had little effect on the phenotype of MV produced by these cells. NK cells differed from MV in the number of CD54, CD18 and CD11b receptors. The analysis of MV phenotype showed that, unlike the source cells, 33% of MV carried the CD119 marker. Other markers were expressed on less than 30% of MV. The abovementioned analysis also showed that, unlike the source cells, the number of double-positive MV was always about two times less than the number of mono-positive MV. Despite the fact that MV formation is an energy-dependent process accompanied by the mobilization of intracellular Ca²⁺ and the activation of proteins of the Rho/ROCK-dependent signal pathway regulating the dynamics of actin microfilaments in a cell, our findings concerning the phenotype of cells of the NK-92 cell line and MV produced by them provide evidence of the accidental inclusion of the analyzed surface proteins into a MV membrane. At the same time, small changes in the phenotype of MV produced by NK cells of the NK-92 cell line in the presence of inducers were accompanied by a rapid change in the amount of proteins contained in both the cells and MV produced by them. Thus, it has been established that the amount of proteins in cells increased in the presence of the inducers used by us. The analysis of protein content in MV showed that the protein content in MV doubled, when cells of the NK-92 cell line were cultured in the presence of PMA; that the protein content in MV increased fourfold, when cells of the NK-92 cell line were cultured in the presence of TNF α ; and that the protein content in MV decreased 1.5-fold, when cells of the NK-92 cell line were cultured in the presence of IL-1 β (compared to constitutive levels). This can be connected with changes in the protein amount and composition in MV and with changes in the expression level of some other non-analyzed receptors on the surface of MV. Previously, it was demonstrated that the cell culturing in the presence of inducers could not only increase the number of MV produced by a cell [35], but also alter the MV composition depending on the inducer type [4].

We analyzed changes in perforin and GrB content in cells of the NK-92 cell line and MV produced by them in the presence of PMA and proinflammatory cytokines TNF α and IL-1 β . Western Blot analysis requires a large amount of proteins for detection, which, in turn, requires the accumulation of source cells when working with MV. Therefore, considering that IFN γ , as well as TNF α and IL-1 β , refers to proinflammatory cytokines, we decided not to evaluate the effect of IFN γ on the content of perforin and GrB in cells of the NK-92 line and in MV produced by them by Western blotting method. We established that, depending on the inducer type (PMA, TNF α , IL-1 β), the content of perforin and GrB changed in cells and in MV produced by them. Thus, despite the fact that the content of GrB and perforin in cells of the NK-92 cell line did not change in the presence of TNF α , their content in MV changed variously: the expression of GrB increased, but the expression of perforin decreased. In the presence of IL-1 β , the expression of GrB increased and the expression of perforin decreased in cells of the NK-92 cell line. However, the expression of GrB decreased and the expression of perforin increased in MV produced by cells of the NK-92 cell line. In the presence of PMA used as an inducer, the expression of GrB and perforin increased in cells of the NK-92 cell line, and only perforin content increased in MV. Our findings concerning the production of MV with various GrB and perforin content by NK-92 cells in the presence of different types of inducers (PMA, TNF α , IL-1 β) provide evidence of the existence of specific mechanisms in a cell that regulate the MV contents. This enables further discussions of the issues related to the regulation of such processes.

We used the procedure of MV isolation from the supernatant of cultured cells through differential centrifugation. The death rate of unstimulated cells and activated NK cells of the NK-92 cell line in the culture not did not exceed 6-8%. This cuts the likelihood of the contamination of our MV sample with cytoplasmic secretory granules. To confirm this suggestion, we used the BD FACS Aria III flow cytometer sorter and isolated a fraction of MV carrying CD119 and/or CD11b from the MV sample obtained by differential centrifugation. Thus, we obtained a sample containing a pool of MV expressing any of these markers on their surface. This approach was required to increase an output of MV positively expressing a surface marker to perform the further analysis by Western blotting method that confirmed the GrB presence in the obtained fraction of MV. However, the question concerning the state, in which GrB is included in these MV, remains open: within a secretory granule in its active state, within MV as an inactive serpin-proteinase complex, or as an active free protein? Previously, it was demonstrated that large MV could include both mitochondria and granules [65],

which supported the first suggestion. Currently, the question concerning the way of GrB delivery into the target cell cytoplasm remains open. Besides the classical theory of cell cytolysis considered to be proved and stating that perforin creates a pore in the cytoplasmic membrane and GrB enters the cytoplasm through this pore [34, 72], there was another theory stating that perforin and GrB were endocytosized by the cell, then perforin created a pore in the endosome membrane, and GrB entered the cytoplasm through this pore and initiated the apoptosis [22, 37, 55]. We carried out the analysis of cytotoxic activity of cells of the NK-92 cell line towards cells of the K562 cell line. The results revealed that MV obtained from unstimulated or IL-1 β -activated cells of the NK-92 cell line had no effect on the cytotoxic activity of cells of the NK-92 cell line. This fact coincides with our findings concerning the decreased GrB content in MV obtained from IL-1 β -activated cells of the NK-92 cell line. However, MV obtained from TNF α -activated cells of the NK-92 cell line increase the cytotoxicity of TNF α -activated cells of the NK-92 cell line compared to their cytotoxic activity towards cells of the K562 cell line without MV. This coincides with our findings concerning the increased GrB content in MV obtained from TNF α -activated cells of the NK-92 cell line. This fact proves that NK cells have an additional pathway to deliver a cytotoxic signal to a target cell through MV containing GrB. Our findings concerning the increase of the cytotoxic activity of activated NK cells by microvesicles obtained from activated cells of the NK-92 cell line coincide with the data on the cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells published by Jong A.Y. et al. [25] in 2017.

Conclusion

To sum up the obtained information, it should be noted that MV produced by NK cells of the NK-92 cell line contain perforin and GrB. Depending on the inducer type, NK cells of the NK-92 cell line produce microvesicles that differ in their composition, but hardly differ in their phenotype. Any changes in MV composition can result in changes in their functional activity: in particular, changes can increase the cytotoxic activity of NK cells of the NK-92 cell line. Thus, besides a well-known and proved way for GrB delivery to a target cell, we can suggest an additional way – the transportation of GrB within MV.

Authors' contributions

Dmitriy I. Sokolov, Kseniya L. Belyakova, Valentina A. Mikhailova, Larisa P. Vyazmina, Yulia P. Milyutina, Anastasiya R. Sheveleva, Anna A. Zhdanova, Darja A. Malygina, Kirill V. Onokhin, Alexandra N. Ivanova, Andrey V. Korenevsky, Sergey A. Selkov contributed equally to this work.

Список литературы / References

1. Aliotta J.M., Pereira M., Johnson K.W., de Paz N., Dooner M.S., Puente N., Ayala C., Brilliant K., Berz D., Lee D., Ramratnam B., McMillan P.N., Hixson D.C., Josic D., Quesenberry P.J. Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Exp. Hematol.*, 2010, Vol. 38, no. 3, pp. 233-245.
2. Ardoin S.P., Shanahan J.C., Pisetsky D.S. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand. J. Immunol.*, 2007, Vol. 66, no. 2-3, pp. 159-165.
3. Berchem G., Noman M.Z., Bosseler M., Paggetti J., Bacconnais S., le Cam E., Nanbakhsh A., Moussay E., Mami-Chouaib F., Janji B., Chouaib S. Hypoxic tumor-derived microvesicles negatively regulate NK cell function by a mechanism involving TGF-beta and miR23a transfer. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 4, e1062968. doi: 10.1080/2162402X.2015.1062968.
4. Bernimoulin M., Waters E.K., Foy M., Steele B.M., Sullivan M., Falet H., Walsh M.T., Barteneva N., Geng J.G., Hartwig J.H., Maguire P.B., Wagner D.D. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J. Thromb. Haemost.*, 2009, Vol. 7, no. 6, pp. 1019-1028.
5. Blott E.J., Bossi G., Clark R., Zvelebil M., Griffiths G.M. Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J. Cell Sci.*, 2001, Vol. 114, Pt 13, pp. 2405-2016.
6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, Vol. 72, pp. 248-254.
7. Bryceson Y.T., March M.E., Ljunggren H.G., Long E.O. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol. Rev.*, 2006, Vol. 214, pp. 73-91.
8. Camussi G., Deregibus M.C., Bruno S., Grange C., Fonsato V., Tetta C. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am. J. Cancer Res.*, 2011, Vol. 1, no. 1, pp. 98-110.
9. Chiva-Blanch G., Crespo J., Suades R., Arderiu G., Padro T., Vilahur G., Cubedo J., Corella D., Salas-Salvado J., Aros F., Martinez-Gonzalez M.A., Ros E., Fito M., Estruch R., Badimon L. CD142⁺/CD61⁺, CD146⁺ and CD45⁺ microparticles predict cardiovascular events in high risk patients following a Mediterranean diet supplemented with nuts. *Thromb. Haemost.*, 2016, Vol. 116, no. 1, pp. 103-114.
10. Cholujova D., Jakubikova J., Kubes M., Arendacka B., Sapak M., Ihnatko R., Sedlak J. Comparative study of four fluorescent probes for evaluation of natural killer cell cytotoxicity assays. *Immunobiology*, 2008, Vol. 213, no. 8, pp. 629-640.
11. Clancy J.W., Tricarico C.J., d'Souza-Schorey C. Tumor-derived microvesicles in the tumor microenvironment: How vesicle heterogeneity can shape the future of a rapidly expanding field. *Bioessays*, 2015, Vol. 37, no. 12, pp. 1309-1316.
12. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.*, 2001, Vol. 22, no. 11, pp. 633-640.
13. Del Zotto G., Marcenaro E., Vacca P., Sivori S., Pende D., Della Chiesa M., Moretta F., Ingegnere T., Mingari M.C., Moretta A., Moretta L. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2017, Vol. 92, no. 2, pp. 100-114.
14. Diehl P., Fricke A., Sander L., Stamm J., Bassler N., Htun N., Ziemann M., Helbing T., El-Osta A., Jowett J.B., Peter K. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc. Res.*, 2012, Vol. 93, no. 4, pp. 633-644.
15. Dragovic R.A., Collett G.P., Hole P., Ferguson D.J., Redman C.W., Sargent I.L., Tannetta D.S. Isolation of syncytiotrophoblast microvesicles and exosomes and their characterisation by multicolour flow cytometry and fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis. *Methods*, 2015, Vol. 87, pp. 64-74.
16. Dudimah F.D., Abraha A., Wang X., Whalen M.M. Activation of p44/42 in human natural killer cells decreases cell-surface protein expression: Relationship to tributyltin-induced alterations of protein expression. *Toxicol. Mech. Methods*, 2010, Vol. 20, no. 9, pp. 544-555.
17. Evans-Osses I., Reichembach L.H., Ramirez M.I. Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction. *Parasitol. Res.*, 2015, Vol. 114, no. 10, pp. 3567-3575.
18. Fauriat C., Long E.O., Ljunggren H.G., Bryceson Y.T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 11, pp. 2167-2176.
19. Gong J.H., Maki G., Klingemann H.G. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*, 1994, Vol. 8, no. 4, pp. 652-658.
20. Gyorgy B., Modos K., Pallinger E., Palocz K., Pasztoi M., Misjak P., Deli M.A., Sipos A., Szalai A., Voszka I., Polgar A., Toth K., Csete M., Nagy G., Gay S., Falus A., Kittel A., Buzas E.I. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 4, pp. e39-48.
21. Gyorgy B., Szabo T.G., Pasztoi M., Pal Z., Misjak P., Aradi B., Laszlo V., Pallinger E., Pap E., Kittel A., Nagy G., Falus A., Buzas E.I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, no. 16, pp. 2667-2688.
22. Hiebert P.R., Granville D.J. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol. Med.*, 2012, Vol. 18, no. 12, pp. 732-741.

23. Hsu H.T., Mace E.M., Carisey A.F., Viswanath D.I., Christakou A.E., Wiklund M., Onfelt B., Orange J.S. NK cells converge lytic granules to promote cytotoxicity and prevent bystander killing. *J. Cell Biol.*, 2016, Vol. 215, no. 6, pp. 875-889.
24. Joeckel L.T., Bird P.I. Blessing or curse? Proteomics in granzyme research. *Proteomics Clin. Appl.*, 2014, Vol. 8, no. 5-6, pp. 351-381.
25. Jong A.Y., Wu C.H., Li J., Sun J., Fabbri M., Wayne A.S., Seeger R.C. Large-scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells. *J. Extracell. Vesicles*, 2017, Vol. 6, no. 1, 1294368. doi: 10.1080/20013078.2017.1294368
26. Knoblock K.F., Canning P.C. Modulation of in vitro porcine natural killer cell activity by recombinant interleukin-1 alpha, interleukin-2 and interleukin-4. *Immunology*, 1992, Vol. 76, no. 2, pp. 299-304.
27. Kobayashi Y., Sudo T., Matsushita N., Nakao M., Tanaka Y., Shimizu K., Tanigawa K., Aruga A. Preparation of NK-enriched LAK cells--their potential cytotoxic and ADCC activities. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2003, Vol. 30, no. 11, pp. 1776-1779.
28. Komatsu F., Kajiwaru M. Relation of natural killer cell line NK-92-mediated cytotoxicity (NK-92-lysis) with the surface markers of major histocompatibility complex class I antigens, adhesion molecules, and Fas of target cells. *Oncol. Res.*, 1998, Vol. 10, no. 10, pp. 483-489.
29. Korenevskii A.V., Milyutina Y.P., Zhdanova A.A., Pyatygina K.M., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Mass-Spectrometric analysis of proteome of microvesicles produced by NK-92 natural killer cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, Vol. 165, no. 4, pp. 564-571.
30. Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Primdal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Thery C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016, Vol. 113, no. 8, pp. E968-977.
31. Krzewski K., Coligan J.E. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, p. 335.
32. Lee T.H., D'Asti E., Magnus N., Al-Nedawi K., Meehan B., Rak J. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer – the emerging science of cellular 'debris'. *Semin. Immunopathol.*, 2011, Vol. 33, no. 5, pp. 455-467.
33. Liu M., Wang Y.L., Shang M., Wang Y., Zhang Q., Wang S.X., Wei S., Zhang K., Liu C., Wu Y.N., Liu M.L., Song J.Q., Liu Y.X. Flow cytometric analysis of circulating microvesicles derived from myocardial Ischemic preconditioning and cardioprotection of Ischemia/reperfusion Injury in rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2015, Vol. 31, no. 6, pp. 524-531.
34. Lopez J.A., Susanto O., Jenkins M.R., Lukoyanova N., Sutton V.R., Law R.H., Johnston A., Bird C.H., Bird P.I., Whisstock J.C., Trapani J.A., Saibil H.R., Voskoboinik I. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 14, pp. 2659-2668.
35. MacKenzie A., Wilson H.L., Kiss-Toth E., Dower S.K., North R.A., Surprenant A. Rapid secretion of Interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity*, 2001, Vol. 15, no. 5, pp. 825-835.
36. Maki G., Krystal G., Dougherty G., Takei F., Klingemann H.G. Induction of sensitivity to NK-mediated cytotoxicity by TNF-alpha treatment: possible role of ICAM-3 and CD44. *Leukemia*, 1998, Vol. 12, no. 10, pp. 1565-1572.
37. Metkar S.S., Wang B., Aguilar-Santelises M., Raja S.M., Uhlin-Hansen L., Podack E., Trapani J.A., Froelich C.J. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity*, 2002, Vol. 16, no. 3, pp. 417-428.
38. Mikhailova V.A., Belyakova K.L., Selkov S.A., Sokolov D.I. Peculiarities of NK cells differentiation: CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells at pregnancy and in non-pregnant state. *Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 19-26. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-19-26.
39. Mikhailova V.A., Belyakova K.L., Vyazmina L.P., Sheveleva A.R., Selkov S.A., Sokolov D.I. Evaluation of microvesicles formed by natural killer (NK) cells using flow cytometry. *Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 251-254. doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-251-254.
40. Mikhailova V.A., Ovchinnikova O.M., Zainulina M.S., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Detection of microparticles of leukocytic origin in the peripheral blood in normal pregnancy and preeclampsia. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2014, Vol. 157, no. 6, pp. 751-756.
41. Miller V.M., Lahr B.D., Bailey K.R., Hodis H.N., Mulvagh S.L., Jayachandran M. Specific cell-derived microvesicles: Linking endothelial function to carotid artery intima-media thickness in low cardiovascular risk menopausal women. *Atherosclerosis*, 2016, Vol. 246, pp. 21-28.
42. Monleon I., Martinez-Lorenzo M.J., Monteagudo L., Laserra P., Taules M., Iturralde M., Pineiro A., Larrad L., Alava M.A., Naval J., Anel A. Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 12, pp. 6736-6744.
43. Morel N., Morel O., Delabranche X., Jesel L., Sztark F., Dabadie P., Freyssinet J.M., Toti F. Microparticles during sepsis and trauma. A link between inflammation and thrombotic processes. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, 2006, Vol. 25, no. 9, pp. 955-966.
44. Morel O., Toti F., Hugel B., Freyssinet J.M. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr. Opin. Hematol.*, 2004, Vol. 11, no. 3, pp. 156-164.

45. Muralidharan-Chari V., Clancy J.W., Sedgwick A., d'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J. Cell Sci.*, 2010, Vol. 123, Pt 10, pp. 1603-1611.
46. Neighbour P.A., Huberman H.S., Kress Y. Human large granular lymphocytes and natural killing ultrastructural studies of strontium-induced degranulation. *Eur. J. Immunol.*, 1982, Vol. 12, no. 7, pp. 588-595.
47. Osinska I., Popko K., Demkow U. Perforin: an important player in immune response. *Cent. Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 39, no. 1, pp. 109-115.
48. Panagiotou N., Wayne Davies R., Selman C., Shiels P.G. Microvesicles as vehicles for tissue regeneration: changing of the guards. *Curr. Pathobiol. Rep.*, 2016, Vol. 4, no. 4, pp. 181-187.
49. Perl M., Denk S., Kalbitz M., Huber-Lang M. Granzyme B: a new crossroad of complement and apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012, Vol. 946, pp. 135-146.
50. Principe S., Hui A.B., Bruce J., Sinha A., Liu F.F., Kislinger T. Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: implications for tumor biology and biomarker discovery. *Proteomics*, 2013, Vol. 13, no. 10-11, pp. 1608-1623.
51. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.*, 2013, Vol. 200, no. 4, pp. 373-383.
52. Rautela J., Huntington N.D. IL-15 signaling in NK cell cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.*, 2016, Vol. 44, pp. 1-6.
53. Robertson M.J., Cameron C., Lazo S., Cochran K.J., Voss S.D., Ritz J. Costimulation of human natural killer cell proliferation: role of accessory cytokines and cell contact-dependent signals. *Nat. Immun.*, 1996, Vol. 15, no. 5, pp. 213-226.
54. Roos M.A., Gennero L., Denysenko T., Reguzzi S., Cavallo G., Pescarmona G.P., Ponzetto A. Microparticles in physiological and in pathological conditions. *Cell Biochem. Funct.*, 2010, Vol. 28, no. 7, pp. 539-548.
55. Rousalova I., Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). *Int. J. Oncol.*, 2010, Vol. 37, no. 6, pp. 1361-1378.
56. Schneider M.K., Strasser M., Gilli U.O., Kocher M., Moser R., Seebach J.D. Rolling adhesion of human NK cells to porcine endothelial cells mainly relies on CD49d-CD106 interactions. *Transplantation*, 2002, Vol. 73, no. 5, pp. 789-796.
57. Simak J., Gelderman M.P. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus. Med. Rev.*, 2006, Vol. 20, no. 1, pp. 1-26.
58. Simak J., Gelderman M.P., Yu H., Wright V., Baird A.E. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J. Thromb. Haemost.*, 2006, Vol. 4, no. 6, pp. 1296-1302.
59. Slukvin I.I., Chernyshov V.P., Merkulova A.A., Vodnyanik M.A., Kalinovskiy A.K. Differential expression of adhesion and homing molecules by human decidual and peripheral blood lymphocytes in early pregnancy. *Cell. Immunol.*, 1994, Vol. 158, no. 1, pp. 29-45.
60. Sokolov D.I., Ovchinnikova O.M., Korenkov D.A., Viknyanschuk A.N., Benken K.A., Onokhin K.V., Selkov S.A. Influence of peripheral blood microparticles of pregnant women with preeclampsia on the phenotype of monocytes. *Transl. Res.*, 2016, Vol. 170, pp. 112-123.
61. Susanto O., Trapani J.A., Brasacchio D. Controversies in granzyme biology. *Tissue Antigens*, 2012, Vol. 80, no. 6, pp. 477-487.
62. Swisher S.G., Economou J.S., Holmes E.C., Golub S.H. TNF-alpha and IFN-gamma reverse IL-4 inhibition of lymphokine-activated killer cell function. *Cell. Immunol.*, 1990, Vol. 128, no. 2, pp. 450-461.
63. Thery C., Ostrowski M., Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 9, no. 8, pp. 581-593.
64. Tomaniak M., Gasecka A., Filipiak K.J. Cell-derived microvesicles in cardiovascular diseases and antiplatelet therapy monitoring – A lesson for future trials? Current evidence, recent progresses and perspectives of clinical application. *Int. J. Cardiol.*, 2017, Vol. 226, pp. 93-102.
65. Tramontano A.F., Lyubarova R., Tsiakos J., Palaia T., Deleon J.R., Ragolia L. Circulating endothelial microparticles in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.*, 2010, Vol. 2010, 250476. doi: 10.1155/2010/250476.
66. Vacca P., Moretta L., Moretta A., Mingari M.C. Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy. *Trends Immunol.*, 2011, Vol. 32, no. 11, pp. 517-523.
67. Vajen T., Mause S.F., Koenen R.R. Microvesicles from platelets: novel drivers of vascular inflammation. *Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 114, no. 2, pp. 228-236.
68. Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee J.J., Lotvall J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, 2007, Vol. 9, no. 6, pp. 654-659.
69. van der Pol E., Boing A.N., Harrison P., Sturk A., Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev.*, 2012, Vol. 64, no. 3, pp. 676-705.
70. van der Pol E., Coumans F.A., Grootemaat A.E., Gardiner C., Sargent I.L., Harrison P., Sturk A., van Leeuwen T.G., Nieuwland R. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J. Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 12, no. 7, pp. 1182-1192.

71. Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, Vol. 1820, no. 7, pp. 940-948.
72. Voskoboinik I., Whisstock J.C., Trapani J.A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no. 6, pp. 388-400.
73. Winiarska M., Bojarczuk K., Pyrzynska B., Bil J., Siernicka M., Dwojak M., Bobrowicz M., Miazek N., Zapala P., Zagodzina A., Krol M., Syta A., Podszyslaw-Bartnicka P., Pilch Z., Dabrowska-Iwanicka A., Juszczynski P., Efremov D.G., Slabicki M., Zenz T., le Roy A., Olive D., Rygiel T.P., Leusen J.H., Golab J. Inhibitors of SRC kinases impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *MAbs*, 2014, Vol. 6, no. 5, pp. 1300-1313.
74. Xu R., Greening D.W., Zhu H.J., Takahashi N., Simpson R.J. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J. Clin. Invest.*, 2016, Vol. 126, no. 4, pp. 1152-1162.
75. Yuan A., Farber E.L., Rapoport A.L., Tejada D., Deniskin R., Akhmedov N.B., Farber D.B. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, no. 3, e4722. doi: 10.1371/journal.pone.0004722.
76. Yun S., Lee S.H., Yoon S.R., Myung P.K., Choi I. Oxygen tension regulates NK cells differentiation from hematopoietic stem cells *in vitro*. *Immunol. Lett.*, 2011, Vol. 137, no. 1-2, pp. 70-77.
77. Zhang J., Sun R., Wei H., Zhang J., Tian Z. Characterization of interleukin-15 gene-modified human natural killer cells: implications for adoptive cellular immunotherapy. *Haematologica*, 2004, Vol. 89, no. 3, pp. 338-347.
78. Zhang L., Zhang H., Zhu Z., Jiang L., Lu X., Zhou M., Sun X., He L., Bai Y., Ma L. Matrine regulates immune functions to inhibit the proliferation of leukemic cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, Vol. 8, no. 4, pp. 5591-5600.
79. Zhang M., March M.E., Lane W.S., Long E.O. A signaling network stimulated by beta2 integrin promotes the polarization of lytic granules in cytotoxic cells. *Sci. Signal*, 2014, Vol. 7, no. 346, p. ra96.
80. Zou H., Li L., Han Y., Ma R., Liao Q., Tian J., Zhang X., Ren X., Song G., Guo Q., Li X., Ding H., Jiang G. Upregulation of CD54 and downregulation of HLAABC contribute to the novel enhancement of the susceptibility of HL-60 cells to NK cell-mediated cytotoxicity induced by ATRA plus VPA. *Oncol. Rep.*, 2017, Vol. 37, no. 1, pp. 105-114.
81. Zwirner N.W., Ziblat A. Regulation of NK cell activation and effector functions by the IL-12 family of cytokines: the case of IL-27. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, p. 25.

Авторы:

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

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

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

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

Authors:

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

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

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

Vyazmina L.P., Researcher, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

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

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

Онохин К.В. — сотрудник кафедры цитологии и гистологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Иванова А.Н. — научный сотрудник ресурсного научного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

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

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; профессор, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Milyutina Yu.P., Senior Research Associate, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Kozyreva A.R., Researcher, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Onokhin K.V., Research Associate, Department of Cytology and Histology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Ivanova A.N., Research Associate, Research and Resource Center for Development of Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Korenevsky A.V., Leading Research Associate, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Поступила 07.05.2019
Принята к печати 27.05.2019

Received 07.05.2018
Accepted 27.05.2019

ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ОТ СОДЕРЖАНИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МОНОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ

Савченко А.А.¹, Борисов А.Г.¹, Кудрявцев И.В.^{2,3}, Мошев А.В.¹

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

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

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

Резюме. Целью исследования явилось изучение зависимости фенотипа дендритных клеток (ДК), дифференцированных из моноцитов, от количества провоспалительных моноцитов в крови у больных раком почки (РП). Обследовано 28 больных РП (T3N0M0, светлоклеточный тип) в возрасте 40–55 лет до хирургического лечения. Диагноз верифицирован гистологически. В качестве контрольной группы проведено обследование 31 практически здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности Histopaque®-1077 с последующей адсорбцией на пластике в среде RPMI-1640 в присутствии 10% аутологичной сыворотки. Незрелые ДК (нДК) генерировали из моноцитов крови путем культивирования в течение 5 суток с GM-CSF и IFN α . Активацию ДК (аДК) индуцировали внесением в среду инкубации лизата опухолевых клеток и TNF α с последующей инкубацией в течение 48 часов. Для приготовления лизата аутологичных опухолевых клеток использовали фрагмент опухоли. Фенотипирование моноцитов крови и ДК различной степени зрелости проводили методом проточной цитометрии. У больных РП в периферической крови снижается количество CD14⁺CD16⁺ моноцитов (до 42% от уровня общих моноцитов) относительно контрольного диапазона. В связи с этим анализ зависимости фенотипа ДК, дифференцированных из моноцитов, от количества провоспалительных моноцитов в крови был проведен путем сравнения показателей с высоким содержанием провоспалительных моноцитов в крови у больных РП (> 42%, приближается к уровню контрольного диапазона) и низким (< 42%). Установлено, что у больных РП с низким количеством в крови провоспалительных моноцитов (< 42%) повышается содержание толерогенных нДК в клеточной культуре. Особенностью фенотипа нДК у пациентов с высоким содержанием провоспалительных моноцитов в крови (> 42%) является относительное увеличение экспрессии молекул, осуществляющих антиген-презентацию и коstimуляцию. При созревании/активации фенотип дендритных клеток у больных РП с различным содержанием провоспалительных моноцитов различается сильнее. У больных с низким уровнем провоспалительных моноцитов в крови в клеточной культуре формируется пул зрелых ДК с низким уровнем экспрессии CD86- и HLA-DR-рецепторов, что, соответственно, характеризу-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Савченко, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев, А.В. Мошев «Зависимость фенотипа дендритных клеток от содержания провоспалительных моноцитов крови у больных раком почки» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 689–702.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-689-702
© Павлова А.А. и соавт., 2019

For citation:

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, I.V. Kudryavtsev, A.V. Moshev
“Interdependence between the phenotype of dendritic cells and amounts of blood proinflammatory monocytes in patients with kidney cancer”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 689–702.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-689-702
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-689-702

ет слабую костимулирующую и антигенпрезентирующую активность. У больных с высоким уровнем провоспалительных моноцитов в клеточной культуре формируется пул активированных ДК с высоким уровнем функциональной активности. Выявленные различия фенотипа ДК от субпопуляционного состава моноцитов крови у больных РП характеризуют механизмы программирования клеточной дифференцировки в зависимости от микроокружения, в том числе и патогенного характера (на фоне опухолевого роста).

Ключевые слова: дендритные клетки, моноциты, рак почки, фенотип, костимулирующие молекулы, презентация антигена

INTERDEPENDENCE BETWEEN THE PHENOTYPE OF DENDRITIC CELLS AND AMOUNTS OF BLOOD PROINFLAMMATORY MONOCYTES IN PATIENTS WITH KIDNEY CANCER

Savchenko A.A.^a, Borisov A.G.^a, Kudryavtsev I.V.^{b,c}, Moshev A.V.^a

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

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

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

Abstract. The aim of the study was to investigate an interdependence between the phenotype of dendritic cells (DC) differentiated from monocytes and the number of pro-inflammatory monocytes in peripheral blood of patients with kidney cancer (KC). The study involved 28 patients at the age of 40–55 years suffering with KC (T3N0M0, clear cell type) before surgical treatment. The diagnosis was verified histologically. 31 healthy age-matched persons were examined as a control group. Mononuclear cells were isolated from heparinized venous blood by centrifugation in a Histopaque®-1077 density gradient followed by plastic adsorption in RPMI 1640 medium supplied with 10% autologous serum. Immature DCs (iDCs) were generated from blood monocytes by culturing for 5 days with GM-CSF and IFN α . Activation of DCs (mDCs) was induced by incubation with the tumor cell lysate and TNF α , followed by incubation for 48 hours. A tumor fragment was used to prepare the lysate of autologous tumor cells. Phenotyping of blood monocytes and DC at various maturation stages was performed by flow cytometry. The numbers of CD14⁺CD16⁺ monocytes in peripheral blood of KC patients were decreased (up to 42% of the total monocyte level) against the control ranges. In this regard, the analysis of the dependence between the phenotype of DCs differentiated from monocytes and the number of pro-inflammatory blood monocytes was carried out by comparing the groups with a high content of pro-inflammatory monocytes in the blood in KC patients (> 42%, near-control range) and low content (resp., < 42%). We have found that the contents of tolerogenic iDC in cell culture are increased in KC patients with low amounts of pro-inflammatory monocytes in blood (< 42%). A relatively increased expression of antigen-presenting and co-stimulatory molecules proved to be the specific feature of iDC phenotype in patients with high contents (> 42%) of pro-inflammatory monocytes in blood. The phenotype of dendritic cells in KC patients with different content of proinflammatory monocytes during maturation/activation showed more differences. In the patients with low levels of pro-inflammatory monocytes, the cell pool of *in vitro* maturing DCs was characterized by low level of CD86 and HLA-DR receptor expression, thus reflecting a weak co-stimulating and antigen-presenting activity. In the patients with high levels of pro-inflammatory monocytes in blood, the *in vitro* activated DCs showed higher level of functional activity using the above markers. The revealed differences in the DC phenotype and interrelations with amounts of blood monocyte subpopulations in KC patients may presume the programmed cell differentiation mechanisms depending on the microenvironment, under pathogenic conditions (i.e., in presence of malignant tumor growth).

Keywords: dendritic cells, monocytes, kidney cancer, phenotype, costimulatory molecules, antigen presentation

Введение

Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками, которые инициируют и регулируют Т-клеточный иммунный ответ, а также отвечают за развитие иммунной толерантности [11, 21, 23]. Данные механизмы реализуются за счет экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II класса (МНС I и МНС II), комплекса костимуляторных молекул (в первую очередь антигенов CD80 и CD86), а также синтеза и секреции цитокинов и хемокинов. Установленные механизмы функциональной активности ДК определили развитие технологий получения дендритноклеточных вакцин на основе дифференцировки моноцитов крови в ДК в условиях *in vitro*. В настоящее время вакцины на основе ДК используются при лечении широкого спектра онкологических и инфекционных заболеваний. Так, в работе Wang и соавт. (2017) представлены результаты применения дендритноклеточной вакцины при лечении рака пищевода. Установлено, что активированные ДК индуцировали специфический противоопухолевый иммунитет и стимулировали секрецию Th1-цитокинов [29]. Получены положительные результаты применения вакцины на основе ДК при лечении рецидивирующей герпетической инфекции [2]. В исследовании Hsu и соавт. (2018) показана эффективность применения вакцины на основе ДК в достижении длительной ремиссии при остром миелоидном лейкозе [14]. При использовании дендритноклеточной вакцины в сочетании с химиотерапией также выявлена эффективность при лечении рака поджелудочной железы [31].

Однако функциональная активность ДК в противоопухолевых вакцинах не всегда оказывается на высоком уровне. Одной из причин данной проблемы определяется отсутствие единых стандартов получения и способов активации ДК в условиях *in vitro*. Доказано, что применение различных комплексов цитокинов при индукции дифференцировки моноцитов в ДК, сроки инкубации и способы антигенной нагрузки приводят к созреванию ДК с разным уровнем функциональной активности [3]. У больных злокачественными глиомами головного мозга ДК характеризуются нарушением экспрессии мембранной формы TNF α , что приводит к снижению их функциональной активности [6]. С другой стороны, сама опухоль также вызывает подавление специфического противоопухолевого иммунитета. Установлено, что ряд синтезируемых опухолью гуморальных факторов способен нарушать дифференцировку, созревание и функциональную активность ДК. Исследованием Ning и соавт. (2018) доказано, что экзосомы из карциномы

легкого LLC Lewis, а также клетки рака молочной железы 4T1 ингибировали созревание и миграцию ДК [20]. Bai и соавт. (2018) отмечали, что у больных раком предстательной железы часто выявляются дефекты функциональной активности ДК. Ингибирование созревания и активности ДК осуществляется опухолью за счет синтеза фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), причем по мере увеличения объема опухоли повышается концентрация VEGF, что, в свою очередь, стимулирует подавление активности ДК [7].

Функциональная активность ДК также зависит от исходного состояния моноцитов крови, функциональная активность которых может нарушаться при канцерогенезе. В исследовании Song и соавт. (2016) выявлено, что мембраны экзосом опухолевых клеток покрыты фосфорилированным эпидермальным рецептором фактора роста (EGFR) и рецептором 2 эпидермального фактора роста человека (HER-2), которые повышают выживаемость моноцитов (за счет ингибирования апоптоза) и стимулируют преимущественную их дифференцировку в связанные с опухолью макрофаги (tumor-associated macrophages, TAM), способные стимулировать рост опухоли [24]. ДК, дифференцированные из моноцитов крови больных раком почки (РП), характеризовались сниженной костимуляторной и антигенпрезентирующей активностью за счет пониженного уровня экспрессии CD83 и CD86 [4]. У больных РП в крови нарушается соотношение моноцитарных субпопуляций, наблюдается дисбаланс экспрессии активационных молекул и снижается активность респираторного взрыва моноцитов [5]. Более того, в ряде работ повышение уровня провоспалительных моноцитов (CD14⁺CD16⁺) в циркуляции связывают с увеличением содержания TAM и усилением роста опухоли [16, 30].

Таким образом, целью исследования явилось изучение зависимости фенотипа ДК, дифференцированных из моноцитов в условиях *in vitro*, и количества провоспалительных моноцитов в крови у больных РП.

Материалы и методы

На базе КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» обследованы больные РП (Т3N0M0, светлоклеточный тип) в возрасте 40-55 лет до хирургического лечения (n = 28). Диагноз верифицирован гистологически. В качестве контрольной группы было проведено обследование 31 практически здорового человека аналогичного возрастного диапазона.

Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугиро-

ванием в градиенте плотности Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, США) ($\rho = 1,077$). Моноциты выделяли на чашках Петри (ЗАО «Олданс», Россия) путем прилипания к пластику в среде RPMI-1640 в присутствии 10% аутологичной сыворотки. Дифференцировка моноцитов в незрелые ДК (нДК) осуществлялась в течение 5 суток при 37 °C в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) во флаконах для культивирования (Greiner Bio One, Германия), в среде RPMI-1640, содержащей 10% аутологичной сыворотки и 100 мкг/мл гентамицина, в присутствии GM-CSF (50 нг/мл, Sigma-Aldrich, США) и IFN α (100 Ед/мл, Sigma-Aldrich, США). Активацию (созревание) ДК (аДК) индуцировали внесением в среду инкубации лизата опухолевых клеток (100 мкг/мл) и TNF α (25 нг/мл, Sigma-Aldrich, США) с последующей инкубацией в течение 48 часов.

Для приготовления лизата опухолевых клеток использовали фрагмент опухоли (1 см³), который механически гомогенизировали в забуференном физиологическом растворе и трижды центрифугировали при +4 °C и 400 g в течение 2 минут (Eppendorf Centrifuge 5804R, Германия) для удаления конгломератов ткани. Супернатант замораживался при температуре -80 °C без криопротекторов и проводился через 3 цикла быстрого замораживания—оттаивания. Полученный гомогенат центрифугировали при 2000 g 15 минут. В супернатанте по методу Брэдфорда измеряли концентрацию белка и замораживали для дальнейшего использования при -80 °C. В культуральную среду для активации ДК у больных РП вносился аутологичный лизат опухолевых клеток, у лиц контрольной группы — сливной лизат опухолевых клеток.

Исследование фенотипа моноцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующей панели: HLA-DR-FITC/CD14-PE/CD45-ECD/CD64-PC5/CD16-PC7. Фенотипирование ДК различной степени зрелости также проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США) в следующей панели: CD80-FITC/CD86-PE/HLA-DR-ECD/CD83-PC5/CD14-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [1]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [12]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточ-

ном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) Центра коллективного пользования КНЦ СО РАН [28]. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 моноцитов или ДК. Определяли ДК с фенотипом CD14-CD83⁺, дальнейшее «гейтирование» и подсчет клеток проходил относительно данного фенотипа. По средней интенсивности флуоресценции (MFI — Mean Fluorescence Intensity) оценивались уровни экспрессии поверхностных рецепторов.

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

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Достоверность различий показателей в связанных выборках определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

При обследовании больных РП обнаружено, что относительное количество CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови у них составляет 41,2% (29,3; 54,8), что явилось значительно ниже ($p < 0,001$), чем у лиц контрольной группы — 73,7% (62,3; 81,3). Исходя из данных результатов, все больные были разделены на две группы по медиане количества CD14⁺CD16⁺ моноцитов. Установлено, что у больных РП с высоким процентным содержанием CD14⁺CD16⁺ моноцитов ($> 41,2\%$) наблюдается пониженное количество CD14⁺CD16⁻ моноцитов (24,4% (16,9; 38,1)) в сравнении с пациентами с низким уровнем ($< 41,2\%$) CD14⁺CD16⁺ моноцитов (68,0% (51,3; 75,0), $p < 0,001$). В обеих сформированных группах больных относительное количество CD14⁺CD16⁺ моноцитов было значительно ниже, чем у лиц контрольной группы: $p = 0,044$ — при высоком процентном уровне CD14⁺CD16⁺ клеток, $p < 0,001$ — при низком содержании. Различий по процентному количеству CD14^{dim}CD16⁺ моноцитов между данными группами больных РП не обнаружено. Не выявлено различий между группами больных по процентному содержанию HLA-DR⁺ и CD64⁺ клеток.

Как отмечалось ранее, экспрессия антигена CD80 на дендритных клетках у обследованных лиц распределяется на 2 пика [3]. В связи с этим при исследовании особенности фенотипа дендритных клеток от количества CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови было проведено с выделением дендритных клеток с низкой (CD83⁺CD80^{low}) и высокой (CD83⁺CD80^{high}) экспрессией CD80. При исследовании фенотипа нДК обнаружено, что независимо от количества CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови у больных РП относительно контрольных показателей снижается относительное количество клеток, экспрессирующих CD80^{low}, и повышается доля клеток с экспрессией CD80^{high} (табл. 1). Единственным показателем,

различающимся в зависимости от содержания провоспалительных моноцитов, является уровень CD83⁺CD80^{high}HLA-DR⁺: при низком количестве CD14⁺CD16⁺ моноцитов содержание нДК с данным фенотипом снижается.

Уровни экспрессии исследуемых антигенов (по MFI) на поверхности CD83⁺ и CD80^{low} нДК не зависят от количества CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови у больных РП, но отличаются от контрольных значений (табл. 2). В то же время экспрессия ряда маркеров на CD80^{high} и CD80^{high}CD86^{high} нДК у пациентов с РП значительно различается в зависимости от содержания провоспалительных моноцитов (табл. 3).

ТАБЛИЦА 1. ФЕНОТИП НЕЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК (В %), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, У БОЛЬНЫХ РП С РАЗЛИЧНЫМ КОЛИЧЕСТВОМ CD14⁺CD16⁺ МОНОЦИТОВ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. PHENOTYPE OF IMMATURE DENDRITIC CELLS (IN %) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC WITH DIFFERENT AMOUNTS OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП Patients with KC	
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ > 41,2% n = 14	CD14 ⁺ CD16 ⁺ < 41,2% n = 14
CD83 ⁺ CD80 ⁺	95,3 (93,8-98,2)	95,9 (91,7-98,1)	97,5 (94,8-99,3)
CD83 ⁺ CD80 ^{low}	73,2 (62,2-76,7)	27,5 (18,6-57,2) p ₁ < 0,001	19,0 (7,3-42,0) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high}	20,0 (13,1-22,1)	47,2 (27,3-55,2) p ₁ = 0,009	52,2 (45,7-63,4) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ CD86 ⁺	99,6 (98,5-99,9)	100,0 (99,9-100,0) p ₁ < 0,001	100,0 (99,9-100,0) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ^{high}	6,8 (5,8-10,1)	20,9 (12,1-27,9) p ₁ < 0,001	17,6 (17,1-27,4) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ HLA-DR ⁺	99,5 (99,4-99,9)	99,8 (98,1-99,9)	99,9 (99,6-100,0)
CD83 ⁺ CD80 ^{low} HLA-DR ⁺	72,9 (61,8-76,7)	27,5 (18,6-57,2) p ₁ < 0,001	19,0 (7,3-42,0) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} HLA-DR ⁺	17,1 (13,1-22,1)	46,4 (27,2-53,4) p ₁ < 0,001	52,1 (45,6-60,2) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,032
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ^{high} HLA-DR ⁺	6,8 (5,8-10,1)	20,9 (12,1-27,9) p ₁ < 0,001	17,6 (17,1-27,4) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{low} CD86 ⁺	73,0 (62,2-76,2)	27,5 (18,6-57,2) p ₁ < 0,001	19,0 (7,3-42,0) p ₁ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ⁺	20,0 (13,1-22,1)	47,2 (27,3-55,2) p ₁ = 0,010	52,2 (45,7-63,4) p ₁ = 0,005

Примечание. p₁ – статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p₂ – статистически значимые различия между группами больных с высоким (> 42%, приближается к уровню контрольного диапазона) и низким (< 42%) содержанием провоспалительных моноцитов в периферической крови.

Note. p₁, statistically significant differences versus controls; p₂, statistically significant differences between two groups of KC patients with high (> 42%, approaching the control range) and low (< 42%) content of pro-inflammatory monocytes in peripheral blood.

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ НА НЕЗРЕЛЫХ CD83⁺ И CD80^{low} ДК (в о. е.), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВА CD14⁺CD16⁺ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РП, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. EXPRESSION LEVELS OF ANTIGENS ON IMMATURE CD83⁺ AND CD80^{low} DC (in r.u.) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES IN DEPENDING ON THE AMOUNT OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП Patients with KC	
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ > 41,2% n = 14	CD14 ⁺ CD16 ⁺ < 41,2% n = 14
на CD83 ⁺ клетках on CD83 ⁺ cells			
CD80	4,26 (2,22-4,56)	5,39 (4,75-8,28) p ₁ = 0,003	5,99 (5,39-6,59) p ₁ = 0,017
CD83	8,64 (6,94-10,60)	10,32 (8,56-10,90)	8,76 (7,05-10,70)
CD86	17,90 (15,80-19,90)	17,00 (16,35-33,10)	15,30 (12,00-17,50)
HLA-DR	21,00 (14,20-22,40)	33,10 (27,15-38,30) p ₁ < 0,001	26,50 (19,30-29,20) p ₁ = 0,045
на CD80 ^{low} клетках on CD80 ^{low} cells			
CD80	1,54 (1,20-2,23)	1,90 (1,85-2,16) p ₁ = 0,002	1,94 (1,90-1,96) p ₁ = 0,004
CD83	5,71 (4,65-9,21)	8,82 (7,70-11,00)	7,18 (6,99-8,37)
CD86	6,58 (3,75-9,96)	9,61 (7,04-11,60) p ₁ = 0,044	6,70 (6,01-7,73) p ₂ = 0,037
HLA-DR	13,30 (7,68-15,50)	27,85 (20,45-35,90) p ₁ = 0,008	23,70 (20,50-26,80) p ₁ = 0,017

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table. 1.

В зависимости от содержания в крови больных РП CD14⁺CD16⁺ моноцитов значительно различается фенотип аДК в культуре клеток (табл. 4). Причем при различном уровне провоспалительных моноцитов в крови пациентов с РП содержание аДК с фенотипами CD83⁺CD80^{low}, CD83⁺CD80^{high} и CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺ в культуре клеток изменяется в противоположном направлении относительно контрольных значений. При этом обнаружено, что уровни экспрессии большинства исследуемых рецепторов на мембране аДК у больных с низким содержанием CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови снижены относительно показателей контрольных значений и уровней, выявленных у пациентов с высоким количеством провоспалительных моноцитов (табл. 5 и 6).

В процессе созревания аДК *in vitro* у лиц контрольной группы снижается процентное содер-

жание CD83⁺CD80^{low} клеток (p = 0,043) и повышается количество CD83⁺CD80^{high} клеток (p = 0,046) (см. табл. 1 и 4). Кроме того, у лиц контрольной группы в культуре аДК понижается относительное количество CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺ (p = 0,017), CD83⁺CD80^{high}HLA-DR⁺ (p = 0,009) и CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ клеток (p = 0,010), но при повышении уровня CD83⁺CD80^{high}CD86⁺ клеток (p = 0,039). У больных РП с высоким уровнем в крови CD14⁺CD16⁺ моноцитов при созревании аДК в культуре увеличивается относительное содержание CD83⁺CD80^{low} (p = 0,042), CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺ (p = 0,044) и CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ клеток (p = 0,046), но при понижении уровней CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} (p = 0,013) и CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺ клеток (p = 0,012). У обследованных пациентов с низким количеством в крови CD14⁺CD16⁺ моноцитов в культуре аДК увеличивается процентное содер-

ТАБЛИЦА 3. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ НА НЕЗРЕЛЫХ CD80^{high} И CD80^{high}CD86^{high} ДК (в о. е.), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВА CD14⁺CD16⁺ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РП, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. EXPRESSION LEVELS OF ANTIGENS ON IMMATURE CD80^{high} AND CD80^{high}CD86^{high} DC (in r. u.) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES IN DEPENDING ON THE AMOUNT OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП Patients with KC	
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ > 41,2% n = 14	CD14 ⁺ CD16 ⁺ < 41,2% n = 14
на CD80 ^{high} клетках on CD80 ^{high} cells			
CD80	4,75 (3,80-6,60)	7,06 (5,78-8,74) p ₁ = 0,003	6,18 (5,18-7,75) p ₁ = 0,028
CD83	6,44 (5,01-10,30)	7,62 (6,17-10,06)	7,23 (6,47-8,15)
CD86	6,04 (4,78-7,38)	10,57 (7,66-12,90) p ₁ = 0,039	8,01 (7,88-8,40) p ₁ = 0,004
HLA-DR	9,79 (5,23-14,50)	22,60 (17,65-29,40) p ₁ = 0,003	16,00 (14,30-22,50) p ₁ = 0,027 p ₂ = 0,041
на CD80 ^{high} CD86 ^{high} клетках on CD80 ^{high} CD86 ^{high} cells			
CD80	7,62 (3,34-8,29)	7,01 (6,57-9,50)	8,91 (7,86-9,80)
CD83	78,40 (70,20-115,0)	70,40 (53,90-95,65)	46,60 (40,20-55,00) p ₁ = 0,045 p ₂ = 0,048
CD86	12,10 (5,55-19,50)	11,70 (9,11-13,25)	9,76 (9,17-11,20)
HLA-DR	126,0 (125,0-221,0)	58,55 (41,10-103,0) p ₁ = 0,028	35,20 (33,40-44,20) p ₁ = 0,004 p ₂ = 0,039

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table. 1.

жение CD83⁺CD80^{high} клеток (p = 0,048) и понижается уровень CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺ клеток (p = 0,026).

При созревании (активации) дендритных клеток у лиц контрольной группы уровни экспрессии исследуемых рецепторов на CD83⁺ и CD80^{low} аДК не меняются (см. табл. 2 и 5). У больных РП при высоком уровне в крови CD14⁺CD16⁺ моноцитов увеличивается экспрессия молекул CD83 и CD86 на CD80^{low} аДК (p < 0,001 в обоих случаях). У обследованных пациентов с низким содержанием CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови при созревании дендритных клеток на поверхности CD83⁺ аДК снижается экспрессия CD83 (p = 0,028), CD86 (p = 0,041) и HLA-DR (p < 0,001). Кроме того, у лиц данной группы также понижается экспрес-

сия антигенов CD83 (p = 0,011), CD86 (p = 0,030) и HLA-DR (p < 0,001) на CD80^{low} аДК.

У лиц контрольной группы при созревании дендритных клеток на поверхности CD80^{high} аДК повышается экспрессия HLA-DR (p < 0,001) и понижается экспрессия CD83 по поверхности CD80^{high}CD86^{high} аДК (p = 0,039) (см. табл. 3 и 6). У больных РП с высоким уровнем содержания в крови CD14⁺CD16⁺ моноцитов при созревании дендритных клеток на поверхности CD80^{high} аДК повышается уровень CD80 (p < 0,001) и CD86 (p < 0,001), а на поверхности CD80^{high}CD86^{high} аДК — увеличивается плотность HLA-DR (p = 0,048). У пациентов с низким уровнем CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови при созревании дендритных клеток на поверхности CD80^{high} аДК снижается экспрессия CD83 (p = 0,035), CD86

ТАБЛИЦА 4. ФЕНОТИП АКТИВИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК (В %), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, У БОЛЬНЫХ РП С РАЗЛИЧНЫМ КОЛИЧЕСТВОМ CD14⁺CD16⁺ МОНОЦИТОВ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 4. PHENOTYPE OF ACTIVATED DENDRITIC CELLS (IN %) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC WITH DIFFERENT AMOUNTS OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП Patients with KC	
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ > 41,2% n = 14	CD14 ⁺ CD16 ⁺ < 41,2% n = 14
CD83 ⁺ CD80 ⁺	99,5 (98,7-99,7)	96,1 (91,3-97,8) p ₁ = 0,027	98,2 (93,7-99,2)
CD83 ⁺ CD80 ^{low}	31,8 (16,3-40,7)	60,4 (56,4-62,3) p ₁ = 0,025	12,1 (10,6-43,3) p ₁ = 0,009 p ₂ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high}	45,3 (26,5-55,9)	30,5 (27,0-36,5) p ₁ = 0,014	73,7 (48,6-81,9) p ₁ = 0,017 p ₂ < 0,001
CD83 ⁺ CD86 ⁺	99,9 (99,7-100,0)	99,7 (99,6-99,9)	99,9 (99,3-99,9)
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ^{high}	13,8 (6,6-35,0)	5,2 (3,2-6,9) p ₁ = 0,014	8,3 (7,7-11,0) p ₁ = 0,004 p ₂ < 0,001
CD83 ⁺ HLA-DR ⁺	99,8 (99,2-99,9)	99,7 (99,6-99,7)	99,6 (98,8-99,7)
CD83 ⁺ CD80 ^{low} HLA-DR ⁺	31,6 (16,2-40,3)	60,3 (56,4-62,3) p ₁ < 0,001	12,0 (10,5-23,3) p ₁ = 0,009 p ₂ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} HLA-DR ⁺	6,4 (5,2-7,9)	30,4 (26,4-36,2) p ₁ < 0,001	70,8 (48,2-81,5) p _{1,2} < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ^{high} HLA-DR ⁺	13,7 (6,7-35,0)	5,3 (3,41-6,8) p ₁ = 0,011	8,2 (7,6-10,8) p ₁ = 0,004 p ₂ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{low} CD86 ⁺	31,7 (14,9-40,6)	60,4 (56,4-62,3) p ₁ < 0,001	12,0 (10,6-23,4) p ₁ = 0,009 p ₂ < 0,001
CD83 ⁺ CD80 ^{high} CD86 ⁺	44,9 (26,5-55,9)	39,5 (35,9-41,7)	73,7 (48,5-81,9) p ₁ = 0,017 p ₂ < 0,001

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table. 1.

(p = 0,047) и HLA-DR (p = 0,019), а на поверхности CD80^{high}CD86^{high} аДК уменьшается уровень CD83 (p = 0,012).

Обсуждение

Функциональная активность дендритных клеток определяется целым комплексом молекул, представленных на их поверхности и осуществляющих костимуляцию и презентацию антигенов. При этом активность дендритноклеточной вакцины может определяться не только эффективностью цитокинового «коктейля», индуци-

рующего дифференцировку моноцитов в дендритные клетки в условиях *in vitro*, но и рядом патогенетических факторов *in vivo*. В частности, накопление в окружающей опухоль среде аденозина приводит к снижению функциональной активности ДК [25]. Например, в исследовании Веппасеуг и соавт. (2009) показано, что ганглиозиды, выделяемые клетками меланомы, индуцируют апоптоз дендритных клеток [8]. Однако известные механизмы и факторы защиты опухоли от воздействия иммунной системы могут воздействовать не только на дендритные клетки, но и на моноциты крови, осуществляя их «пере-

ТАБЛИЦА 5. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ НА ЗРЕЛЫХ CD83⁺ И CD80^{low} ДК (в о. е.), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВА CD14⁺CD16⁺ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РП, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 5. EXPRESSION LEVELS OF ANTIGENS ON MATURE CD83⁺ AND CD80^{low} DC (in r. u.) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES IN DEPENDING ON THE AMOUNT OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП Patients with KC	
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ > 41,2% n = 14	CD14 ⁺ CD16 ⁺ < 41,2% n = 14
на CD83 ⁺ клетках on CD83 ⁺ cells			
CD80	5,77 (4,94-7,29)	4,15 (4,06-4,99)	5,86 (3,80-7,15)
CD83	8,00 (6,95-10,65)	7,09 (6,84-7,41)	4,12 (3,28-4,97) p ₁ = 0,014 p ₂ = 0,028
CD86	20,65 (13,70-41,80)	12,40 (9,07-18,20) p ₁ = 0,044	8,76 (7,85-8,82) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,009
HLA-DR	15,15 (9,67-22,80)	21,50 (17,70-23,80) p ₁ = 0,027	9,62 (8,52-10,60) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,008
на CD80 ^{low} клетках on CD80 ^{low} cells			
CD80	1,52 (1,41-1,87)	2,43 (1,70-2,69) p ₁ = 0,045	1,83 (1,81-1,97)
CD83	5,71(4,87-6,33)	39,14 (35,42-41,68) p ₁ < 0,001	3,23 (2,84-3,36) p ₁ = 0,016 p ₂ < 0,001
CD86	5,71 (3,97-6,77)	38,78 (34,94-41,63) p ₁ < 0,001	3,30 (3,00-3,39) p ₁ = 0,007 p ₂ < 0,001
HLA-DR	10,50 (7,61-11,90)	18,40 (13,60-21,50) p ₁ = 0,014	7,99 (6,90-9,01) p ₁ = 0,039 p ₂ = 0,030

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table. 1.

программирование» и снижая функциональную активность дендритных клеток, которые из них дифференцируются. Нап и соавт. (2014) показали, что IL-10, продукция которого индуцируется гепатоклеточной карциномой, вызывает нарушение созревания и дифференцировку ДК, провоцируя преимущественное формирование клеток с толерогенным фенотипом [13].

При проведении настоящего исследования обнаружено, что у больных РП в периферической крови снижается содержание провоспалительных моноцитов (CD14⁺CD16⁺). При этом в общей группе обследованных больных были выделены (разделены по медиане) лица с вы-

соким (> 41,2%, что приближалось к значениям, выявленным у лиц контрольной группы) и низким количеством (< 41,2%, в 2 и более раз относительно контрольных значений) моноцитов с указанным фенотипом. У больных РП с высоким уровнем провоспалительных моноцитов в крови наблюдалось соответствующее контрольному диапазону содержание классических моноцитов (CD14⁺CD16⁺). Соответственно, у обследованных пациентов с низким уровнем провоспалительных моноцитов выявляется высокое содержание «классических» моноцитов. Различий у двух групп больных РП в относительном количестве моноцитов с фенотипом

ТАБЛИЦА 6. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ НА ЗРЕЛЫХ CD80^{high} И CD80^{high}CD86^{high} ДК (в о. е.), ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВА CD14⁺CD16⁺ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РП, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 6. EXPRESSION LEVELS OF ANTIGENS ON MATURE CD80^{high} AND CD80^{high}CD86^{high} DC (in r. u.) DIFFERENTIATED *IN VITRO* FROM BLOOD MONOCYTES IN DEPENDING ON THE AMOUNT OF CD14⁺CD16⁺ MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 31	Больные РП Patients with KC	
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ > 41,2% n = 14	CD14 ⁺ CD16 ⁺ < 41,2% n = 14
на CD80 ^{high} клетках on CD80 ^{high} cells			
CD80	5,35 (4,89-8,81)	39,33 (35,67-41,70) p ₁ < 0,001	6,01 (4,65-6,79) p ₂ < 0,001
CD83	6,41 (5,36- 7,15)	6,53 (5,72-6,74)	3,99 (3,33-4,48) p ₁ = 0,014 p ₂ = 0,025
CD86	6,44 (5,22-8,10)	39,69 (36,15-41,75) p ₁ < 0,001	6,44 (5,30-6,63) p ₂ < 0,001
HLA-DR	44,47 (25,07-55,33)	15,10 (14,50-17,10) p ₁ = 0,014	8,25 (7,03-8,51) p _{1,2} < 0,001
на CD80 ^{high} CD86 ^{high} клетках on CD80 ^{high} CD86 ^{high} cells			
CD80	6,25 (4,63-8,42)	6,96 (6,89-9,33)	7,03 (6,76-7,44)
CD83	46,85 (30,05-59,15)	85,20 (76,60-91,70) p ₁ = 0,009	26,30 (23,50-29,40) p ₁ = 0,019 p ₂ = 0,008
CD86	14,35 (9,19-19,25)	13,50 (13,20-22,70)	9,92 (8,81-10,40) p ₁ = 0,015 p ₂ = 0,032
HLA-DR	101,8 (76,40-116,5)	118,0 (105,0-148,0)	34,10(32,90-34,10) p _{1,2} < 0,001

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table. 1.

CD14^{dim}CD16⁺ не обнаружено. Также не выявлено различий между сформированными группами больных по процентному количеству моноцитов, экспрессирующих HLA-DR и CD64.

Исследование особенностей фенотипа ДК, полученных при дифференцировке из моноцитов крови в условиях *in vitro*, в зависимости от количества в крови провоспалительных моноцитов, у больных РП позволило обнаружить следующие закономерности. Так, фенотипический состав нДК слабо различается у больных РП в зависимости от количества провоспалительных моноцитов в крови. У обследованных пациентов с низким количеством провоспалительных моноцитов установлено только повышение содержания нДК с фенотипом CD83⁺CD80^{high}HLA-DR⁺ по сравнению с показателями больных с высо-

ким уровнем провоспалительных моноцитов. В целом у больных РП количество нДК с указанным фенотипом значительно выше, чем у лиц контрольной группы. Молекула CD83 является основным маркером ДК, относится к суперсемейству Ig и представляет собой гликозилированный трансмембранный белок с молекулярной массой около 45 кДа, принимает участие в презентации антигенов и инициации адаптивного иммунного ответа [9, 26]. CD80 (или B7.1) является гликозилированным одноцепочечным белком с молекулярной массой 60 кДа, который, совместно с CD86 (или B7.2), определяется как лиганд для CD28 и CD152 на поверхности Т-лимфоцитов [15, 27]. Считается, что CD80 обладает большим сродством к CD152 Т-лимфоцитов, взаимодействие с которым приводит к развитию

толерогенного эффекта, тогда как CD86 взаимодействует с CD28 и, соответственно, вызывает активацию Т-клеток [22]. HLA-DR относится к МНС II класса и участвует в процессах презентации антигенов [10, 19]. Особенностью фенотипа нДК у больных РП с высоким содержанием провоспалительных моноцитов в крови также является увеличение уровней CD86 на CD80^{low}, HLA-DR на CD80^{high} клетках, а также молекул CD83 и HLA-DR на CD80^{high}CD86^{high} нДК.

Независимо от содержания провоспалительных моноцитов в крови у больных РП относительно контрольных значений повышается количество нДК с фенотипом CD83⁺CD80^{high}, CD83⁺CD86⁺, CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}, CD83⁺CD80^{high}CD86^{high} HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{high}CD86⁺, но при понижении уровней CD83⁺CD80^{low}, CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ нДК. CD83⁺ нДК в общей группе обследованных пациентов сильнее экспрессируют молекулы CD80 и HLA-DR, CD80^{low} клетки — HLA-DR и CD80^{high} клетки — CD80. Следовательно, у больных РП при дифференцировке моноцитов формируется пул нДК, обладающих высокой способностью к презентации и одновременно к толерогенной стимуляции.

При созревании/активации ДК у здоровых людей в клеточной культуре наблюдается повышение процентного содержания CD83⁺CD80^{high} и CD83⁺CD80^{high}CD86⁺ аДК, но при снижении количества CD83⁺CD80^{low}, CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺, CD83⁺CD80^{high}HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ аДК. При этом фенотип аДК у больных РП значительно различается в зависимости от количества провоспалительных моноцитов в периферической крови. Так, в противоположном направлении относительно контрольных значений у больных РП изменяется количество CD83⁺CD80^{low}, CD83⁺CD80^{high}, CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}, CD83⁺CD80^{low}HLA-DR⁺, CD83⁺CD80^{high}CD86^{high}HLA-DR⁺ и CD83⁺CD80^{low}CD86⁺ аДК в культуре. Причем у пациентов с высоким уровнем провоспалительных моноцитов изменение фенотипа ДК в процессе их созревания определяется повышением доли клеток с низким уровнем экспрессии CD80 и снижением относительного содержания с высоким уровнем экспрессии данной молекулы. У больных с низким количеством крови провоспалительных моноцитов наблюдается обратная зависимость по изменению количества клеток с высоким и низким уровнем экспрессии поверхностного CD80. Выявленные особенности фенотипа аДК отражают тенденцию формирования клеток с толерогенной стимуляцией у больных РП с низким уровнем провоспалительных моноцитов.

В зависимости от содержания провоспалительных моноцитов в крови значительно различаются уровни экспрессии исследуемых маркеров на поверхности аДК. У больных РП с низким количеством CD14⁺CD16⁺ моноцитов в крови на поверхности CD83⁺ аДК уровень экспрессии CD86 почти в 1,5 раза ниже, чем при высоком содержании провоспалительных моноцитов, а уровень экспрессии HLA-DR — в 2 раза ниже. Следовательно, у больных РП при низком количестве провоспалительных моноцитов в крови формируется фенотип CD83⁺ аДК с низкими способностями к презентации антигена и стимуляции Т-лимфоцитов.

В двух группах больных РП значительно различается распределение экспрессии исследуемых маркеров на поверхности CD80^{low} и CD80^{high} аДК. Обнаружено, что при высоком уровне провоспалительных моноцитов в периферической крови экспрессия CD86 на CD80^{low} аДК более чем в 11 раз, а экспрессия HLA-DR — более чем в 2 раза по сравнению с выявленным у лиц с низким содержанием указанных моноцитов. Подобная тенденция в распределении уровней экспрессии CD86 и HLA-DR сохраняется и на CD80^{high} аДК, что, соответственно, определяет слабую функциональную активность аДК у больных РП с низким содержанием провоспалительных моноцитов.

Считается, что зрелые ДК с фенотипом CD80^{high}CD86^{high} обладают максимальным функциональным потенциалом [17, 18]. На аДК с указанным фенотипом у больных РП с высоким содержанием провоспалительных моноцитов в крови уровень экспрессии CD83 в 3,2 раза превышает таковой у пациентов с низким количеством CD14⁺CD16⁺ моноцитов, тогда как CD86 — в 1,4 раза и HLA-DR — в 3,5 раза. Такое распределение экспрессии данных рецепторов на CD80^{high}CD86^{high} аДК свидетельствует о повышенной способности к презентации антигена и формированию эффективного стимуляционного сигнала для Т-клеток у больных с высоким содержанием провоспалительных моноцитов.

Таким образом, у больных РП в периферической крови снижается количество CD14⁺CD16⁺ моноцитов (до 42% от уровня общих моноцитов) относительно контрольного диапазона. В связи с этим анализ зависимости фенотипа ДК, полученных из моноцитов в условиях *in vitro*, от количества провоспалительных моноцитов в крови был проведен путем сравнения показателей с высоким содержанием провоспалительных моноцитов в крови у больных РП (> 42%, приближается к уровню контрольного диапазона) и низким (< 42%). Установлено, что у больных РП с низким

количеством в крови провоспалительных моноцитов (< 42%) повышается содержание толерогенных нДК в клеточной культуре. Особенностью фенотипа нДК у пациентов с высоким содержанием провоспалительных моноцитов в крови (> 42%) является относительное увеличение экспрессии молекул, отвечающих за презентацию антигена и формирование костимуляционного сигнала. При созревании/активации фенотип ДК у больных РП с различным содержанием провоспалительных моноцитов различается сильнее. У больных с низким уровнем провоспалительных моноцитов в крови в клеточной культуре формируется пул зрелых ДК с низким уровнем экспрессии CD86 и HLA-DR, что, соответственно, указывает на низкий эффекторный потенциал этих ДК с точки зрения презентации антигена и костимуляции Т-клеток. У больных с высоким уровнем провоспалительных моноцитов в кле-

точной культуре формируется пул активированных ДК с высоким уровнем функциональной активности. Выявленные различия фенотипа ДК от субпопуляционного состава моноцитов крови у больных РП характеризуют механизмы программирования клеточной дифференцировки в зависимости от микроокружения, в том числе и патогенного характера (на фоне опухолевого роста).

Благодарности

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» (проект «Механизмы метаболического репрограммирования клеток врожденного иммунитета при опухолевом росте»).

Список литературы / References

1. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестичетного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
2. Леплина О.Ю., Старостина Н.М., Блинова Д.Д., Желтова О.И., Олейник Е.А., Тыринова Т.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Результаты пилотного клинического исследования вакцин на основе дендритных клеток в лечении рецидивирующей герпесвирусной инфекции // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 425-436. Lepkina O.Yu., Starostina N.M., Blinova D.D., Zheltova O.I., Oleinik E.A., Tyrinova T.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Results of a pilot clinical trial of dendritic cell based vaccines for treatment of recurrent herpesvirus infection. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 425-436. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-425-436.
3. Назаркина Ж.К., Заякина А.В., Лактионов П.П. Влияние условий созревания и способа нагрузки антигенами на получение иммунологически активных дендритных клеток // Молекулярная биология, 2018. Т. 52, № 2. С. 257-269. [Nazarkina Zh.K., Zayakina A., Laktionov P.P. Maturation and antigen loading protocols influence activity of anticancer dendritic cells. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2018, Vol. 52, no. 2, pp. 257-269. (In Russ.)]
4. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В. Особенности фенотипа дендритных клеток, дифференцированных из моноцитов крови, у больных раком почки // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 215-226. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V. Phenotypic peculiarities of dendritic cells differentiated from blood monocytes in patients with kidney cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 215-226. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-215-226.
5. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Мошев А.В., Кудрявцев И.В., Тоначева О.Г., Кощеев В.Н. Фенотипический состав и хемилюминесцентная активность моноцитов у больных почечноклеточным раком // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 2. С. 141-150. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Moshev A.V., Kudryavtsev I.V., Tonacheva O.G., Koshcheev V.N. Monocytes subpopulations and chemiluminescent activity in patients with renal cell carcinoma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 141-150. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-141-150.
6. Тыринова Т.В., Мишинов С.В., Леплина О.Ю., Альшевская А.А., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Калиновский А.В., Лопатникова Ю.А., Чернов С.В., Ступак В.В., Сенников С.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Роль TNF α /TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксического эффекта дендритных клеток против глиобластомных линий // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 353-364. [Tyrinova T.V., Mishinov S.V., Lepkina O.Yu., Alshevskaya A.A., Kurochkina Yu.D., Oleinik E.A., Kalinovskiy A.V., Lopatnikova Yu.A., Chernov S.V., Stupak V.V., Sennikov S.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Role of TNF α /TNF-R1-signaling pathway in cytotoxic activity of dendritic cells against glioblastoma cell lines. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 353-364. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-353-364.
7. Bai W.K., Zhang W., Hu B. Vascular endothelial growth factor suppresses dendritic cells function of human prostate cancer. *Onco. Targets Ther.*, 2018, Vol. 11, pp. 1267-1274.
8. Bennaceur K., Popa I., Chapman J.A., Migdal C., Péguet-Navarro J., Touraine J.L., Portoukalian J. Different mechanisms are involved in apoptosis induced by melanoma gangliosides on human monocyte-derived dendritic cells. *Glycobiology*, 2009, Vol. 19, no. 6, pp. 576-582.

9. Chen X., Hao S., Zhao Z., Liu J., Shao Q., Wang F., Sun D., He Y., Gao W., Mao H. Interleukin 35: Inhibitory regulator in monocyte-derived dendritic cell maturation and activation. *Cytokine*, 2018, Vol. 108, pp. 43-52.
10. de Goeje P.L., Klaver Y., Kaijen-Lambers M.E.H., Langerak A.W., Vroman H., Kunert A., Lamers C.H.J., Aerts J.G.J.V., Debets R., Hendriks R.W. Autologous Dendritic cell therapy in mesothelioma patients enhances frequencies of peripheral CD4 T cells expressing HLA-DR, PD-1, or ICOS. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2034. doi: 10.3389/fimmu.2018.02034.
11. Deicher A., Andersson R., Tingstedt B., Lindell G., Bauden M., Ansari D. Targeting dendritic cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell Int.*, 2018, Vol. 18, p. 85.
12. Finak G., Langweiler M., Jaimes M., Malek M., Taghiyar J., Korin Y., Raddassi K., Devine L., Obermoser G., Pekalski M.L., Pontikos N., Diaz A., Heck S., Villanova F., Terrazzini N., Kern F., Qian Y., Stanton R., Wang K., Brandes A., Ramey J., Aghaeepour N., Mosmann T., Scheuermann R.H., Reed E., Palucka K., Pascual V., Blomberg B.B., Nestle F., Nussenblatt R.B., Brinkman R.R., Gottardo R., Maecker H., McCoy J.P. Standardizing flow cytometry immunophenotyping analysis from the human immunophenotyping consortium. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 20686. doi: 10.1038/srep20686.
13. Han Y., Chen Z., Yang Y., Jiang Z., Gu Y., Liu Y., Lin C., Pan Z., Yu Y., Jiang M., Zhou W., Cao X. Human CD14⁺ CTLA-4⁺ regulatory dendritic cells suppress T-cell response by cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-dependent IL-10 and indoleamine-2,3-dioxygenase production in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2014, Vol. 59, no. 2, pp. 567-579.
14. Hsu J.L., Bryant C.E., Papadimitriou M.S., Kong B., Gasiorowski R.E., Orellana D., McGuire H.M., Groth B.F.S., Joshua D.E., Ho P.J., Larsen S., Iland H.J., Gibson J., Clark G.J., Fromm P.D., Hart D.N. A blood dendritic cell vaccine for acute myeloid leukemia expands anti-tumor T cell responses at remission. *Oncoimmunology*, 2018, Vol. 7, no. 4, e1419114. doi: 10.1080/2162402X.2017.1419114.
15. Ki K.K., Faddy H.M., Flower R.L., Dean M.M. Packed red blood cell transfusion modulates myeloid dendritic cell activation and inflammatory response *in vitro*. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2018, Vol. 38, no. 3, pp. 111-121.
16. Kwong C., Gilman-Sachs A., Beaman K. An independent endocytic pathway stimulates different monocyte subsets by the $\alpha 2$ N-terminus domain of vacuolar-ATPase. *Oncoimmunology*, 2013, Vol. 2, no. 1, e22978. doi: 10.4161/onci.22978.
17. Li J.G., Du Y.M., Yan Z.D., Yan J., Zhuansun Y.X., Chen R., Zhang W., Feng S.L., Ran P.X. CD80 and CD86 knockdown in dendritic cells regulates Th1/Th2 cytokine production in asthmatic mice. *Exp. Ther. Med.*, 2016, Vol. 11, no. 3, pp. 878-884.
18. Lim T.S., Goh J.K.H., Mortellaro A., Lim C.T., Hämmerling G.J., Ricciardi-Castagnoli P. CD80 and CD86 differentially regulate mechanical interactions of t-cells with antigen-presenting dendritic cells and b-cells. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, nj. 9, e45185. doi: 10.1371/journal.pone.0045185.
19. Loughland J.R., Minigo G., Burel J., Tipping P.E., Piera K.A., Amante F.H., Engwerda C.R., Good M.F., Doolan D.L., Anstey N.M., McCarthy J.S., Woodberry T. Profoundly reduced CD1c⁺ myeloid dendritic cell HLA-DR and CD86 expression and increased tumor necrosis factor production in experimental human blood-stage malaria infection. *Infect. Immun.*, 2016, Vol. 84, no. 5, pp. 1403-1412.
20. Ning Y., Shen K., Wu Q., Sun X., Bai Y., Xie Y., Pan J., Qi C. Tumor exosomes block dendritic cells maturation to decrease the T cell immune response. *Immunol. Lett.*, 2018, Vol. 199, pp. 36-43.
21. Qian C., Cao X. Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. *Semin. Immunol.*, 2018, Vol. 35, pp. 3-11.
22. Sansom D.M., Manzotti C.N., Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol.*, 2003, Vol. 24, no. 6, pp. 314-319.
23. Shang N., Fighini M., Shangguan J., Wang B., Sun C., Pan L., Ma Q., Zhang Z. Dendritic cells based immunotherapy. *Am. J. Cancer Res.*, 2017, Vol. 7, no. 10, pp. 2091-2102.
24. Song X., Ding Y., Liu G., Yang X., Zhao R., Zhang Y., Zhao X., Anderson G.J., Nie G. Cancer cell-derived exosomes induce mitogen-activated protein kinase-dependent monocyte survival by transport of functional receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, 2016, Vol. 291, no. 16, pp. 8453-8464.
25. Song X., Zhang Y., Zhang L., Song W., Shi L. Hypoxia enhances indoleamine 2,3-dioxygenase production in dendritic cells. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, no. 14, pp. 11572-11580.
26. Souto G.R., Matias M.D.P., Nunes L.F.M., Ferreira R.C., Mesquita R.A. Mature dendritic cell density is affected by smoking habit, lesion size, and epithelial dysplasia in oral leukoplakia samples. *Arch. Oral. Biol.*, 2018, Vol. 95, pp. 51-57.
27. Suryatenggara J., Wibowo H., Atmodjo W.L., Mathew G. Characterization of alpha-fetoprotein effects on dendritic cell and its function as effector immune response activator. *J. Hepatocell. Carcinoma*, 2017, Vol. 4, pp. 139-151.
28. Sutherland D.R., Ortiz F., Quest G., Illingworth A., Benko M., Nayyar R., Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2018, Vol. 94, no. 1, pp. 1-15.
29. Wang C., Pu J., Yu H., Liu Y., Yan H., He Z., Feng X. A dendritic cell vaccine combined with radiotherapy activates the specific immune response in patients with esophageal cancer. *J. Immunother.*, 2017, Vol. 40, no. 2, pp. 71-76.
30. Wu M.R., Zhang T., DeMars L.R., Sentman C.L. B7H6-specific chimeric antigen receptors lead to tumor elimination and host antitumor immunity. *Gene Ther.*, 2015, Vol. 22, no. 8, pp. 675-684.
31. Yanagisawa R., Koizumi T., Koya T., Sano K., Koido S., Nagai K., Kobayashi M., Okamoto M., Sugiyama H., Shimodaira S. WT1-pulsed dendritic cell vaccine combined with chemotherapy for resected pancreatic cancer in a phase I study. *Anticancer Res.*, 2018, Vol. 38, no. 4, pp. 2217-2225.

Авторы:

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

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

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

Поступила 09.11.2018
Отправлена на доработку 19.11.2018
Принята к печати 27.12.2018

Received 09.11.2018
Revision received 19.11.2018
Accepted 27.12.2018

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И КЛИНИКО- ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Павлова А.А.^{1,2}, Павлова И.Е.¹, Бубнова Л.Н.^{1,3}, Бессмельцев С.С.¹,
Карягина Е.В.⁴

¹ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

² Клиника высоких медицинских технологий имени Н.И. Пирогова (поликлиника, стационар) ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

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

⁴ СПб ГБУЗ «Городская больница № 15», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Множественная миелома — это наиболее часто встречающаяся форма парапротеинемических гемобластозов, которая отличается вариабельностью клинических проявлений, форм и вариантов течения. В развитии данного заболевания существенную роль играет недостаточная эффективность противоопухолевой иммунной защиты организма, а выживание миеломных клеток увеличивается при действии ростовых факторов, к которым относится в том числе целый ряд интерлейкинов. Цитокины и хемокины секретируются в ответ на межклеточные взаимодействия, стимулируя рост опухоли, ингибирование остеобластов и повышение активности остеокластов. Гены цитокинов обладают чрезвычайно высокой степенью аллельного полиморфизма. Количество вариабельных участков в одном гене может достигать нескольких десятков, и располагаться они могут в экзонах, интронах и промоторных регуляторных зонах. Известно, что одиночные нуклеотидные замены в промоторной области генов цитокинов в наибольшей степени влияют на скорость секреции и биологическую активность этих факторов. Поэтому изучение аллельных вариантов генов, определяющих базовый уровень продукции цитокинов, позволит установить новые иммуногенетические факторы, ассоциированные с высоким риском развития заболеваний, в патогенезе которых цитокины играют важную роль, в том числе и множественной миеломы. Проведено изучение взаимосвязи однонуклеотидного полиморфизма генов цитокинов (IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG) и клинико-лабораторных показателей (содержание сывороточного альбумина, β 2-микроглобулина и гемоглобина), определяющих степень тяжести течения заболевания у 80 больных множественной миеломой, проживающих в Северо-Западном регионе России. На основании полученных результатов установлено, что наличие в генотипе провоспалительных цитокинов предрасполагающих имму-

Адрес для переписки:

Павлова Анастасия Александровна
ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт
гематологии и трансфузиологии Федерального медико-
биологического агентства»
191024, Россия, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16.
Тел.: 8 (812) 717-08-90.
Факс: 8 (812) 451-90-52.
E-mail: nas-pavlova@yandex.ru

Address for correspondence:

Pavlova Anastasiya A.
Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology,
Federal Medical Biological Agency
191024, Russian Federation, St. Petersburg,
2nd Sovetskaya str., 16.
Phone: 7 (812) 717-08-90.
Fax: 7 (812) 451-90-52.
E-mail: nas-pavlova@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Павлова, И.Е. Павлова, Л.Н. Бубнова,
С.С. Бессмельцев, Е.В. Карягина «Взаимосвязь
однонуклеотидного полиморфизма генов цитокинов
и клинико-лабораторных показателей у больных
множественной миеломой» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 703–714.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-703-714
© Павлова А.А. и соавт., 2019

For citation:

A.A. Pavlova, I.E. Pavlova, L.N. Bubnova, S.S. Bessmeltsev,
E.V. Karyagina "Relationship between single nucleotide
polymorphisms in cytokine genes and clinical laboratory
parameters in patients with multiple myeloma", Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019,
Vol. 21, no. 4, pp. 703–714.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-703-714
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-703-714

ногенетических факторов: IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG или IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT или IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG – ассоциировано с низким уровнем альбумина (< 3,5 г/дл) и высоким уровнем β 2-микроглобулина (> 5,5 мг/л). Сочетание всех четырех «негативных» гомозигот (IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG) увеличивает шанс снижения уровня альбумина в 6 раз ($p < 0,05$), сочетания гомозигот IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG увеличивает шанс повышения уровня β 2-микроглобулина (> 5,5 мг/л) более чем в 2 раза, что позволяет рассматривать генотипы IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG как дополнительные негативные иммуногенетические факторы прогноза течения множественной миеломы.

Ключевые слова: множественная миелома, цитокины, однонуклеотидный полиморфизм, гены, интерлейкины, альбумин, бета-2-микроглобулин

RELATIONSHIP BETWEEN SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN CYTOKINE GENES AND CLINICAL LABORATORY PARAMETERS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

Pavlova A.A.^{a, b}, Pavlova I.E.^a, Bubnova L.N.^{a, c}, Bessmeltsev S.S.^a, Karyagina E.V.^c

^a Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

^b N. Pirogov Clinic of High Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

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

^d Municipal Hospital No. 15, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Multiple myeloma is the most common form of paraproteinemic hemoblastosis, which is characterized by variability of clinical manifestations, forms, and variants. Limited efficiency of antitumor immune protection in the patient plays an important role in progression of this disease. Survival of myeloma cells is promoted by some growth factors, including a number of interleukins. Cytokines and chemokines are secreted in response to intercellular interactions and stimulate tumor growth, inhibition of osteoblasts and increase of the osteoclastic activity. Cytokine genes show a significant allelic polymorphism. A single gene may exhibit numerous polymorphic sites located in exons, introns and promoter regulatory areas. Single nucleotide substitutions in the promoter region of cytokine genes are known to have a huge impact upon secretion and biological activity of these factors. Therefore, a study of allelic gene variants determining the levels of cytokine production will allow of establishing new immunogenetic factors associated with a high risk of disease development, including multiple myeloma. We have studied single nucleotide polymorphism in cytokine genes (IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, and IL-6 nt565 GG), and clinical laboratory parameters (serum levels of albumin, β 2-microglobulin, and hemoglobin) determining severity grade of multiple myeloma in 80 patients living in the North-Western region of Russia. It was found that the presence of certain cytokine gene variants, i.e., IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG or IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT or IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG was associated with low albumin levels (< 3.5 g/DL), and high levels of β 2-microglobulin (> 5.5 mg/l). A combination of all the four negative variants in homozygous state (IL-1 α TT -889, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG and IL-6 nt565 GG) increases the chance of six-fold reduction of albumin levels ($p < 0.05$); combinations of homozygous IL-1 α TT -889, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG. and IL-6 nt565 GG are associated with increased chance of high-level β 2-microglobulin (> 5.5 mg/l) by more than two times. This data allow to consider IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, and IL-6 nt565 GG genotypes additional negative immunogenetic factors in the prognosis of multiple myeloma.

Keywords: multiple myeloma, single nucleotide polymorphism, genes, interleukins, albumin, beta 2-microglobulin

Введение

Множественная миелома (ММ) — наиболее часто встречающаяся форма парапротеинемических гемобластозов. Это заболевание отличает-

ся вариабельностью клинических проявлений, форм и вариантов течения, что обусловлено как особенностями клеток опухолевого клона, так и степенью резистентности организма индивидуума к развитию неоплазии [9].

Для ММ характерны неконтролируемая пролиферация клональных клеток, обусловленная хромосомными нарушениями, патология стромального микроокружения и присутствие моноклонального протеина в крови и/или моче [1, 2]. Этапы развития клона патологических миеломных клеток из клетки-предшественницы представлены на рисунке 1 [11].

Однако в развитии множественной миеломы, наряду с генетическими поломками и нарушениями нормального функционирования костно-мозгового микроокружения, существенную роль играет и недостаточная эффективность противоопухолевой иммунной защиты организма [10]. Выживание миеломных клеток увеличивается при действии ростовых факторов, к которым относится в том числе целый ряд интерлейкинов (IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-12) [1, 2, 6]. Миеломные клетки взаимодействуют со многими клеточными компонентами костного мозга, включая остеокласты, остеобласты, мезенхимальные стволовые клетки, стромальные клетки и эндотелиальные клетки сосудов. Цитокины и хемокины секретируются в ответ на эти межклеточные взаимодействия, что приводит к росту опухоли, ингибированию остеобластов и повышению активности остеокластов, кроме того, цитокины могут индуцировать лекарственную устойчивость (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки) [15]. Индукция роста клеток ММ происходит в первую очередь за счет таких цитокинов, как интерлейкин-6 (IL-6), инсулиноподобный фактор

роста-1 (IGF-1), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор некроза опухоли- α (TNF α) и стромальный клеточный фактор-1 (SDF-1).

Усиление активности остеокластов вызвано различными остеокластактивирующими факторами — макрофагальным белком воспаления-1 α (MIP-1 α), фактором роста гепатоцитов (HGF), членом суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (RANKL), VEGF, TNF α , IL-1 β и IL-6, что ведет к клеточному росту и выживанию клеток ММ. Ингибирование дифференцировки остеобластов вызывают такие факторы, как IL-3, IL-7, Runx2/Cbfa1 и Wnt (в частности, у пациентов с литическими поражениями костей значительно экспрессируется ингибитор дифференциации остеобластов — протеин dickkopf-1 (DKK1) — антагонист передачи wnt-сигнала) [15].

Гены цитокинов обладают чрезвычайно высокой степенью аллельного полиморфизма. Количество вариабельных участков в одном гене может достигать нескольких десятков, и располагаться они могут в кодирующих областях (экзонах), а также в интронах и промоторных регуляторных зонах. Известно, что одиночные нуклеотидные замены (single nucleotide polymorphisms — SNP) в промоторной области генов цитокинов в наибольшей степени влияют на скорость секреции и биологическую активность этих факторов [3, 4]. Поэтому изучение аллельных вариантов генов, определяющих базовый уровень продукции цитокинов, позволит установить новые иммуногенетические факторы, ассоциированные с вы-

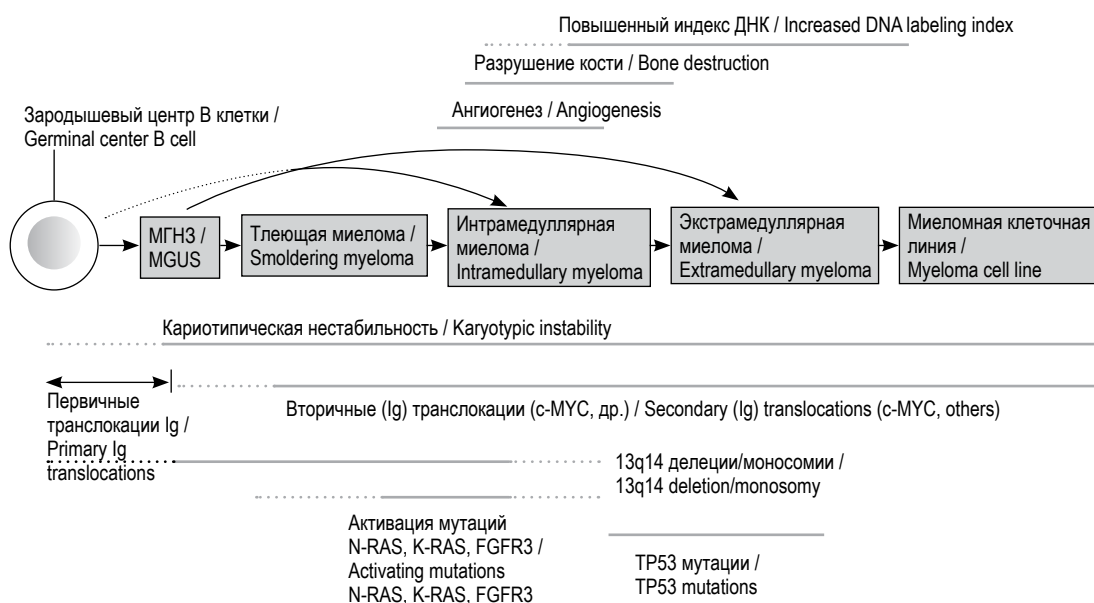


Рисунок 1. Патогенетическая прогрессия множественной миеломы (Ig-иммуноглобулины)

Figure 1. Pathogenetic progression of multiple myeloma (Ig-immunoglobulins)

соким риском развития заболеваний, в патогенезе которых цитокины играют важную роль, в том числе и множественной миеломы. Ранее нами было показано, что наличие у индивидуумов, проживающих в Северо-Западном регионе России, генотипов IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG является predisполагающим иммуногенетическим фактором развития ММ, а TGF- β 1 codon 25 GG и IL-4 -33 CC — протективным [7, 18].

Классификация ММ всегда отличалась от классификаций других заболеваний. Долгое время стандартом являлась система стадирования по B.G.M. Durie — S.E. Salmon (1975), основанная на представлении об опухолевой прогрессии и корреляции между массой опухоли и клиническими проявлениями. Но в настоящее время чаще используется обновленная международная система стадирования ММ (Revised international staging system — R-ISS), предложенная группой по изучению миеломы (International myeloma working group — IMWG) в 2014 г. и дополненная Европейским обществом медицинской онкологии (European society for medical oncology — ESMO) в 2017 г. Эта система базируется на определении сывороточных концентраций двух показателей: альбумина и β 2-микроглобулина [16, 17]. Так, для стадии I ММ характерны следующие показатели: уровень гемоглобина ≥ 10 г/дл; уровень альбумина $\geq 3,5$ г/дл; уровень β 2-микроглобулина $< 3,5$ мг/л. Для стадии II ММ — уровень гемоглобина, показатели которого не укладываются ни в I, ни в III стадии; уровень альбумина $< 3,5$ г/дл; уровень β 2-микроглобулина $< 3,5$ мг/л или 3,5–5,5 мг/л. Для стадии III ММ — уровень гемоглобина $\leq 8,5$ г/дл; уровень β 2-микроглобулина $> 5,5$ мг/л.

Уровень сывороточного β 2-микроглобулина косвенно отражает объем клеточной опухолевой массы ($> 1,2$ клетки $10^{12}/м^2$) и нарушение функции почек. А низкий уровень сывороточного альбумина при ММ характеризует нарушения функции печени, степень тяжести костной болезни и зачастую бывает опосредован высоким уровнем провоспалительных цитокинов, например IL-6, секретируемым как миеломными клетками, так и микроокружением [11, 14, 17]. Инфильтрация миеломными клетками костного мозга вызывает повреждение эритроидного ростка костного мозга, что приводит к снижению уровня гемоглобина и количества эритроцитов, вызывая развитие хронической тканевой гипоксии, слабости, головкружения и бледности кожных покровов.

Безусловно, иммуногенетические факторы predisположенности человека к развитию того или иного заболевания не являются решающими, поскольку для реализации болезни в развернутую клиническую форму необходимо участие

разрешающих факторов [8]. Однако установлено, что если заболевание, ассоциированное с теми или иными иммуногенетическими маркерами, развивается у индивидуумов, имеющих эти маркеры, то течение заболевания отличается большей тяжестью и развитием осложнений. Кроме того, поиск дополнительных иммуногенетических прогностических критериев, позволяющих выделить среди больных ММ группы повышенного риска, необходим, поскольку это позволит с большей точностью стратифицировать больных ММ на группы риска и оптимизировать терапию.

Целью настоящего исследования явилось определение взаимосвязи генотипов провоспалительных цитокинов (IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG) с содержанием альбумина, β 2-микроглобулина и гемоглобина у больных ММ Северо-Западного региона России.

Материалы и методы

Обследовано 80 больных ММ, средний возраст пациентов составил $69,6 \pm 8,6$ лет (из них 54 женщины и 26 мужчин), все пациенты были жителями Северо-Западного региона России и считали себя русскими. Пациенты с ММ проходили обследование и лечение в клиническом отделе химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России и в отделении гематологии СПб ГБУЗ «Городская больница № 15». Диагноз симптоматической ММ был верифицирован на основании критериев, разработанных EBMT/IBMTR/ABMTR [12, 13].

Для получения ДНК необходимого качества и в нужном количестве применяли метод выделения ДНК из ядродержащих клеток периферической крови на микроцентрифужных колонках с силикагелевой мембраной. Геномное типирование проводили методом, основанном на полимеразной цепной реакции с применением аллелеспецифических праймеров (PCR-SSP). Визуализацию результатов PCR-SSP осуществляли посредством горизонтального электрофореза в агарозном геле (рис. 3).

На всех этапах молекулярно-генетического исследования использовались стандартные коммерческие наборы реагентов. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью GraphPad QuickCalcs. Отклонения от распределения закона Харди–Вайнберга рассчитывали методом хи-квадрат, значения при $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Для статистической оценки связи между определенным генотипом и заболеванием ММ использовали показатель отношения шансов заболевания (OR) с 95% доверительным интервалом

(CI). Статистически значимыми считали различия сравниваемых величин при $p < 0,05$, при условии, что значения 95% CI не пересекают 1. Отношения шансов рассчитывали по формуле: $OR = (a*d)/(b*c)$, где a — есть фактор риска и есть исход, b — есть фактор риска, но нет исхода, c — нет фактора риска, но есть исход, d — нет фактора риска, нет исхода.

Результаты

Мы проанализировали уровни альбумина, β_2 -микроглобулина и гемоглобина у пациентов с наличием иммуногенетических факторов, ассоциированных с развитием ММ (IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG) и без таковых в генотипе.

Больные ММ, у которых выявлены вышеперечисленные генотипы, были разделены на четыре группы: к 1-ой группе отнесены пациенты с ММ, у которых определены в гомозиготном состоянии: IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG (11% от всех обследованных пациентов с ММ). Вторую группу составили больные, у которых в генотипе присутствовали IL-1 α -889 TT и IL-1 β +3962 TT (18%). В третью группу включены лица, в генотипе которых определены IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG (30%). К четвертой группе мы отнесли тех пациентов, у которых не были выявлены какие-либо иммуногенетические факторы, ассоциированные с развитием ММ (19%). Восемнадцать пациентов с ММ из 80 обследованных имели в генотипе, наряду с predisposing факторами — гомозиготами по IL-1 α , IL-1 β , IL-6, и протективные по IL-4 и TNF β 1, поэтому они не были включены ни в одну из сравниваемых групп.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, наименьшее значение уровня альбумина было выявлено в 1-ой группе пациентов и составило 3,34 г/дл. У пациентов из 2-ой и 3-ей групп уровень альбумина был одинаков — 3,5 г/дл, тогда как в 4 группе — 3,9 г/дл. Таким образом, сред-

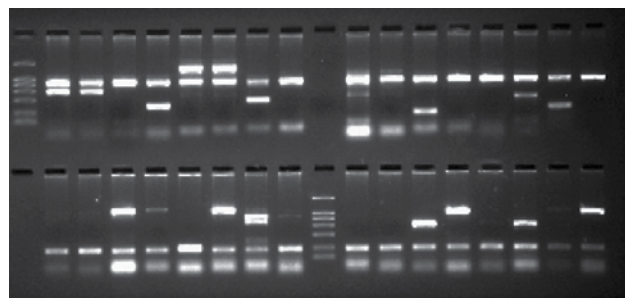


Рисунок 3. Электрофорез в агарозном геле с добавлением этидия бромида

Figure 3. Agarose gel electrophoresis with ethidium bromide

ние величины уровня альбумина в 1-3 группах больных с различным сочетанием «негативных» генотипов были достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в 4-ой группе (без иммуногенетических факторов, ассоциированных с развитием ММ).

На рисунке 4 показана доля пациентов с разным уровнем альбумина в каждой из выделенных групп больных. В трех группах пациентов, с наличием «негативных» вариантов генотипа провоспалительных цитокинов, доля пациентов с низкими уровнями альбумина (до 3,5 г/дл) была существенно выше, чем в группе, состоящей из пациентов, не имеющих «негативных» гомозигот. Чаще всего низкий уровень альбумина регистрировался у пациентов 1-ой группы с наличием всех четырех вариантов гомозигот в генотипе (IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG), $p < 0,01$. Более чем в два раза чаще низкий уровень альбумина ($> 3,5$ г/дл) выявлялся как во второй (наличие IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT), так и в 3-ей группе (наличие IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG), по сравнению с пациентами 4-ой группы, $p < 0,05$.

При этом высокий уровень альбумина (более 3,5 г/дл) существенно чаще регистрировался у пациентов с генотипом без «негативных» гомозигот провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-6 ($p < 0,05$). Меньше всего пациентов с высокими уровнями данного белка было обнаружено в 1-ой

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ УРОВНЯ АЛЬБУМИНА У ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

TABLE 1. MEDIAN ALBUMIN LEVELS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

	1 гр. пациентов 1 st group of patients n = 9 (11%)	2 гр. пациентов 2 nd group of patients n = 14 (18%)	3 гр. пациентов 3 rd group of patients n = 24 (30%)	4 гр. пациентов 4 th group of patients n = 15 (19%)
Уровень альбумина, г/дл Albumin level, g/dl	3,34±0,08*	3,49±0,14*	3,53±0,07*	3,87±0,09

Примечание. * — достоверные отличия, $p \leq 0,05$.

Note. *, significant differences, $p \leq 0.05$.

группе пациентов (0,33) по отношению к остальным больным с ММ (0,74), $p < 0,05$. Доля таких пациентов во 2-ой и 3-ей группах была практически одинаковой — 0,43 и 0,42 соответственно ($p < 0,05$).

Далее в работе был проанализирован уровень $\beta 2$ -микроглобулина в тех же четырех группах пациентов.

Как видно из данных, представленных в таблице 2, наиболее высокий уровень $\beta 2$ -

ТАБЛИЦА 2. СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ УРОВНЯ $\beta 2$ -МИКРОГЛОБУЛИНА У ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

TABLE 2. MEDIAN $\beta 2$ -MICROGLOBULIN LEVELS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

	1 гр. пациентов 1 st group of patients, n = 9 (11%)	2 гр. пациентов 2 nd group of patients, n = 14 (18%)	3 гр. пациентов 3 rd group of patients, n = 24 (30%)	4 гр. пациентов 4 th group of patients, n = 15 (19%)
Уровень $\beta 2$ -микроглобулина, мг/л $\beta 2$ -microglobulin level, mg/l	5,54 $\pm$ 0,56	5,21 $\pm$ 0,40	5,34 $\pm$ 0,41	4,88 $\pm$ 0,30

ТАБЛИЦА 3. СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ УРОВНЯ ГЕМОГЛОБИНА У ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

TABLE 3. MEDIAN HEMOGLOBIN LEVELS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

	1 гр. пациентов 1 st group of patients, n = 9 (11%)	2 гр. пациентов 2 nd group of patients, n = 14 (18%)	3 гр. пациентов 3 rd group of patients, n = 24 (30%)	4 гр. пациентов 4 th group of patients, n = 15 (19%)
Уровень гемоглобина, г/л Hemoglobin level, g/l	112 $\pm$ 4,47	120 $\pm$ 5,78	120 $\pm$ 3,61	121 $\pm$ 3,6

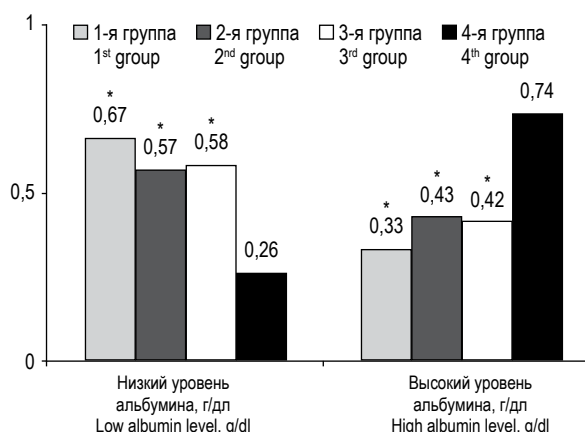


Рисунок 4. Частота встречаемости пациентов с низким (< 3,5 г/дл) и высоким (> 3,5 г/дл) уровнем альбумина в группах с определенным генотипом провоспалительных цитокинов

Примечание. * – достоверные отличия, $p \leq 0,05$. 1 гр. – наличие IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG; 2 гр. – наличие IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT; 3 гр. – наличие IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG; 4 гр. – без иммуногенетических факторов, ассоциированных с ММ.

Figure 4. Frequency of patients with low (< 3.5 g/dl) and high (> 3.5 g/dl) albumin levels in groups with specific genotypes of pro-inflammatory cytokines

Note. *, significant differences, $p \leq 0.05$. 1st gr., with IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG; 2nd gr., with IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT; 3rd gr., with IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG; 4th gr., without immunogenetic factors associated with MM.

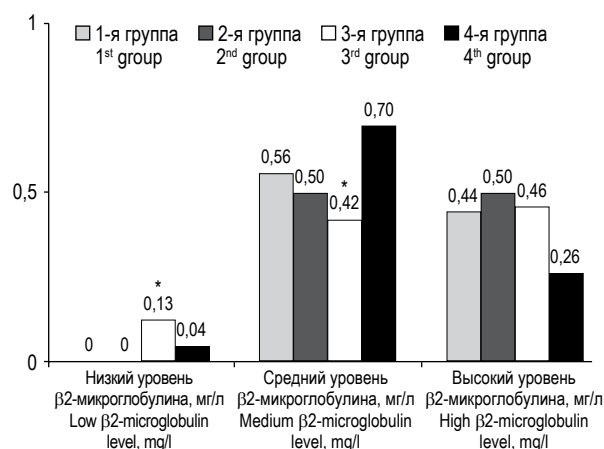


Рисунок 5. Частота встречаемости пациентов с низким (< 3,5 мг/л), средним (3,5-5,5 мг/л) и высоким (> 5,5 мг/л) уровнем $\beta 2$ -микроглобулина в группах с определенным генотипом провоспалительных цитокинов

Примечание. * – достоверные отличия, $p \leq 0,05$. 1 гр. – наличие IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG; 2 гр. – наличие IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT; 3 гр. – наличие IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG; 4 гр. – без иммуногенетических факторов, ассоциированных с ММ.

Figure 5. Frequency of patients with low (< 3.5 mg/l), medium (3.5-5.5 mg/l) and high (> 5.5 mg/l) $\beta 2$ -microglobulin levels in groups with specific genotypes of pro-inflammatory cytokines

Note. *, significant differences, $p \leq 0.05$. 1st gr., with IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG; 2nd gr., with IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT; 3rd gr., with IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG; 4th gr., without immunogenetic factors associated with MM.

микроглобулина был в первой группе (5,5 мг/л). Во 2-ой группе он составлял 5,2 мг/л, в третьей – 5,3 мг/л, а в 4-ой средний уровень β 2-микроглобулина равнялся 4,9 мг/л (достоверно значимых различий между группами выявлено не было, $p > 0,05$).

На рисунке 5 представлена доля пациентов с низким ($< 3,5$ мг/л), средним (3,5–5,5 мг/л) и высоким ($> 5,5$ мг/л) уровнем β 2-микроглобулина в каждой выделенной группе больных ММ. В первой и второй группах не было пациентов с низким уровнем β 2-микроглобулина, тогда как в группе больных ММ с наличием гомозигот IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG низкий уровень данного маркера встречался в 0,13, а в 4-ой группе – в 0,04 случаев ($p < 0,05$).

Частота выявления пациентов со средним уровнем β 2-микроглобулина (3,5–5,5 мг/л) варьировала в четырех группах больных с ММ от 0,42 до 0,70. Чаще всего (0,70) средний уровень β 2-микроглобулина (3,5–5,5 мг/л) определялся в группе больных, не имеющих иммуногенетических факторов, ассоциированных с развитием ММ, тогда как реже всего он определялся в 3-ей группе пациентов (0,42; $p < 0,05$). Высокий уровень данного белка реже всего встречался в четвертой группе пациентов (0,26). А в группе с наличием гомозигот IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT (3 группа) регистрировался с частотой, равной 0,50.

В исследовании была проанализирована взаимосвязь между уровнем гемоглобина и наличием

ТАБЛИЦА 4. ОТНОШЕНИЕ ШАНСОВ СРЕДИ БОЛЬНЫХ ММ С НИЗКИМ ($< 3,5$ г/дл) И ВЫСОКИМ ($> 3,5$ г/дл) УРОВНЯМИ АЛЬБУМИНА

TABLE 4. ODDS RATIO AMONG MM PATIENTS WITH LOW (< 3.5 g/dl) AND HIGH (> 3.5 g/dl) ALBUMIN LEVELS

АЛЬБУМИН (низкий уровень) Albumin (low level)				
Предрасполагающие генотипы Predisposing genotypes	Отношение шансов (OR) Odds ratio (OR)	95% доверительный интервал (CI), нижняя/верхняя границы 95% confidence interval (CI), lower/upper limits	Стандартная ошибка (SE) Standard error (SE)	Этиологическая доля (EF), % Etiologic fraction (EF), %
IL-1 α -889 TT IL-1 β +3962 TT IL-6 -174 GG IL-6 nt565 GG	5,67*	1,07/30,09	0,85	82
IL-1 α -889 TT IL-1 β +3962 TT	3,78	0,92/15,47	0,72	74
IL-6 -174 GG IL-6 nt565 GG	3,97*	1,15/13,64	0,63	75
АЛЬБУМИН (высокий уровень) Albumin (high level)				
Предрасполагающие генотипы Predisposing genotypes	Отношение шансов (OR) Odds ratio (OR)	95% доверительный интервал (CI), нижняя/верхняя границы 95% confidence interval (CI), lower/upper limits	Стандартная ошибка (SE) Standard error (SE)	Этиологическая доля (EF), % Etiologic fraction (EF), %
IL-1 α -889 TT IL-1 β +3962 TT IL-6 -174 GG IL-6 nt565 GG	0,18*	0,03/0,94	0,85	–
IL-1 α -889 TT IL-1 β +3962 TT	0,27	0,07/1,08	0,72	–
IL-6 -174 GG IL-6 nt565 GG	0,25*	0,07/0,87	0,63	–

Примечание. * – достоверные отличия, $p \leq 0,05$.

Note. *, significant differences, $p \leq 0.05$.

иммуногенетических факторов, ассоциированных с развитием ММ. Показатели гемоглобина в выделенных четырех группах больных представлены в таблице 3. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что достоверных различий по уровню гемоглобина между выделенными группами больных нет, хотя следует отметить, что наименьший уровень гемоглобина установлен в 1-ой группе обследованных пациентов.

Как видно из данных, представленных на рисунке 6, различия частоты выявления больных с высоким и низким уровнем гемоглобина в выделенных группах пациентов статистически не значимы. Низкий уровень гемоглобина встречался с частотой 0,13-0,22 во всех группах больных ММ, тогда как высокий уровень гемоглобина выявлялся в 0,78-0,87 случаев.

Нами были рассчитаны отношения шансов (OR) обнаружения нарушений содержания альбумина, β 2-микроглобулина и гемоглобина у больных с различными сочетаниями «негативных» гомозигот в генотипе (табл. 4-6).

Как видно из данных, представленных в таблице 4, шанс выявления низкого уровня альбумина увеличивается при большем сочетании «негативных» генотипов. Так, шанс, что альбумин у пациента будет ниже 3,5 г/дл при сочетании гомозигот IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG в одном

генотипе, увеличивается почти в 4 раза по сравнению с пациентами без данных иммуногенетических факторов, ассоциированных с развитием ММ ($p < 0,05$).

Если же у пациента обнаруживается сочетание всех четырех гомозигот, ассоциированных с ММ (IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG), то шанс снижения альбумина увеличивается практически в 6 раз ($p < 0,05$).

В таблице 5 представлены данные отношения шансов в двух группах пациентов – со средним (3,5-5,5 мг/л) и высоким ($> 5,5$ мг/л) уровнями β 2-микроглобулина. Данные по группе больных с низким уровнем β 2-микроглобулина не представлены, поскольку в группах с сочетанием/присутствием гомозигот IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG показатели не позволили рассчитать OR.

Как видно из данных, представленных в таблице 5, наличие в генотипе сочетания гомозигот IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG или IL-1 α -889 TT и IL-1 β +3962 TT или IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG у пациентов с ММ указывает на то, что шанс значительного повышения уровня β 2-микроглобулина ($> 5,5$ мг/л) увеличивается более чем в 2 раза. Однако для получения достоверных отличий необходимо увеличение выборки пациентов.

В таблице 6 представлены данные OR в группах больных с показателями гемоглобина < 100 г/л и > 100 г/л, свидетельствующие о том, что шансы снижения уровня гемоглобина (менее 100 г/л) у больных, в генотипе которых сочетаются IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG, в 1,5 раза выше, чем у остальных пациентов. Однако для получения достоверных отличий, как и в случае сравнения содержания β 2-микроглобулина, необходимо увеличение выборки пациентов.

Заключение

Полученные нами данные позволяют утверждать, что у больных ММ с наличием в генотипе провоспалительных цитокинов предрасполагающих иммуногенетических факторов: IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG или IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT или IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG достоверно чаще, чем у других пациентов, определяется низкий уровень альбумина ($< 3,5$ г/дл). Отсутствие указанных генотипов у пациентов ассоциировано с уровнем альбумина более 3,5 г/дл. Шанс того, что низкий уровень альбумина у пациентов с сочетанием IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG в одном генотипе будет почти в 4 раза выше, чем у пациентов без них ($p < 0,05$). Тогда как сочетание всех четырех «негативных» гомозигот (IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962

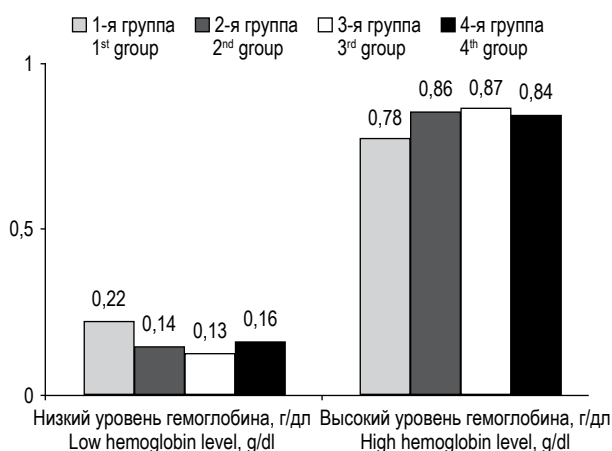


Рисунок 6. Частота встречаемости пациентов с низким (< 100 г/л) и высоким (> 100 г/л) уровнем гемоглобина в группах с определенным генотипом провоспалительных цитокинов

Примечание. 1 гр. – наличие IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG; 2 гр. – наличие IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT; 3 гр. – наличие IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG; 4 гр. – без иммуногенетических факторов, ассоциированных с ММ.

Figure 6. Frequency of patients with low (< 100 g/l) and high (> 100 g/l) hemoglobin levels in groups with specific genotypes of pro-inflammatory cytokines

Note. 1st gr., with IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG; 2nd gr., with IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT; 3rd gr., with IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG; 4th gr., without immunogenetic factors associated with MM.

ТАБЛИЦА 5. ОТНОШЕНИЕ ШАНСОВ СРЕДИ БОЛЬНЫХ ММ СО СРЕДНИМ (3,5-5,5 мг/л) И ВЫСОКИМ (> 5,5 мг/л) УРОВНЯМИ β 2-МИКРОГЛОБУЛИНА

TABLE 5. ODDS RATIO AMONG MM PATIENTS WITH MEDIUM (3.5-5.5 mg/l) AND HIGH (> 5.5 mg/l) β 2-MICROGLOBULIN LEVELS

β2-микροглобулин (средний уровень) β 2-microglobulin (medium level)				
Предрасполагающие генотипы Predisposing genotypes	Отношение шансов (OR) Odds ratio (OR)	95% доверительный интервал (CI), нижняя/верхняя границы 95% confidence interval (CI), lower/upper limits	Стандартная ошибка (SE) Standard error (SE)	Этиологическая доля (EF), % Etiologic fraction (EF), %
IL-1 α -889 TT IL-1 β +3962 TT IL-6 -174 GG IL-6 nt565 GG	0,55	0,11/2,67	0,81	–
IL-1 α -889 TT IL-1 β +3962 TT	0,44	0,11/1,73	0,70	–
IL-6 -174 GG IL-6 nt565 GG	0,31	0, 90/1,04	0,61	–
β2-микροглобулин (высокий уровень) β 2-microglobulin (high level)				
Предрасполагающие генотипы Predisposing genotypes	Отношение шансов (OR) Odds ratio (OR)	95% доверительный интервал (CI), нижняя/верхняя границы 95% confidence interval (CI), lower/upper limits	Стандартная ошибка (SE) Standard error (SE)	Этиологическая доля (EF), % Etiologic fraction (EF), %
IL-1 α -889 TT IL-1 β +3962 TT IL-6 -174 GG IL-6 nt565 GG	2,27	0,45/11,35	0,82	56
IL-1 α -889 TT IL-1 β +3962 TT	2,83	0,70/11,51	0,72	65
IL-6 -174 GG IL-6 nt565 GG	2,40	0,70/8,20	0,63	58

TT, IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG) увеличивает шанс снижения уровня альбумина практически в 6 раз ($p < 0,05$).

Наличие в генотипе сочетания гомозигот IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG у пациентов с ММ указывает на то, что шанс повышения уровня β 2-микροглобулина (> 5,5 мг/л) увеличивается более чем в 2 раза.

Наличие или отсутствие тех или иных гомозигот провоспалительных и регуляторных цитокинов, являющихся иммуногенетическими факторами, ассоциированными с развитием ММ, не влияет на уровень гемоглобина у пациентов с множественной миеломой. Но тем не менее шансы снижения гемоглобина (менее 100 г/л)

у больных, имеющих в своем генотипе IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG, IL-6 nt565 GG, в 1,5 раза выше, чем в группе без таких вариантов.

Поскольку, согласно шкале ISS, уровень β 2-микροглобулина более 5,5 мг/л и уровень альбумина менее 3,5 г/дл являются неблагоприятными прогностическими факторами развития множественной миеломы, полученные в настоящем исследовании результаты позволяют отнести генотипы IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6 -174 GG и IL-6 nt565 GG не только к факторам, ассоциированным с предрасположенностью, но и к дополнительным негативным показателям течения ММ.

ТАБЛИЦА 6. ОТНОШЕНИЕ ШАНСОВ СРЕДИ БОЛЬНЫХ ММ С НИЗКИМ (< 100 г/л) И ВЫСОКИМ (> 100 г/л) УРОВНЯМИ ГЕМОГЛОБИНА

TABLE 6. ODDS RATIO AMONG MM PATIENTS WITH LOW (< 100 g/l) AND HIGH (> 100 g/l) HEMOGLOBIN LEVELS

Гемоглобин (< 100 г/л) Hemoglobin (< 100 g/l)				
Предрасполагающие генотипы Predisposing genotypes	Отношение шансов (OR) Odds ratio (OR)	95% доверительный интервал (CI), нижняя/верхняя границы 95% confidence interval (CI), lower/upper limits	Стандартная ошибка (SE) Standard error (SE)	Этиологическая доля (EF), % Etiologic fraction (EF), %
IL-1 α -889 TT IL-1 β +3962 TT IL-6 -174 GG IL-6 nt565 GG	1,5	0,22/10,04	0,97	33
IL-1 α -889 TT IL-1 β +3962 TT	0,88	0,14/5,51	0,94	—
IL-6 -174 GG IL-6 nt565 GG	0,75	0,15/3,77	0,82	—
Гемоглобин (> 100 г/л) Hemoglobin (> 100 g/l)				
Предрасполагающие генотипы Predisposing genotypes	Отношение шансов (OR) Odds ratio (OR)	95% доверительный интервал (CI), нижняя/верхняя границы 95% confidence interval (CI), lower/upper limits	Стандартная ошибка (SE) Standard error (SE)	Этиологическая доля (EF), % Etiologic fraction (EF), %
IL-1 α -889 TT IL-1 β +3962 TT IL-6 -174 GG IL-6 nt565 GG	0,67	0,10/4,46	0,97	—
IL-1 α -889 TT IL-1 β +3962 TT	1,14	0,18/7,19	0,94	12
IL-6 -174 GG IL-6 nt565 GG	1,33	0,27/6,70	0,82	25

Примечание. * – достоверные отличия, $p \leq 0,05$.

Note. *, significant differences, $p \leq 0.05$

Список литературы / References

1. Бессмельцев С.С. Множественная миелома (патогенез, клиника, диагностика, дифференциальный диагноз). Часть I // Клиническая онкогематология, 2013. Т. 6, № 3. С. 237-257. [Bessmeltsev S.S. Multiple myeloma (pathogenesis, clinical features, diagnosis, differential diagnosis). Part I. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*, 2013, Vol. 6, no. 3, pp. 237-257. (In Russ.)]
2. Бессмельцев С.С. Множественная миелома (лечение первичных больных): обзор литературы и собственные данные. Часть II // Клиническая онкогематология, 2013. Т. 6, № 4. С. 379-414. [Bessmeltsev S.S. Multiple myeloma (management of newly diagnosed patients): literature review and our on data. Part II. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*, 2013, Vol. 6, no. 4, pp. 379-414. (In Russ.)]
3. Коненков В.И., Смольникова М.В. Структурные основы и функциональная значимость аллельного полиморфизма генов цитокинов человека и их рецепторов // Медицинская иммунология, 2003. Т. 5, № 1-2. С. 11-28. [Konenkov V.I., Smolnikova M.V. Structure and functional importance of allelic polymorphism of human cytokine genes and their receptors, *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2003, Vol. 5, no. 1-2, pp. 11-28. (In Russ.)]

4. Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Максимов В.Н. Комплекс генотипов цитокинов как генетический фактор риска развития инфаркта миокарда у мужчин европеоидного населения России // Кардиология, 2012. Т. 52, № 7. С. 22-29. [Konenkov V.I., Shevchenko A.V., Prokofev V.F., Maksimov V.N. Complex of genotypes of cytokines as a genetic factor of risk of development of myocardial infarction of in European population of Russia men. *Kardiologiya = Cardiology*, 2012, Vol. 52, no. 7, pp. 22-29. (In Russ.)]
5. Ландышев Ю.С., Суров А.В., Лазуткина Е.Л., Георгиевский Н.И., Целуйко С.С., Георгиевская М.Н. Роль цитокинов и полиморфно-ядерных нейтрофилов в патогенезе бронхиальной астмы // Дальневосточный медицинский журнал, 2008. Т. 2. С. 134-138. [Landishev Yu.S., Syrov A.V., Lazytkina E.L., Georgievsky N.I., Tseluyko S.S., Georgievskaya M.N. The role of cytokines and polymorphonuclear neutrophils in the pathogenesis of bronchial asthma. *Dalnevostochnyy meditsinskiy zhurnal = Far Eastern Medical Journal*, 2008, Vol. 2, pp. 134-138. (In Russ.)]
6. Павлова А.А., Бубнова Л.Н., Соколова Ю.В., Карягина Е.В., Бессмельцев С.С., Павлова И.Е. Роль полиморфизма гена TGF- β 1 в развитии множественной миеломы // Клиническая онкогематология, 2015. Т. 8, № 3. С. 274-280. [Pavlova A.A., Bubnova L.N., Sokolova Yu.V., Bessmeltsev S.S., Pavlova I.E. Role of TGF- β 1 gene polymorphism in the development of multiple myeloma. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*, 2015, Vol. 8, no. 3, pp. 274-280. (In Russ.)]
7. Павлова А.А., Павлова И.Е., Бубнова Л.Н., Бессмельцев С.С., Клеина Е.В., Гарифуллин А.Д., Мартынкевич И.С., Волошин С.В., Чечеткин А.В. Ассоциация полиморфизма генов цитокинов IL-1, IL-4, IL-6 и TGF- β 1 и цитогенетических нарушений у больных множественной миеломой // Вестник гематологии, 2017. Т. 13, № 2. С. 65-66. [Pavlova A.A., Pavlova I.E., Bubnova L.N., Bessmeltsev S.S., Kleina E.V., Gariffulin A.D., Martinkevich I.S., Voloshin S.V., Chechetkin A.V. Association of IL-1, IL-4, IL-6 and TGF- β 1 cytokine gene polymorphisms and cytogenetic disorders in patients with multiple myeloma. *Vestnik gematologii = Journal of Hematology*, 2017, Vol. 13, no. 2, pp. 65-66. (In Russ.)]
8. Санникова С.В. Клинико-иммуногенетические аспекты предрасположенности к развитию миомы матки [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://medical-diss.com/docreader/567130/a#?page=1>. [Sannikova S.V. Clinical and immunogenetic aspects of predisposition to uterine fibroids development [Electronic resource]. Access mode: <http://medical-diss.com/docreader/567130/a#?page=1>.]
9. Черныш Н.Ю., Бессмельцев С.С., Козлов А.В. Апоптотическая активность клеток костного мозга больных множественной миеломой // Вестник гематологии, 2009. Т. 5. С. 5-11. [Chernish N.Yu., Bessmeltsev S.S., Kozlov A.V. Apoptotic activity of bone marrow cells in patients with multiple myeloma. *Vestnik gematologii = Journal of Hematology*, 2009, Vol. 5, pp. 5-11. (In Russ.)]
10. Alexander D.D., Mink P.J., Adami H.O., Cole P., Mandel J.S., Oken M.M., Trichopoulos D. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int. J. Cancer*, 2007, Vol. 120, no. S12, pp. 40-61.
11. Anderson K.C. Multiple myeloma: a clinical overview. *Oncology*, 2011, Vol. 25, no. 12, pp. 3-9.
12. Blade J., Samson D., Reece D., Bjorkstrand B., Gahrton G., Gertz M., Sergio Giralto S., Jagannath S., David Vesole D. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Br. J. Haematol.*, 1998, Vol. 102, no. 5, pp. 1115-1123.
13. Durie B.G.M., Harousseau J.L., Miguel J.S., Bladé J., Barlogie B., Anderson K., Gertz M., Dimopoulos M., Westin J., Sonneveld P., Ludwig H., Gahrton G., Beksac M., Crowley J., Belch A., Boccadaro M., Cavo M., Turesson I., Joshua D., Vesole D., Kyle R., Alexanian R., Tricot G., Attal M., Merlini G., Powles R., Richardson P., Shimizu K., Tosi P., Morgan G., Rajkumar S.V.; International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 2006, Vol. 20, no. 9, pp. 1467-1473.
14. Frassanito M.A., Cusmai A., Dammacco F. Deregulated cytokine network and defective Th1 immune response in multiple myeloma. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001, Vol. 125, no. 2, pp. 190-197.
15. Ghobrial I.M. Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood*, 2012, Vol. 120, no. 1, pp. 20-30.
16. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, Vol. 6, pp. 823-835.
17. Moreau P., San Miguel J., Ludwig H., Schouten H., Mohty M., Dimopoulos M., Dreyling M. Multiple myeloma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.*, 2013, Vol. 24, no. 6, pp. vi133-vi137.
18. Pavlova A., Bubnova L., Bessmeltsev S., Pavlova I. Cytokine gene polymorphisms and clinical laboratory parameters in patients with multiple myeloma from the North-West Region of Russia. *HLA*, 2017, Vol. 89, no. 6, p. 467.

Авторы:

Павлова А.А. — к.б.н., лаборант-исследователь лаборатории иммуногематологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»; биолог лаборатории молекулярно-генетических методов исследований, Клиника высоких медицинских технологий имени Н.И. Пирогова (поликлиника, стационар) ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Павлова И.Е. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногематологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Бубнова Л.Н. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель лаборатории иммуногематологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Бессмельцев С.С. — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Карягина Е.В. — заведующая отделением гематологии СПб ГБУЗ «Городская больница № 15», Санкт-Петербург, Россия

Поступила 08.11.2018
Отправлена на доработку 19.11.2018
Принята к печати 25.12.2018

Authors:

Pavlova A.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Immunohematology, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology; Biologist, Molecular Genetic Laboratory, N. Pirogov Clinic of High Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Pavlova I.E., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Immunohematology, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Bubnova L.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Science Worker, Head, Laboratory of Immunohematology, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical Biological Agency; Professor, Immunology Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Bessmeltsev S.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Research, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Karyagina E.V., Head, Hematology Department, Municipal Hospital No. 15, St. Petersburg, Russian Federation

Received 08.11.2018
Revision received 19.11.2018
Accepted 25.12.2018

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНУСИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОВОДИМОЙ ТЕРАПИИ

Савлевич Е.Л.¹, Зурочка А.В.^{2,3}, Хайдуков С.В.⁴

¹ ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

³ ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

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

Резюме. Большинство пациентов страдает полипозным риносинуситом (ПРС) всю жизнь с рецидивом 50–60% в течение 18 месяцев после операции. Являясь хроническим персистирующим воспалительным заболеванием, ПРС влияет на состоянии всего организма, в том числе на системный иммунитет. Ранее методом проточной цитометрии нами было выявлено увеличение NK ($CD3^+CD16^+CD56^+$), активированных NK ($CD8^+CD3^+$), NKT-клеток ($CD16^+CD56^+CD3^+$), Т-регуляторных ($CD4^+CD25^{bright}CD127^{low\ to\ neg}$) и активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$) у всех пациентов с ПРС при отсутствии разницы между разными фенотипами. Был проведен анализ состояния клеточного системного иммунитета в зависимости от клинического течения и эффективности консервативной терапии. Пациенты были разделены на 3 группы. Срок наблюдения — 1 год. 1 группа — пациенты с положительной динамикой, при регрессе или уменьшении степени носовых полипов, 2 группа — степень выраженности полипов оставалась на том же уровне, 3 группа — степень распространенности полипов была выше, чем год назад.

В 3 группе с агрессивным ростом полипов и низким эффектом терапии наблюдалось снижение количества Treg, NKT-клеток, NK и активированных NK, цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$), активированных Т-клеток, что свидетельствовало об истощении клеточного системного иммунитета на фоне постоянного присутствия персистирующего продуктивного воспаления слизистой.

Во 2 группе наблюдалось увеличение общего количества лимфоцитов, общих, активированных Т-клеток, Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), цитотоксических Т-лимфоцитов, NK- и NKT-клеток. Одновременно отмечается снижение абсолютного количества активированных NK, несмотря на рост NK,

Адрес для переписки:

Савлевич Елена Леонидовна
ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации
121359, Россия, Москва, ул. Маршала Тимошенко, 19, стр. 1А.
Тел.: 8 (985) 145-27-45.
Факс: 8 (499) 140-20-78.
E-mail: savllena@gmail.com

Address for correspondence:

Savlevich Elena L.
Central State Medical Academy at the Department for Presidential Affairs
121359, Russian Federation, Moscow, M. Timoshenko str., 19, bldg 1A.
Phone: 7 (985) 145-27-45.
Fax: 7 (499) 140-20-78.
E-mail: savllena@gmail.com

Образец цитирования:

Е.Л. Савлевич, А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков «Характер изменения клеточной составляющей иммунной системы у больных полипозным риносинуситом в зависимости от эффективности проводимой терапии» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 715–724. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-715-724
© Савлевич Е.Л. и соавт., 2019

For citation:

E.L. Savlevich, A.V. Zurochka, S.V. Khaidukov "Characteristics of cellular compartment changes of immune system in the patients with chronic polypous rhinosinusitis depend on efficiency of drug therapy", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 715–724. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-715-724
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-715-724

что предполагает нарушение механизма их активации и компенсацию этого состояния ростом НКТ- и цитотоксических Т-лимфоцитов. Одновременно наблюдается увеличение абсолютного числа Treg, что вызывает супрессию действием эффекторных клеток адаптивного иммунного ответа, способствует неполной элиминации инфекционных агентов и перманентному неполноценному течению воспалительного процесса.

Хронический воспалительный процесс при ПРС влияет на системный клеточный иммунитет в зависимости от тяжести течения заболевания.

Максимальное напряжение системного клеточного иммунитета выявлено у пациентов, нуждающихся в постоянной медикаментозной терапии.

При агрессивном течении ПРС и отсутствии эффекта консервативного лечения уменьшается абсолютное число эффекторных клеток и количество Treg, что объясняет неэффективность иммунной регуляции воспалительного процесса и лечебных мероприятий у этих пациентов.

Ключевые слова: полипозный риносинусит, стандартная консервативная терапия, лимфоциты, системный иммунитет, проточная цитометрия, CD-маркеры

CHARACTERISTICS OF CELLULAR COMPARTMENT CHANGES OF IMMUNE SYSTEM IN THE PATIENTS WITH CHRONIC POLYPOUS RHINOSINUSITIS DEPEND ON EFFICIENCY OF DRUG THERAPY

Savlevich E.L.^a, Zurochka A.V.^{b,c}, Khaidukov S.V.^d

^a Central State Medical Academy at the Department for Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

^c South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

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

Abstract. Despite numerous attempts to control the course of chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) by means of pharmacological treatment and new surgical approaches, the majority of patients experience lifelong persistence of this disorder, at recurrence rates of 50-60% within 18 months after surgical treatment. Since CRSwNP is a chronic persistent inflammatory process, it affects the entire body condition, including the state of systemic immune response. An elevation of NK (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), activated NK (CD8⁺CD3⁺), NKT cells (CD16⁺CD56⁺CD3⁺), Treg (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{low to neg}) cells and activated T-lymphocytes (CD3⁺CD25⁺) was revealed elsewhere among all the patients with CRSwNP, using a flow cytometry method. There was no difference between various disease phenotypes. We analyzed the status of cellular component of systemic immunity, dependent on clinical course of the disease and efficiency of the administered therapy of CRSwNP. The patients were divided into three subgroups. The follow-up period was 1 year. The first group comprised the patients who showed positive dynamics after conservative therapy, resulting into regression of nasal polyps and their grade than a year ago. The second group included the patients in whom the size of polyps remained the same. The third group included the patients with higher incidence of nasal polyps than a year ago.

We have shown a decrease of Treg, NKT cells, NK and activated NK, cytotoxic T-lymphocytes (CD3⁺CD8⁺), activated T-cell numbers in clinical group 3 with aggressive growth of polyps and low effect of standard therapy, which may cause deterioration of the immune system cellular populations, accompanied by presence of persistent productive inflammatory process of nasal cavity and paranasal sinuses. In the second group, a significant elevation of total lymphocyte number, total and activated T cells, T helpers (CD3⁺CD4⁺), cytotoxic T lymphocytes, NK and NKT cells was shown. Meanwhile, a decrease in absolute number of activated NK was observed despite the NK growth. Therefore, we can assume that the mechanism of their activation was disturbed and compensated by production of NKT cells and cytotoxic T lymphocytes. Moreover, we have shown in this group that the absolute number of Treg cells is increased; and these cells had a suppressive influence on

effector cells of adaptive immune response, thus inducing incomplete elimination of infectious agents, which contribute to permanent incomplete course of inflammatory process.

Chronic inflammatory process in CRSwNP affects systemic cellular immunity depending on the morbidity characteristics in the course of pathological process. The maximal intensity of systemic cellular immunity is observed in the group of patients that require permanent basic drug therapy. In case of aggressive CRSwNP and failure of standard drug therapy, we observed a decrease in absolute numbers of effector cells, along with decreased Treg lymphocyte numbers which may explain inefficient immune regulation of inflammatory process and medical interventions in this group of patients.

Keywords: chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP), standard drug therapy, lymphocytes, systemic immunity, flow cytometry, CD cellular markers

Введение

Полипозный риносинусит (ПРС) — хронический воспалительный процесс слизистой оболочки носа и ОНП, который характеризуется агрессивной клеточной инфильтрацией и ремоделированием слизистой и в который вовлечено большое количество разнообразных клеточных элементов, таких как эпителиальные клетки, лимфоциты, тучные клетки, эозинофилы и нейтрофилы, которые совместно с другими структурами слизистой вырабатывают различные медиаторы воспаления, включая цитокины, хемокины и иммуноглобулины [13]. Современные методы лечения ПРС, с одной стороны, имеют цель снизить интенсивность клинических признаков ПРС в виде нарушения носового дыхания, заложенности носа, выделений из носа или стекающих по задней стенке глотки, чувства давления или боли в лицевой области и снижения обоняния. С другой стороны, они направлены на увеличение временного отрезка между хирургическими вмешательствами в связи с регрессированием или стабилизацией процесса роста полипов. Но несмотря на многочисленные попытки контроля заболевания различными методами консервативного и оперативного лечения, которые постоянно совершенствуются по мере разработки новых лекарственных препаратов фармацевтической промышленностью и модернизации техники хирургических подходов, большинство пациентов продолжают страдать от ПРС всю свою жизнь [16]. В течение 18 месяцев после оперативного вмешательства рецидив ПРС, несмотря на проводимую стандартную медикаментозную терапию, составляет 50-60% [11]. При анализе когорты пациентов, поступивших на повторную операцию, бронхиальная астма (БА) была в 73,3%, а непереносимость нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС) — в 53,5% [20].

По уровню качества жизни ПРС сравним или ниже показателей при других хронических изнурительных заболеваниях, включая застойную сердечную недостаточность, стенокардию, хроническую обструктивную болезнь легких [17].

При наличии коморбидной патологии в виде БА, атопии и непереносимости НПВС он оказывает негативное влияние на течение патологических процессов разных отделов дыхательных путей [18], является фактором риска развития эссенциальной гипертензии [1], поэтому не вызывает сомнений необходимость изучения возможных биомаркеров с целью составления прогноза течения заболевания и подбора наиболее эффективного способа лечения каждого пациента.

В отношении ПРС остается нерешенным множество вопросов. Нет современной подробной классификации, не определены единые диагностические параметры для разных эндотипов и фенотипов заболевания и конкретных схем их консервативного лечения, не понятна роль микробиома в его развитии, нет ясного понимания патогенеза разных эндотипов ПРС. Все это приводит к тому, что у больных сложно определить ключевые молекулы для разработки таргетной терапии [14]. Также остаются неизвестными факторы, связанные с риском рецидива ПРС. Коморбидные состояния могут взаимно отягощать течение патологических процессов. Интенсивное эозинофильное воспаление слизистой верхних дыхательных путей и повышенный уровень локальных маркеров Th2-иммунного ответа считаются предикторами более тяжелого течения ПРС [19]. В соответствии с текущими рекомендациями, для лечения ПРС хорошую доказательную базу имеют только интраназальные кортикостероиды (иГКС), короткие курсы системных глюкокортикостероидов и ирригационная терапия [13]. Контроль проводимой терапии при ПРС измеряется степенью выраженности клинических проявлений, что отражает субъективную характеристику пациентами своего уровня качества жизни, и степенью распространенности полипозного процесса при эндоскопическом осмотре полости носа, который позволяет объективно оценить динамику патологического процесса на фоне медикаментозной терапии [4]. Положительный ответ на глюкокортикостероиды при ПРС варьирует от 50 до 80%, эти препараты более

эффективны при интенсивном эозинофильном воспалении Th2-типа [8,14].

Комбинация хирургического вмешательства и фармакотерапии также не всегда в состоянии контролировать прогрессирование заболевания и его симптомы в связи с тем, что ПРС представляет собой целый комплекс патологических процессов, объединенных единым симптомом — наличием полипов в полости носа и ОНП, поэтому единый подход к консервативному и оперативному лечению этого заболевания невозможен [15]. Так как эндоскопия полости носа, компьютерная томография околоносовых пазух (КТ ОНП) и выявление жалоб пациента ОНП позволяют лечащему врачу только оценить степень тяжести заболевания, эти методы не позволяют сделать выводы о механизме воспалительного процесса слизистой оболочки носа и ОНП у отдельного пациента, чтобы сделать выбор в сторону стандартной фармакотерапии, хирургического подхода или возможного применения биологических препаратов в будущем. Определение эндотипов ПРС оптимизирует эффективность лечения, что снизит ненужные расходы, поможет избежать необходимости повторных вмешательств и снизить риск рецидивов, что соответствует концепции персонализированной медицины [10]. Для определения эндотипов ПРС в настоящее время распространены несколько разных подходов: 1) определение уровня цитокинов в сыворотке и в полипах; 2) определение содержания эозинофилов в крови и полипах; 3) определение IgE в крови и полипах [12]. Правильное выявление того или иного эндотипа позволит понять направление изменений местного и системного иммунного ответа больного, составить клинический прогноз и, учитывая активное проведение клинических испытаний антицитокиновых препаратов при ПРС, сформировать основу для принятия терапевтических решений, особенно при невосприимчивости пациента к проводимой стандартной терапии [14]. Биологическая таргетная терапия обладает целенаправленным воздействием на конкретный биологический субстрат (определенные рецепторы или другие клеточные мишени, конкретные цитокины и т.д.). В отличие от традиционных лекарственных средств таргетная терапия, ввиду своей высокой специфичности, позволяет более точно модулировать воспалительный процесс в каждом конкретном случае [4]. Проблема заключается в том, что эти методы требуют целенаправленного индивидуального подбора, основанного на выявлении пациентов с соответствующим эндотипом, что подводит к необходимости разработки диагностических маркеров идентификации определенных эндотипов ПРС и, в зависимости от результата, составления новых алгоритмов ведения пациентов.

В последнее время окончательно сформировалось мнение, что при ПРС ориентирами течения патологического процесса в настоящее время служит состояние именно локального иммунитета. Принимая во внимание доступность расположения органов-мишеней, это представляется удобным во всех отношениях. Тем не менее ПРС является хроническим персистирующим воспалительным заболеванием, что не может не отражаться на состоянии всего организма, в том числе на состоянии системного иммунитета [2]. Также следует иметь в виду, что применение топических кортикостероидов на слизистую носовой полости может изменять параметры иммунной системы крови [8]. Проведя собственные исследования показателей работы системного клеточного иммунитета методом проточной цитометрии, мы выявили увеличение абсолютного и относительного количества NK ($CD3^+CD16^+CD56^+$) одновременно с резким повышением числа активированных NK ($CD8^+CD3^+$) и NKT-клеток ($CD16^+CD56^+CD3^+$). Наряду с этим у пациентов наблюдается рост абсолютного и относительного количества активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$), что позволяет сделать предположение о напряженном состоянии иммунного ответа из-за постоянного раздражения слизистой оболочки носа и околоносовых пазух различными триггерами, в том числе инфекционного происхождения, что логично при хроническом гиперпластическом воспалительном процессе. А повышение абсолютного и относительного количества Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^{bright}CD127^{low\ to\ neg}$), которые своим супрессивным действием на эффекторные клетки адаптивного иммунного ответа способствуют неполной элиминации инфекционных агентов, усугубляет их персистенцию на слизистой носа и околоносовых пазух (ОНП) и содействует неполноценному течению воспаления при этой патологии [6]. Проведенный нами сравнительный анализ показателей клеточного системного иммунитета между группами пациентов с разными фенотипами ПРС (с сопутствующей БА, атопией и без коморбидной патологии) не выявил статистически значимой разницы между группами [7]. Также мы не получили достоверных отличий при сравнении групп в зависимости от степени отклонения показателей значений натуральных киллеров ($CD3^+CD16^+CD56^+$), активированных натуральных киллеров ($CD3^+CD8^+$) и Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^+CD127^+$) от нормы [5]. Поэтому в настоящем исследовании мы разделили всех пациентов на группы, в зависимости от эффективности проводимой стандартной терапии, и проанализировали состояние клеточного иммунитета в каждой группе.

Цель исследования — провести анализ состояния клеточного системного иммунитета в зависимости от клинического течения и эффективности проводимой терапии полипозного риносинусита.

Материалы и методы

За период 2016–2017 гг. в Московском областном научно-исследовательском клиническом институте им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ) было обследовано 60 пациентов (31 женщин и 29 мужчин) с двусторонним полипозным риносинуситом в период ремиссии. Средний возраст пациентов $46,9 \pm 14,1$ лет. Наличие двустороннего полипозного риносинусита было подтверждено эндоскопическим исследованием полости носа и данными компьютерной томографии ОНП. Критериями исключения служили односторонний процесс, наличие онкологической, аутоиммунной патологии, генетических синдромов (муковисцидоз, аллергический гранулематозный или эозинофильный ангиит, синдром Чарга–Стросса).

Для изучения системного клеточного иммунитета в венозной крови применялся метод проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (BeckmanCoulter, США). Для окрашивания лимфоцитов использовались моноклональные антитела (МАТ): CD3, CD4, CD8, CD 16, CD19, CD 25, CD27, CD45, CD45R0, CD45RA, CD56 и CD127. МАТ фирмы Beckman Coulter (США) были мечены FITC (изотиоцианат флуоресцеина), PE (фикоэритрин), PC5 (комплекс PE с цианином-5) и ECD (комплекс PE с техасским красным). Безотмывочную технологию для удаления эритроцитов проводили с использованием лизирующих растворов: OptiLyse C и ImmunoPrep (BeckmanCoulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 10 лимфоцитов. Абсолютное количество клеток определяли как в одноплатформенной, так и в двухплатформенной (с использованием FlowCount (Beckman Coulter, США) и гематологического анализатора LH500 (Beckman Coulter, США)) системах [3, 9].

Все исследуемые пациенты находились под наблюдением в течение 18 месяцев, каждые 3 месяца проводился регулярный эндоскопический осмотр пациентов. После оперативного лечения всем пациентам были назначены иГКС мометазона фураат в виде спрея в дозе по 100 мг в каждую половину носа 2 раза в сутки (суточная доза 400 мкг) и ирригационная терапия слизистой полости носа. При наличии коморбидной патологии одновременно аллерголог осуществлял лечение БА и аллергического ринита. Через 5–6 месяцев был проведен эндовидеоскопический осмотр полости носа, где была зафиксирована степень распространенности полипозного про-

цесса, что было принято за начальную точку контроля эффективности консервативного лечения. После этого в течение 12 месяцев при регулярных осмотрах проводилась коррекция базовой терапии ПРС. Если через 3 месяца рецидива полипов не наблюдалось, прекращался прием иГКС. Если наблюдался агрессивный рост полипов, суточную дозу иГКС увеличивали до 800 мкг. Системная кортикостероидная терапия пациентам не проводилась. Через 12 месяцев также определили степень распространенности полипов полости носа, после чего на основании оценки эффективности проводимого лечения пациенты были разделены на 3 группы. В первую группу вошли пациенты с положительной динамикой на фоне консервативной терапии. При осмотре полипов полости носа не наблюдалось или степень их выраженности была меньше, чем год назад. Во 2 группу вошли пациенты, у которых год назад полипозная ткань в полости носа была в наличии, и на фоне лечения через год их состояние оставалось на том же уровне выраженности. В третью группу вошли пациенты, у которых степень распространенности полипов полости носа была выше, чем год назад.

Статистические расчеты выполнены при помощи программы IBM SPSS Statistics 23.0. Все показатели иммунограммы имели небольшую величину коэффициента эксцесса и асимметрии, в связи с чем для их анализа использовали методы параметрической статистики. Данные описаны в виде среднего значения и стандартного отклонения (в скобках) ($\pm$). Значения $p < 0,05$ рассматривались как статистически значимые.

Результаты и обсуждение

При исследовании показателей системного клеточного иммунитета между группами с разным эффектом консервативной терапии выявлены статистически значимые различия, представленные в таблице 1. По абсолютному количеству лимфоцитов наблюдалась достоверная разница между всеми исследуемыми нами группами, с максимальным повышением во 2 группе и минимальным количеством в третьей группе. У пациентов 1 группы с положительной динамикой на фоне консервативной терапии наблюдались нормальные значения абсолютного количества цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$), у 2 группы, где на фоне лечения полипозный процесс не прогрессировал, но вместе с тем не отмечалось уменьшения размеров полипозной ткани, этот показатель был достоверно выше по сравнению с другими группами. В третьей группе, где на фоне стандартной консервативной терапии продолжался активный рост полипов, абсолютное количество $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов было

ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТЧНОГО ИММУНИТЕТА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПРС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОНСЕРВАТИВНОЙ ТЕРАПИИ, СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ И СРЕДНЕЕ КВАДРАТИЧНОЕ ОТКЛОНЕНИЕ ($\pm$)

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF CELLULAR IMMUNE STATUS IN PERIPHERAL BLOOD OF THE PATIENTS WITH CHRONIC RHINOSINUSITIS AND NASAL POLYPS DEPENDING ON THE EFFECTIVENESS OF DRUG THERAPY, MEAN AND STANDARD DEVIATION ($\pm$)

Показатели клеточного иммунитета Characteristics of cellular immune status	1 группа Group 1	2 группа Group 2	3 группа Group 3	Все пациенты с ПРС All patients with CRSwNP	Контрольная группа Control group
Регуляторные Т-клетки Regulatory T cells (CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{low to neg}) $\times 10^9$	0,14 $\pm$ 0,01**	0,2 $\pm$ 0,03***	0,1 $\pm$ 0,05****	0,14 $\pm$ 0,06*	0,009-0,078
Регуляторные Т-клетки Regulatory T cells (CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{low to neg}) %	8,29 $\pm$ 0,5**	9,66 $\pm$ 0,47	8,98 $\pm$ 1,38****	8,76 $\pm$ 1,65*	2-6
Т-клетки активированные Activated T cells (CD3 ⁺ CD25 ⁺) $\times 10^9$	0,23 $\pm$ 0,02**	0,32 $\pm$ 0,08***	0,17 $\pm$ 0,07****	0,26 $\pm$ 0,13*	0,007-0,165
Т-клетки активированные Activated T cells (CD3 ⁺ CD25 ⁺) %	15,09 $\pm$ 0,73	14,9 $\pm$ 2,27***	16,1 $\pm$ 2,83	16,05 $\pm$ 4,55*	0,5-6,0
НКТ-клетки NKT cells (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺) $\times 10^9$	0,14 $\pm$ 0,03**	0,28 $\pm$ 0,08***	0,06 $\pm$ 0,05****	0,16 $\pm$ 0,13*	0,007-0,165
НКТ-клетки NKT cells (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺) %	9,41 $\pm$ 1,91**	13,02 $\pm$ 3,49***	4,73 $\pm$ 1,87****	9,28 $\pm$ 6,15	0,5-6,0
Т-хелперы T helper cells (CD3 ⁺ CD4 ⁺) $\times 10^9$	0,6 $\pm$ 0,06**	0,87 $\pm$ 0,19***	0,6 $\pm$ 0,3	0,68 $\pm$ 0,31	0,576-1,336
Т-хелперы T helper cells (CD3 ⁺ CD4 ⁺) %	39,96 $\pm$ 1,03	41,9 $\pm$ 4,16***	47,03 $\pm$ 1,57****	41,26 $\pm$ 6,53	35-55
Т-хелперы наивные Naïve T helper (CD4 ⁺ CD45RA ⁺), абс	0,3 $\pm$ 0,6**	0,48 $\pm$ 1,6	0,49 $\pm$ 0,34****	0,27 $\pm$ 0,13	0,272-1,123
Т-хелперы наивные Naïve T helper (CD4 ⁺ CD45RA ⁺) %	13,42 $\pm$ 1,86**	20,93 $\pm$ 3,71	21,17 $\pm$ 2,07****	16,58 $\pm$ 7,93	20-40
В-клетки памяти Memory B cells (CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺) $\times 10^9$	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01***	0,1 $\pm$ 0,06****	0,07 $\pm$ 0,04*	0,012-0,040
В-клетки памяти Memory B cells (CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺) %	3,0 $\pm$ 0,43**	2,38 $\pm$ 0,3***	4,17 $\pm$ 1,05****	2,95 $\pm$ 1,23	1,8-6,8
Т-цитотоксические Cytotoxic T lymphocytes (CD3 ⁺ CD8 ⁺) $\times 10^9$	0,39 $\pm$ 0,05**	0,56 $\pm$ 0,08***	0,33 $\pm$ 0,16****	0,45 $\pm$ 0,19	0,372-0,974

Показатели клеточного иммунитета Characteristics of cellular immune status	1 группа Group 1	2 группа Group 2	3 группа Group 3	Все пациенты с ПРС All patients with CRSwNP	Контрольная группа Control group
Т-цитотоксические Cytotoxic T lymphocytes (CD3 ⁺ CD8 ⁺) %	26,22±2,57**	28,22±3,54***	23,87±3,55****	27,25±7,53	19-35
НК-активированные Activated NK cells (CD3 ⁺ CD8 ⁺) × 10 ⁹	0,32±0,06**	0,258±0,04***	0,13±0,05****	0,25±0,14*	0,230-0,369
НК-активированные Activated NK cells (CD3 ⁺ CD8 ⁺) %	13,45±2,08**	8,90±1,41***	10,97±3,88****	10,94±5,12*	1-3
NK (LGL) (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) × 10 ⁹	0,50±0,08**	0,62±0,08***	0,22±0,09****	0,47±0,21*	0,123-0,369
NK (LGL) (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) %	21,46±2,55**	18,18±2,50***	16,5±3,9****	19,70±6,44*	8-17
В-клетки общие B cells (CD3 ⁺ CD19 ⁺) × 10 ⁹	0,26±0,05	0,28±0,03	0,20±0,12	0,25±0,12	0,111-0,376
В-клетки общие B cells (CD3 ⁺ CD19 ⁺) %	10,65±1,08	10,06±1,34	9,90±2,05	10,11±2,79	7-17
Т-клетки общие T cells (CD3 ⁺ CD19 ⁻) × 10 ⁹	1,50±0,14**	2,03±0,26***	1,29±0,63****	1,65±0,57	0,946-2,079
Т-клетки общие T cells (CD3 ⁺ CD19 ⁻) %	65,90±2,64**	70,28±2,47	72,10±2,58****	68,43±6,22	61-85
Лимфоциты Lymphocytes × 10 ⁹	2,3±0,22**	2,87±0,30***	1,74±0,85****	2,40±0,78	1,0-4,8
Лимфоциты Lymphocytes %	34,45±1,87**	38,08±4,24***	23,17±1,05****	33,65±9,72	19-37
Контрольная сумма (Т-клетки + В-клетки + НК) Check sum (T cells + B-cells + NK)	98,01±0,34	98,72±0,45	98,5±0,61	98,29±0,88	100±5
Индекс соотношения Th/T-цитотоксические Ratio index Th/Cytotoxic T cells	1,78±0,38**	1,532±0,25***	1,99±0,38	1,69±0,85	1,5-2,6
Т-хелперы активированные и Т-памяти Activated T helpers and memory T cells (CD4 ⁺ CD45R0 ⁺)	28,51±1,58**	24,24±1,15***	27,0±2,8	0,18±0,09	0,068-0,702

Примечание. * – достоверная разница между нормой и всеми пациентами с ПРС; ** – достоверная разница между 1 и 2 группой; *** – достоверная разница между 2 и 3 группой; **** – достоверная разница между 1 и 3 группой.

Note. *, statistically proved difference between Control group 1 and all patients with CRSwNP; **, statistically proved difference between Group 1 and Group 2; ***, statistically proved difference between Group 2 and Group 3; ****, statistically proved difference between Group 1 and Group 3.

достоверно низким, как по сравнению с другими группами, так и относительно контрольной группы. Абсолютное число NK (LGL) ($CD3^+CD16^+CD56^+$) во всех группах ПРС было выше нормы, с достоверным отличием по группам. Самым высоким этот показатель был во второй группе, а низким в третьей группе. Также все группы различались относительно абсолютного числа активированных NK ($CD3^+CD8^+$). В первой группе их количество было очень высоким, во второй был сравним со средним показателем при ПРС. В третьей группе число активированных NK было достоверно ниже нормы. По уровню NKT-клеток ($CD16^+CD56^+CD3^+$) также была выявлена достоверная разница по всем группам пациентов. Наибольшие значения были во второй группе, наименьшие в третьей группе, где они не отличались от контрольной группы.

Абсолютное количество общих Т-клеток ($CD3^+CD19^-$) во всех группах было в пределах нормы, внутри групп самым высоким этот показатель был во второй группе, а низким в третьей группе. Что касается абсолютного количества Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), они были достоверно выше во 2 группе, при отсутствии отличий между 1 и 3 группой. Абсолютное число наивных Т-хелперов ($CD4^+CD45RA^+$) в 1 первой группе было достоверно ниже, чем во второй и третьей группах, которые не отличались друг от друга. Показатели абсолютного количества активированных Т-клеток ($CD3^+CD25^+$) и регуляторных Т-клеток ($CD4^+CD25^{bright}CD127^{low\ to\ neg}$) во всех группах были выше нормы, внутри групп самым высоким этот показатель был во второй группе, а низким в третьей группе. При этом их относительное количество, напротив, было максимальным в третьей группе, а минимальным в первой группе. Соотношение абсолютного количества Т-хелперы активированных к Т-клеткам памяти ($CD4^+CD45R0^+$) было достоверно ниже во второй группе, при отсутствии значимой разницы этого показателя между 1 и 3 группой. Абсолютное количество общих В-клеток ($CD3^+CD19^+$) было в пределах нормы и без достоверных различий между группами. Число В-клеток памяти

($CD19^+CD5^+CD27^+$) различалось по третьей группе, где их число было достоверно выше, чем в 1 и 2 группе.

Суммируя полученные результаты, с агрессивным ростом полипов и низким эффектом стандартной терапии на фоне лечения наблюдалось снижение количества Treg, NKT-клеток, NK и активированных NK, цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных Т-клеток, что может свидетельствовать об истощении клеточного звена системного иммунитета на фоне постоянного присутствия персистирующего продуктивного воспалительного процесса слизистой носа и околоносовых пазух. Уменьшение Treg объясняет прогрессирование роста полипов и неэффективность иммунной регуляции против эозинофильного Th2-воспаления слизистой с неконтролируемой клеточной пролиферацией. Наиболее напряженное состояние системного иммунитета выявлено во второй группе, при этом снижение абсолютного количества активированных NK, несмотря на рост NK у этих пациентов, позволяет предположить нарушение механизма их активации и компенсацию этого состояния ростом NKT-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов. Одновременное увеличение абсолютного числа Treg, угнетающих эффекторных клеток адаптивного иммунного ответа, способствует неполной элиминации инфекционных агентов и усугубляет их персистенцию на назальной слизистой, содействуя перманентному неполноценному течению воспалительного процесса. Стандартная медикаментозная терапия в этой группе сдерживает активный рост полипов, но на этом фоне в любой момент может произойти истощение клеточной составляющей иммунной защиты организма.

Выводы

При иммунологическом обследовании пациентов с ПРС необходимо учитывать не только наличие коморбидных заболеваний, но и характер иммунной реакции на проводимую базисную терапию.

Список литературы / References

1. Артюшкин С.А. Сравнительная оценка влияния хронического полипозного риносинусита и злокачественных новообразований на реактивность системного кровообращения // Российская оториноларингология, 2010. Т. 46, № 3. С. 205-210. [Artyushkin S.A. Comparative estimation of influence chronic polypose rhinosinusitis and malignant diseases on reactivity of blood circulation. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2010, Vol. 46, no. 3, pp. 205-210. (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Семенов М.В., Зурочка В.А., Хайдуков С.В. Изучение параметров иммунной системы и уровней Т-регуляторных клеток у пациентов, страдающих полипозным риносинуситом // Российский иммунологический журнал, 2011. Т. 5, № 14. С. 280-285. [Zurochka A.V., Semenov M.V., Zurochka V.A., Khaidukov S.V. Study of immune system parameters and T-regulatory cells level at the patients suffering polypoid rhinosinusitis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2011, Vol. 5, no. 14, pp. 280-285. (In Russ.)]

3. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshevnev V.A. Flow cytometry in biomedical research]. Ekaterinburg: RIO UB RAS, 2018. 720 p.
4. Савлевич Е.Л., Козлов В.С., Курбачева О.М. Современные тенденции диагностического поиска и терапии полипозного риносинусита // Российская ринология, 2018. Т. 26, № 2. С. 41-47. [Savlevich E.L., Kozlov V.S., Kurbacheva O.M. The modern trends in the diagnostic search for and the treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2018, Vol. 26, no. 2, pp. 41-47. (In Russ.)]
5. Савлевич Е.Л., Курбачева О.М., Хайдуков С.В., Герасимов А.Н., Амантурлиева М.Е., Симбирцев А.С. К вопросу о диагностической значимости иммунологических показателей при хроническом полипозном риносинусите // Российский аллергологический журнал, 2017. № 4/5. С. 40-45. [Savlevich E.L., Kurbacheva O.M., Khaidukov S.V., Gerasimov A.N., Amanturlieva M.E., Simbirtsev A.S. The diagnostic significance of immunological parameters of the patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2017, no. 4/5, pp. 40-45. (In Russ.)]
6. Савлевич Е.Л., Курбачева О.М., Шачнев К.Н. Целесообразность применения иммуномодулирующих препаратов в лечении хронического полипозного риносинусита // Российская ринология, 2018. Т. 26, № 3. С. 41-46. [Savlevich E.L., Kurbacheva O.M., Shachnev K.N. The expediency of the application of the immunomodulatory medications for the treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2018, Vol. 26, no. 3, pp. 41-46. (In Russ.)]
7. Савлевич Е.Л., Хайдуков С.В., Курбачева О.М., Бондарева Г.П., Шачнев К.Н., Симбирцев А.С. Показатели клеточного иммунитета пациентов с хроническим полипозным риносинуситом // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 731-738. [Savlevich E.L., Khaidukov S.V., Kurbacheva O.M., Bondareva G.P., Shachnev K.N., Simbirtsev A.S. Characteristics of cellular immune status in the patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol 19, no. 6, pp. 731-738. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-731-738.
8. Семенов М.В., Зурочка А.В., Зурочка В.А. Изменение количества Т-регуляторных клеток у пациентов, страдающих полипозным риносинуситом на фоне лечения назальными топическими глюкокортикостероидами // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 233-238. [Semenov M.V., Zurochka A.V., Zurochka V.A. Quantitative changes of T-regulatory cells in patients with polypous rhinosinusitis treated by nasal glucocorticosteroids. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 233-238. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-233-238.
9. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 2-3. С. 227-238. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Totolian Areg A., Chereshevnev V.A. Major and lymphocyte populations of human peripheral blood lymphocytes and their reference values, as assayed by multi-colour cytometry. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 2-3, pp. 227-238. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-2-3-227-238.
10. Bachert C., Zhang N., Hellings P.W., Bousquet J. Endotype-driven care pathways in patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 141, no. 5, pp. 1543-1551.
11. deConde A.S., Mace J.C., Levy J.M., Rudmik L., Alt J.A., Smith T.L. Prevalence of polyp recurrence after endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Laryngoscope*, 2017, Vol. 127, no. 3, pp. 550-555.
12. Dennis S.K., Lam K., Luong A. A review of classification schemes for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis endotypes. *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.*, 2016, Vol. 1, no. 5, pp. 130-134.
13. Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F., Cohen N., Cervin A., Douglas R., Gevaert P., Georgalas C., Goossens H., Harvey R., Hellings P., Hopkins C., Jones N., Joos G., Kalogjera L., Kern B., Kowalski M., Price D., Riechelmann H., Schlosser R., Senior B., Thomas M., Toskala E., Voegels R., Wang de Y., Wormald P.J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. *Rhinol. Suppl.*, 2012, Vol. 50, no. 23, pp. 1-298.
14. Gurrola J., Borish L. Chronic rhinosinusitis: Endotypes, biomarkers, and treatment response. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 140, no. 6, pp. 1499-1508.
15. Hellings P.W., Fokkens W.J., Bachert C., Akdis C.A., Bieber T., Agache I., Bernal-Sprekelsen M., Canonica G.W., Gevaert P., Joos G., Lund V., Muraro A., Onerci M., Zuberbier T., Pugin B., Seys S.F., Bousquet J.; ARIA and EPOS working groups. Positioning the principles of precision medicine in care pathways for allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis – A EUFOREA-ARIA-EPOS-AIRWAYS ICP statement. *Allergy*, 2017, Vol. 72, no. 9, pp. 1297-1305.
16. Rudmik L., Soler Z.M., Mace J.C., Schlosser R.J., Smith T.L. Economic evaluation of endoscopic sinus surgery versus continued medical therapy for refractory chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 2015, Vol. 125, no. 1, pp. 25-32.
17. Senior B.A., Glaze C., Benninger M.S. Use of the Rhinosinusitis Disability Index (RSDI) in rhinologic disease. *Am. J. Rhinol.*, 2001, Vol. 15, no. 1, pp. 15-20.
18. Stevens W.W., Peters A.T., Hirsch A.G., Nordberg C.M., Schwartz B.S., Mercer D.G., Mahdavinia M., Grammer L.C., Hulse K.E., Kern R.C., Avila P., Schleimer R.P. Clinical Characteristics of patients with chronic

rhinosinusitis with nasal polyps, asthma, and aspirin-exacerbated respiratory disease. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2017, Vol. 5, no. 4, pp. 1061-1070.

19. Tosun F., Arslan H.H., Karslioglu Y., Deveci M.S., Durmaz A. Relationship between postoperative recurrence rate and eosinophil density of nasal polyps. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 2010, Vol. 119, no. 7, pp. 455-459.

20. van Zele T., Holtappels G., Gevaert P., Bachert C. Differences in initial immunoprofiles between recurrent and nonrecurrent chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2014, Vol. 28, no. 3, pp. 192-198.

Авторы:

Савлевич Е.Л. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

Зурочка А.В. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург; профессор кафедры «Пищевые и биотехнологии» ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Хайдуков С.В. — д.б.н., старший научный сотрудник отдела «Научно-инновационный центр Технопарк» ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Savlevich E.L., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, Central State Medical Academy at the Department for Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Inflammatory Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg; Professor, Department of Food Technology and Biotechnology, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

Khaidukov S.V., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Scientific and Innovation Center Technopark Division, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 23.03.2019

Отправлена на доработку 05.04.2019

Принята к печати 08.04.2019

Received 23.03.2019

Revision received 05.04.2019

Accepted 08.04.2019

КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ЮВЕНИЛЬНЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

Криволапова И.М.^{1,2}, Пашнина И.А.^{1,2}, Черешнев В.А.²

¹ ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Ювенильный идиопатический артрит представляет собой гетерогенную группу заболеваний, преимущественно аутоиммунной или аутовоспалительной природы, основным проявлением которых является хроническое течение воспалительного процесса суставов у детей. В основе патогенеза разных форм ювенильного артрита, вероятно, лежат разные механизмы. Однако при всех вариантах ювенильного артрита развивается длительный дисбаланс между продукцией про- и противовоспалительных цитокинов в сторону преобладания первых.

Цель исследования – определение уровня спонтанной и стимулированной продукции противовоспалительных цитокинов в супернатантах культур цельной крови у детей с ювенильным идиопатическим артритом.

Обследованы дети и подростки 2–17 лет с различными вариантами ювенильного идиопатического артрита (n = 99) и условно здоровые дети (контроль, n = 31). Спонтанную и фитогемагглютинин-стимулированную концентрацию IL-1ra, IL-4, IL-10, TGF-β в супернатантах клеточных культур исследовали методом ИФА.

Различий по спонтанной и митоген-стимулированной секреции исследованных цитокинов между пациентами с различными вариантами ювенильного артрита не выявлено. В объединенной группе больных с ювенильным идиопатическим артритом спонтанная выработка IL-1ra, IL-4 и IL-10 клетками крови оставалась на уровне контрольной. У пациентов медианное значение спонтанной концентрации TGF-β было нулевым, тогда как клетки крови здоровых детей обладали значимо более высоким потенциалом продукции TGF-β. После инкубации клеток периферической крови с фитогемагглютинином синтез IL-4 и IL-10 у больных не отличался от контрольного уровня, а интенсивность выработки IL-1ra и TGF-β была достоверно ниже, чем у здоровых детей.

Более низкая по сравнению с контролем спонтанная и/или стимулированная продукция клетками крови IL-1ra и TGF-β у детей с ювенильным идиопатическим артритом по сравнению с контрольной группой отражает патогенетическую значимость данных цитокинов при этом заболевании. Стимуляция клеток способна выявить скрытый дефицит синтеза цитокинов, не проявляющийся при определении его концентрации в сыворотке крови или супернатантах спонтанных клеточных культур.

Ключевые слова: стимуляция *in vitro*, ювенильные артриты, дети, культуры клеток, цитокины, воспаление

Адрес для переписки:

Криволапова Ирина Михайловна
ГБУЗ СО «Областная детская клиническая
больница № 1»
620149, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, 32.
Тел.: 8 (343) 231-91-28.
E-mail: krivolapovaim@mis66.ru

Address for correspondence:

Krivolapova Irina M.
Regional Children's Clinical Hospital No. 1
620149, Russian Federation, Ekaterinburg,
S. Deryabina str., 32.
Phone: 7 (343) 231-91-28.
E-mail: krivolapovaim@mis66.ru

Образец цитирования:

И.М. Криволапова, И.А. Пашнина, В.А. Черешнев
«Концентрация противовоспалительных цитокинов
в супернатантах культур цельной крови у детей
с ювенильным идиопатическим артритом»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4.
С. 725–736. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-725-736
© Криволапова И.М. и соавт., 2019

For citation:

I.M. Krivolapova, I.A. Pashnina, V.A. Chereshev
“Concentration of anti-inflammatory cytokines in cell culture
supernatants in children with juvenile idiopathic arthritis”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 4, pp. 725–736.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-725-736
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-725-736

CONCENTRATION OF ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN CELL CULTURE SUPERNATANTS IN CHILDREN WITH JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS

Krivolapova I.M.^{a, b}, Pashnina I.A.^{a, b}, Chereshev V.A.^b

^a Regional Children's Clinical Hospital No. 1, Ekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Juvenile idiopathic arthritis is a chronic inflammatory disease of the joints in children, mainly of autoimmune or auto-inflammatory nature. It is a heterogeneous group, which includes different subtypes of the disease. Different mechanisms may play role in the pathogenesis of distinct subtypes of juvenile arthritis. However, a long-term imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines is important for all subtypes of disease. The aim of the present study was to determine spontaneous and stimulated anti-inflammatory cytokines production by peripheral blood cells from the children with juvenile idiopathic arthritis. Patients of 2 to 17 years old with different subtypes of juvenile idiopathic arthritis (n = 99) and healthy children without signs of autoimmune diseases (control, n = 31) were examined. Spontaneous and phytohemagglutinin-stimulated concentrations of IL-1ra, IL-4, IL-10, TGF- β in supernatants of whole-blood cultures were determined by ELISA. Differences in the spontaneous and mitogen-stimulated secretion of the cytokines in patients with different subtypes of juvenile arthritis have not been revealed. The spontaneous IL-1ra, IL-4 and IL-10 production by blood cells in the common group of patients with juvenile idiopathic arthritis was similar to the controls. The median value of spontaneous TGF- β concentration in the patients was below the detection level, whereas blood cells of healthy children had a higher potential of spontaneous TGF- β production. IL-4 and IL-10 production after incubation of peripheral blood cells with phytohemagglutinin in patients and in the control group did not differ from the controls, while IL-1ra and TGF- β synthesis was significantly lower than in healthy children.

The spontaneous and/or stimulated production of IL-1ra, TGF- β by blood cells in children with juvenile idiopathic arthritis reflects the pathogenic significance of these cytokines in disease. Stimulation of cells can reveal a latent deficiency in the synthesis of cytokines, which is not evident when determining its concentration in serum or supernatants of spontaneous whole-blood cultures.

Keywords: *in vitro* stimulation, juvenile arthritis, children, cells culture, cytokines, inflammation

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (регистрационный номер НИОКТР № АААА-А18-118020590108-7).

Конфликт интересов отсутствует.

Введение

Хронические воспалительные заболевания суставов у детей являются важной проблемой современной педиатрии в силу того, что эти заболевания существенно снижают качество жизни пациента и нередко приводят к инвалидизации ребенка. Наиболее распространенным заболеванием из этой группы является ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) [15, 17]. В основе заболевания лежит хроническое поражение суставов аутоиммунной либо аутовоспалительной природы: развивается воспаление синовиальной оболочки, деструкция хрящевой и костной ткани, при ЮИА также возможны внесуставные проявления [8, 17].

Ювенильный идиопатический артрит является гетерогенной группой, в состав которой входят различные варианты заболевания. По классификации Всемирной лиги ревматологических ассоциаций второго пересмотра (Эдмонтон, 2001) выделяют следующие варианты: системный ЮИА, полиартикулярный ЮИА, олигоартикулярный ЮИА, псориатический ювенильный артрит, артрит, ассоциированный с энтезитом, недифференцированный артрит [2, 17]. Следует отметить, что ни для одной из форм ЮИА нет достаточно четких лабораторных маркеров, таких, какими являются антитела к цитруллинированным пептидам при ревматоидном артрите взрослых [12, 44]. В основе патогенеза различных форм ЮИА, вероятно, лежат разные механизмы. Однако при всех вариантах развивается дисбаланс между продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (ЦК) в сторону преобладания первых [18]. При ювенильном артрите с систем-

ным началом усиление синтеза провоспалительных ЦК, на фоне недостаточности выработки противовоспалительных белков этой группы, может играть ведущую патогенетическую роль [2, 25]. О значимости состояния цитокиновой сети при других вариантах ЮИА свидетельствуют успешные попытки применения антицитокиновой терапии при олиго- и полиартикулярном ЮИА у детей [6, 48].

Цитокины — семейство полипептидных молекул, которые синтезируются клетками различных тканей организма, наиболее активными продуцентами этих молекул являются иммунокомпетентные клетки. ЦК регулируют ряд нормальных физиологических функций, защитные реакции при внедрении различных патогенов, а также развитие большинства патологических процессов, включая канцерогенез, сердечно-сосудистые нарушения, аутоиммунную патологию, аллергические реакции и другие [4, 31, 40, 49]. В отношении регуляции воспалительного процесса ЦК разделяют на провоспалительные (инициирующие и усиливающие воспалительную реакцию) и противовоспалительные (подавляющие воспаление). К основным провоспалительным ЦК, принимающим участие в патогенезе воспалительных заболеваний суставов, относятся интерлейкины IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, а также фактор некроза опухоли альфа (TNF α) и интерферон гамма (IFN γ) [3, 19, 53].

Наряду с синтезом провоспалительных ЦК, при любом воспалительном процессе происходит усиление продукции противовоспалительных ЦК [13, 45]. Недостаточная выработка этих молекул приводит к неконтролируемой прогрессии воспаления, однако, если противовоспалительные ЦК синтезируются слишком рано для завершения иммунного ответа или в слишком высоких концентрациях, это может вызвать состояние иммуносупрессии [14]. Наиболее значимыми противовоспалительными цитокинами при заболеваниях суставов являются: рецепторный антагонист IL-1 (IL-1ra), IL-4, IL-10, IL-13, трансформирующий фактор роста бета (TGF- β) [7, 22]. Противовоспалительные ЦК осуществляют контроль за эффектами провоспалительных ЦК, они способны подавлять транскрипцию генов последних в клетках-продуцентах, индуцировать синтез рецепторных антагонистов интерлейкинов, усиливать образование растворимых рецепторов и снижать плотность рецепторов провоспалительных ЦК на клетках [7].

IL-10 является одним из важнейших противовоспалительных цитокинов, продуцируется Т-лимфоцитами, преимущественно Т-хелперами

2-го типа, моноцитами. Противовоспалительный эффект IL-10 реализуется через подавление активности макрофагов и Т-лимфоцитов, прежде всего синтеза этими клетками IL-1, IL-6, IFN γ , TNF α . Этот ЦК способен угнетать секрецию матриксных металлопротеиназ, ингибирует костимуляторную активность макрофагов, подавляет деструкцию хряща и других соединительнотканых структур сустава [7, 39].

Продукция IL-4 осуществляется Т-хелперами 2-го типа, тучными клетками и базофилами, подобно IL-10, он способен ингибировать синтез IL-1, IL-6, TNF α и IFN γ , при этом IL-4 активирует В-лимфоциты, стимулирует выработку иммуноглобулина класса Е [7, 22]. Важно отметить, что этот ЦК обладает антиангиогенным эффектом и способен подавлять пролиферацию синовиоцитов [28]. Однако попытки применения IL-4 у взрослых больных с реактивным артритом с терапевтической целью, в том числе для снижения костной резорбции, не дали ожидаемых результатов [34].

IL-1ra является естественным антагонистом IL-1, он гомологичен IL-1 α и IL-1 β , взаимодействует с теми же рецепторами, что и IL-1, но не вызывает дальнейшего проведения внутриклеточного сигнала [37]. Таким образом, IL-1ra выступает в качестве ингибитора и является важным физиологическим регулятором экспрессии IL-1. IL-1ra продуцируется моноцитами и макрофагами, Т- и В-лимфоцитами, нейтрофилами, фибробластами и эндотелиальными клетками. Значительное количество IL-1ra синтезируют гепатоциты, этот цитокин всегда присутствует в сыворотке крови для предотвращения негативных последствий системного действия IL-1, вырабатываемого в значительных количествах при остром воспалении [7]. В экспериментах на лабораторных мышах нокаутирование гена IL-1ra приводило к нарушению нормального баланса ЦК семейства IL-1 и, как следствие, способствовало развитию хронической воспалительной полиартропатии с суставными эрозиями [29].

Продуцентами TGF- β являются моноциты и макрофаги, а также фибробласты, эндотелиоциты, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки. Этот ЦК ограничивает воспаление за счет подавления продукции провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF α), супрессирует ответ Т-лимфоцитов на ростовые факторы, дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов, активность натуральных киллеров [52]. TGF- β способствует развитию незрелых моноцитов, мобилизации нейтрофилов и моноцитов в очаг вос-

паления, усиливает синтез межклеточного матрикса, ускоряет заживление ран [37].

В литературных источниках представлен значительный объем информации, посвященный состоянию цитокиновой регуляции при воспалительных заболеваниях суставов у взрослых [1, 32, 51]. Однако публикации о продукции и патогенетической значимости противовоспалительных цитокинов у детей с ЮИА весьма малочисленны и противоречивы. Разными авторами описано повышение концентрации IL-10 [21, 23, 47], IL-1ra [34] и IL-4 [21] в сыворотке крови при ЮИА. В других опубликованных работах сообщается о снижении сывороточной концентрации IL-10 у больных с ЮИА [35], а также об отсутствии изменения уровня IL-4 по сравнению со здоровыми детьми [33].

Следует отметить, что наиболее часто в научной и клинической практике, как и в вышеперечисленных работах, концентрацию цитокинов определяют в сыворотке или плазме крови. Однако ЦК являются короткоживущими молекулами и обычно содержатся в крови в крайне низких концентрациях, кроме того, присутствие растворимых рецепторов ЦК, антицитокиновых антител и рецепторных антагонистов влияет на результаты определения этих белков в сыворотке крови [9, 21, 27]. Все это может исказить истинную картину состояния цитокинового профиля при той или иной патологии. Более целесообразно измерять концентрацию ЦК непосредственно в очаге воспаления: в экстрактах соответствующих тканей, в слезе, синовиальной, амниотической и спинномозговой жидкости и т.д. Однако получение образцов ткани и большинства биологических жидкостей (включая синовиальную) проводится высокотравматичными методами, что ограничивает использование этого материала для исследования цитокинового профиля, особенно у пациентов детского возраста.

Измерение концентраций цитокинов в супернатантах клеток периферической крови, культивируемых как без стимуляторов, так и с различными стимуляторами, является альтернативным методическим приемом определения уровня ЦК [5, 9, 27]. Такой подход позволяет оценить функциональное состояние иммуокompetентных клеток, уровень их исходной активации и потенциальную способность отвечать на стимул [5]. В условиях *in vitro* для оценки продукции цитокинов в качестве стимуляторов чаще всего используют растительные митогенные лектины: фитогемагглютинин, конканавалин А, митоген лаконоса, что позволяет оценить общую реактивность клеток иммунной системы [7].

Целью нашей работы явилось определение уровня спонтанной и стимулированной продукции противовоспалительных цитокинов в супернатантах клеточных культур цельной крови у детей с ювенильным идиопатическим артритом.

Материалы и методы

Исследование проведено в период с 2012 по 2016 год на базе ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1». В соответствии с этическими нормами и Правилами клинической практики РФ Протокол исследования был одобрен локальным Этическим комитетом ГБУЗ СО ОДКБ № 1.

Пациенты с ЮИА состояли на учете у детских ревматологов ОДКБ № 1 и проходили обследование и лечение в условиях амбулаторно-поликлинического звена. В исследование методом случайной выборки было включено 99 детей из 341, состоявших на учете на период исследования, в возрасте от 2 до 17 лет с различными вариантами ЮИА: олигоартикулярный вариант (оЮИА), $n = 53$; полиартикулярный вариант (пЮИА), $n = 20$; системный вариант (сЮИА), $n = 9$; артрит, ассоциированный с энтезитом (ЮАаЭ), $n = 17$. Всего обследованы 61 девочка и 38 мальчиков. Средний возраст составил 10,0 лет. Длительность болезни на момент обследования варьировала от 6 месяцев до 13 лет и в среднем составила 4,4 года. Средний возраст пациентов на момент дебюта заболевания составил 5,8 лет.

Диагноз «ЮИА» устанавливался на основании критериев ILAR (Международной лиги ревматологических ассоциаций второго пересмотра в Edmonton, 2001). Критерии включения в исследование: возраст пациента не менее 2 и не более 17 лет, начало заболевания до 16-летнего возраста, подтвержденный диагноз ювенильного идиопатического артрита, исключение других ревматических заболеваний, отсутствие на момент обследования острого или хронического инфекционного процесса, отсутствие ревматоидного фактора в сыворотке крови, отсутствие антицитокиновой терапии.

Согласно данным амбулаторных карт, у 49% пациентов наблюдалась I степень активности заболевания, у 16% — II степень, у 9% — III степень, 26% больных находились в состоянии ремиссии. На основании рентгенологических данных у 36% детей с ЮИА установлена I стадия анатомических изменений суставов (эпифизарный остеопороз), у 36% пациентов наблюдалась II стадия (эпифизарный остеопороз, разволокнение хряща, сужение суставной щели, единичные эрозии), у 3% — III стадия (деструкция хряща и кости,

формирование костно-хрящевых эрозий, подвывихи в суставах). По критериям Штейнброккера у 33% больных установлен I функциональный класс (полная сохранность выполнения ежедневной нагрузки без ограничения), у 43% – II (адекватная сохранность выполнения нормальной ежедневной нагрузки, несмотря на определенные трудности), у 16% – III (ограниченная возможность выполнения нормальной ежедневной нагрузки).

Больные с ЮИА получали патогенетическую и симптоматическую терапию в соответствии с существующими стандартами лечения. Большинство пациентов в качестве базисной терапии получали метотрексат или сульфасалазин, в ряде случаев – в сочетании с сандиммуном и метипредом. Нестероидные противовоспалительные средства дети с ЮИА принимали по потребности. Пациенты с длительной стойкой ремиссией (13 из 26 детей с ремиссией) не получали лекарственную терапию.

Контрольную группу составил 31 условно здоровый ребенок: 17 девочек и 14 мальчиков, в возрасте от 2 до 17 лет. Средний возраст составил 10,5 лет. Критерии включения детей в контроль-

ную группу были следующие: возраст пациента не менее 2 и не более 17 лет, дети без наличия признаков аутоиммунных и аллергических заболеваний, отсутствие на момент обследования острого или хронического инфекционного процесса.

Для определения уровня цитокинов в супернатантах клеточных культур кровь забиралась в вакуумные гепаринизированные пробирки (Greiner, Австрия). Образцы крови разводили глутаминсодержащей средой RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), в соотношении 1:9, готовили серию из 2 образцов с конечным объемом 500 мкл: контрольный образец без стимулятора; образец, стимулированный фитогемагглютинином (Sigma), в конечной концентрации 20 мкг/мл. После добавления стимулятора образцы разведенной крови инкубировали в течение 24 часов (37 °C, 5% CO₂). После инкубации разведенную кровь центрифугировали 10 минут при 1500 об/мин. Супернатанты отбирали с помощью автоматического дозатора и однократно замораживали для хранения и дальнейшего исследования. Определение концентрации IL-1 α , IL-4, IL-10 в супернатантах клеточных культур проводилось

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ВАРИАНТАМИ ЮИА, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATION OF CYTOKINES (pg/ml) IN SUPERNATANTS OF PERIPHERAL BLOOD CELLS IN CHILDREN WITH DIFFERENT SUBTYPES JIA, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокин Cytokine	n	сЮИА sJIA	n	оЮИА oJIA	n	пЮИА pJIA	n	ЮАаЭ JArE
IL-1 α спонтанный IL-1 α spontaneous	9	404,0 (316,0-820,0)	49	476,0 (247,0-959,0)	20	462,0 (211,0-947,0)	17	673,0 (324,0-1009,0)
IL-1 α + ФГА IL-1 α + FGA	9	2703,0 (2481,0-3880,0)	49	2568,0 (1833,0-3444,0)	20	2768,0 (1712,0-3457,0)	17	3257,0 (2362,0-3891,0)
IL-4 спонтанный IL-4 spontaneous	9	4,0 (3,0-5,0)	42	4,0 (2,0-5,0)	20	4,0 (2,0-5,0)	17	1,0 (0,0-2,0)
IL-4 + ФГА IL-4 + FGA	9	7,0 (7,0-10,0)	42	12,0 (8,0-6,0)	20	11,0 (9,0-14,0)	17	11,0 (7,0-15,0)
IL-10 спонтанный IL-10 spontaneous	9	1,0 (0,0-2,0)	53	1,0 (0,0-3,0)	20	0,3 (0,0-4,0)	17	2,0 (0,0-3,0)
IL-10 + ФГА IL-10 + FGA	9	298,0 (242,0-514,0)	53	241,0 (149,0-357,0)	20	261,0 (162,0-344,0)	17	370,0 (197,0-488,0)
TGF- β спонтанный TGF- β spontaneous	–	–	13	0 (0-240)	10	0 (0-510)	–	–
TGF- β + ФГА TGF- β + FGA	–	–	13	840 (0-2040)	10	690 (240-1590)	–	–

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР У ДЕТЕЙ С ЮИА И В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CONCENTRATION OF CYTOKINES (pg/ml) IN SUPERNATANTS OF PERIPHERAL BLOOD CELLS IN CHILDREN WITH JIA AND IN THE CONTROL GROUP, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Цитокин Cytokine	n	ЮИА JIA		n	Контроль Control	
		Концентрация, спонтанная Concentration, spontaneous	Концентрация, стимуляция ФГА Concentration, stimulation PHA		Концентрация, спонтанная Concentration, spontaneous	Концентрация, стимуляция ФГА Concentration, stimulation PHA
IL-1ra	95	505 (242,0-970,0)	2637,0* (1829,0-3475,0)	31	508,0 (215,0-703,0)	3363,0 (2432,0-4280,0)
IL-4	88	3,0 (2,0-5,0)	11,0 (8,0-15,0)	31	4,0 (2,0-5,0)	13,0 (8,0-19,0)
IL-10	99	1,0 (0,0-3,0)	255,0 (158,0-378,0)	31	1,5 (0,0-4,0)	276,0 (174,0-341,0)
TGF- β	23	0* (0-420)	840* (30-1890)	9	510 (300-660)	2070 (1530-2220)

Примечание. Различия с контролем: * – $p < 0,05$.

Note. Differences with control: *, $p < 0.05$.

методом ИФА с использованием диагностических наборов фирмы «Вектор-Бест» (Россия), уровня TGF- β – наборов фирмы eBioscience (Австрия).

Для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, для оценки взаимосвязей между исследованными параметрами – корреляционный анализ Спирмена. Статистическая обработка выполнена с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты

В группе детей с ЮИА не выявлено взаимосвязи между спонтанной и индуцированной выработкой противовоспалительных ЦК клетками цельной крови с одной стороны и возрастом больных, возрастом дебюта заболевания, продолжительностью болезни, активностью воспалительного процесса, рентгенологической стадией и функциональной активностью с другой.

Учитывая, что ЮИА является гетерогенной группой заболеваний с различными патогенетическими механизмами, проведена оценка продукции IL-1ra, IL-4, IL-10, TGF- β клетками периферической крови у больных с различными вариантами ЮИА. Суточная инкубация клеток крови с фитогемагглютинином приводила к существенному усилению выработки ЦК в каждой группе, однако ни спонтанная, ни стимулиро-

ванная концентрация IL-1ra, IL-4, IL-10, TGF- β в супернатантах культур цельной крови у детей с различными формами ЮИА не различалась (табл. 1). Отсутствие различий по спонтанной и митоген-стимулированной секреции ЦК между пациентами с различными вариантами ювенильного артрита послужило основанием для объединения всех больных в одну группу.

При оценке спонтанной продукции противовоспалительных цитокинов в супернатантах культур цельной крови в объединенной группе пациентов с ЮИА установлено, что выработка IL-1ra, IL-4 и IL-10 клетками крови у больных с ювенильным артритом оставалась на уровне контрольной (табл. 2). У детей с ЮИА медианное значение концентрации TGF- β после инкубации клеток крови в отсутствие стимулятора было нулевым, у большинства больных (62%) уровень этого ЦК в культуральной жидкости не определялся. Клетки периферической крови здоровых детей обладали более высоким потенциалом спонтанной продукции TGF- β , чем у пациентов с ЮИА, что обусловило статистически значимые различия между исследованными группами (табл. 2). Следует также отметить, что у больных с различными вариантами ЮИА и у детей из контрольной группы (табл. 1, 2) спонтанная продукция IL-1ra характеризовалась более высокими уровнями значений, чем для других исследованных цитокинов.

Продукция противовоспалительных ЦК культурами клеток крови при стимуляции ФГА в несколько раз превосходила их спонтанную секрецию как у здоровых детей, так и у пациентов с ЮИА (табл. 2). В объединенной группе больных с артритом синтез IL-4 и IL-10 в ответ на стимуляцию митогеном не отличался от контрольного уровня, интенсивность выработки IL-1ra и TGF- β клетками крови была достоверно ниже, чем у здоровых детей (табл. 2).

Обсуждение

В объединенной группе больных с ЮИА как спонтанная, так и стимулированная секреция IL-4 и IL-10 культурами клеток крови не отличалась от контрольных значений (табл. 2). Отсутствие различий по продукции этих ЦК между пациентами с ЮИА и здоровыми детьми соотносится с данными ряда разных авторов [16, 36, 41]. Однако данные других исследователей противостоят этим наблюдениям. Так, Raziuddin и соавт. выявили увеличение спонтанной продукции IL-4 и IL-10 клетками цельной крови у больных с различными вариантами ЮИА по сравнению с контролем [43]. Снижение концентрации IL-4 в супернатантах клеточных культур при инкубации клеток без стимулятора было выявлено у больных при системном, поли- и олигоартрикулярном вариантах ЮИА по сравнению со здоровыми донорами [30]. В свою очередь, K. Müller и соавт. выявили снижение концентрации IL-10 в супернатантах культур цельной крови у пациентов с ЮИА при использовании в качестве митогена фитогемагглютинаина и липополисахарида [36]. Однако Raziuddin и соавт. в своей работе сообщают, что стимулированная форбол-миристилацетатом и иономицином продукция IL-10 и IL-4 клетками крови больных с ЮИА была выше, чем в контрольной группе [43].

Результаты исследований разных авторов, посвященные оценке содержания IL-4 и IL-10 в сыворотке и плазме крови у детей с различными вариантами ювенильного артрита, также противоречивы. При исследовании плазмы крови N. Kutukculer и соавт. не выявили различий по уровню IL-4 между пациентами с ЮИА и группой здоровых детей [33]. L. Guo и соавт. обнаружили снижение уровня IL-4 в сыворотке крови у пациентов с системным вариантом ЮИА по сравнению с контролем [24]. Значительное увеличение концентрации IL-10 в сыворотке крови было обнаружено у пациентов с полиартрикулярным и системным ЮИА [47], в том числе при системном варианте с синдромом активации макрофагов [24]. Однако другими авторами [21]

у детей с системным началом ЮИА, как в стадии активности заболевания, так и в период ремиссии, обнаружена самая низкая концентрация IL-10 по сравнению с группами больных с олиго- и полиартрикулярной формами.

Уровень спонтанной продукции IL-1ra клетками цельной крови у обследованных нами больных с ЮИА не отличался от контрольных значений, тогда как способность клеток крови синтезировать этот ЦК после их инкубации с митогеном у пациентов с ювенильным артритом была существенно снижена по сравнению с группой здоровых детей (табл. 2). В литературе имеются единичные публикации, посвященные стимулированной выработке IL-1ra у больных с ЮИА. K. Müller и соавт. не выявили различий между больными с ЮИА и здоровыми детьми по уровню IL-1ra при использовании в качестве стимуляторов липополисахарида *Escherichia coli* и фитогемагглютинаина [36]. Однако эти авторы обнаружили увеличение сывороточного содержания IL-1ra у пациентов с системным вариантом ЮИА по сравнению со здоровыми детьми, причем значения IL-1ra значимо коррелировали с концентрацией IL-6 [36]. В другой работе установлено, что подъемы температуры тела у детей с ЮИА были ассоциированы с увеличением уровней IL-6 и IL-1ra в сыворотке крови, авторами высказано предположение, что IL-6 стимулирует синтез IL-1ra [42]. В нашем предварительном исследовании спонтанный уровень IL-6 в супернатантах культур клеток крови у детей с ЮИА не отличался от контрольного. При оценке ФГА-стимулированной продукции IL-6 выявлено увеличение концентрации этого белка у больных с ювенильным артритом по сравнению со здоровыми детьми. В настоящей работе у этих же больных не обнаружено различий по спонтанной продукции IL-1ra, но выявлено снижение стимулированной концентрации этого ЦК в супернатантах культур цельной крови. Установлена взаимосвязь между спонтанной ($R = 0,39$; $p < 0,001$) и митоген-стимулированной ($R = 0,45$; $p < 0,001$) концентрацией этих белков в супернатантах клеток крови.

Снижение выработки IL-1ra при использовании митогена у пациентов с ювенильным артритом может указывать на истощение резервных возможностей клеток в условиях продолжительного течения воспалительного процесса. Недостаточная продукция IL-1ra может вносить существенный вклад в патогенез ЮИА, так как этот ЦК подавляет действие провоспалительного цитокина IL-1 [14]. Более того, есть опыт успешного применения рекомбинантного IL-1ra в качестве

лекарственного препарата при лечении заболевания суставов как у детей, так и у взрослых [10, 11, 17, 50].

Наибольшие различия между исследованными группами обнаружены для продукции TGF- β . Спонтанный и стимулированный уровень TGF- β в супернатантах культур клеток крови у детей с ЮИА был ниже, чем в контрольной группе (табл. 2). Публикации о продукции TGF- β клетками крови в условиях *in vitro* и *in vivo* у детей с этим заболеванием практически отсутствуют. S. Narsini и соавт. при исследовании полиморфизма гена TGF- β у больных с ЮИА выявили различия со здоровыми детьми по частоте встречаемости некоторых аллельных вариантов, что может указывать на вовлеченность данного ЦК в патогенез ЮИА [26]. Литературные данные о сывороточной концентрации и продукции TGF- β *in vitro* у взрослых пациентов и детей с суставной патологией также крайне скудны. В одной из единичных публикаций сообщается о снижении концентрации TGF- β в сыворотке крови у взрослых пациентов с ревматоидным артритом по сравнению с контролем [38]. В другой работе выявлено, что уровень TGF- β в синовиальной жидкости у взрослых с ревматоидным артритом был выше, чем у здоровых доноров, а также пациентов с реактивным артритом и недифференцированной спондилоартропатией [46]. Полное отсутствие спонтанного синтеза культурами клеток крови TGF- β у большинства обследованных нами пациентов с ЮИА и существенное снижение ФГА-стимулированной продукции этого ЦК свидетельствуют о высокой важности нарушения выработки TGF- β в патогенезе ЮИА.

В наших предварительных исследованиях у детей с ЮИА было выявлено увеличение спонтанной и/или стимулированной продукции клетками крови ЦК, обладающих провоспалительным действием — IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α и IFN γ . В настоящей работе продемонстрировано снижение или отсутствие разницы по концентрации IL-1ra, IL-4, IL-10 и TGF- β в супернатантах спонтанных и/или стимулированных культур цельной крови у тех же самых больных. Следовательно, у детей с ЮИА наблюдается диспропорция выработки про- и противовоспалитель-

ных ЦК со смещением в сторону первых. Баланс между синтезом про- и противовоспалительных цитокинов является значимым моментом в регуляции воспалительной реакции, от которого зависит характер течения патологического процесса и исход заболевания [5].

Заключение

Таким образом, более низкая по сравнению с контролем спонтанная продукция клетками крови TGF- β и стимулированная выработка IL-1ra и TGF- β у пациентов с ЮИА отражает значимость данных противовоспалительных цитокинов в развитии хронического воспаления суставов у детей. Используемый в нашей работе подход одновременного исследования как спонтанного, так и индуцированного синтеза цитокинов клетками цельной крови может быть применен для характеристики функционирования иммунокомпетентных клеток и иммунной системы в целом у пациентов с ювенильным идиопатическим артритом и другими аутоиммунными и аутовоспалительными заболеваниями. Стимуляция клеток способна выявить скрытый дефицит синтеза ЦК, не проявляющийся при определении его концентрации в сыворотке крови или супернатантах спонтанных клеточных культур, как это показано на примере исследования продукции IL-1ra. Дальнейшее изучение продукции противовоспалительных ЦК клетками периферической крови может быть полезно для разработки новых эффективных способов терапии и персонализированного подхода к лечению различных заболеваний. Применение рекомбинантных молекул в качестве терапевтического средства может компенсировать недостаток или отсутствие ЦК *in vivo* и скорректировать цитокиновый дисбаланс, возникающий при различных функциональных дефектах иммунокомпетентных клеток.

Благодарности

Авторы приносят искреннюю благодарность врачам ГБУЗ СО ОДКБ № 1 Козловой Е.С., Скоробогатовой О.В. за подбор пациентов для исследования.

Список литературы / References

1. Авдеева А.С., Кусевич Д.А. Роль лабораторных биомаркеров в прогнозировании эффективности терапии ритуксимабом при ревматоидном артрите (новые данные) // Научно-практическая ревматология, 2017. Т. 55, № 3. С. 295-303. [Avdeeva A.S., Kusevich D.A. The role of laboratory biomarkers in predicting the efficiency of rituximab therapy for rheumatoid arthritis: new evidence. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2017, Vol. 55, no. 3, pp. 295-303. (In Russ.)]

2. Алексеева Е.И. Ювенильный идиопатический артрит: клиническая картина, диагностика, лечение // Вопросы современной педиатрии, 2015. Т. 14, № 1. С. 78-94. [Alekseeva E.I. Juvenile idiopathic arthritis: Clinical picture, Diagnosis, Treatment. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2015, Vol. 14, no. 1, pp. 78-94. (In Russ.)]
3. Алексеева Е.И., Бзарова Т.М. Ювенильный ревматоидный артрит. В кн.: Педиатрия. Национальное руководство. Краткое издание / под ред. А.А. Баранова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 768 с. [Alekseeva E.I., Bzarova T.M. Juvenile idiopathic arthritis. In the book: *Pediatrics. National guidance. Short edition*. Ed. A.A. Baranov]. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 768 p.
4. Герцев А.В., Закревский Ю.Н. Характеристика нейропептидно-цитокинового звена иммунитета у больных с полиморбидной сердечно-сосудистой патологией, протекающей на фоне тревожно-депрессивных расстройств // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 277-284. [Gertsev A.V., Zakrevsky Yu.N. Characteristics of neuropeptide-cytokine immunity links in patients with combined cardiovascular pathology, proceeding with anxiety/depression disorder. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 277-284. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-277-284.
5. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике // Цитокины и воспаление, 2003. Т. 2, № 3. С. 20-35. [Demyanov A.V., Kotov A.Yu., Simbirtsev A.S. Diagnostic value of cytokine studies in clinical practice. *Citokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2003, Vol. 2, no. 3, pp. 20-35. (In Russ.)]
6. Каледа М.И., Никишина И.П., Шаповаленко А.Н., Костарева О.М., Федоров Е.С. Феномен нейтропении на фоне терапии тоцилизумабом у пациентов с ювенильным идиопатическим артритом // Научно-практическая ревматология, 2017. Т. 55, № 6. С. 662-667. [Kaleda M.I., Nikishina I.P., Shapovalenko A.N., Kostareva O.M., Fedorov E.S. The phenomenon of neutropenia during tocilizumab therapy in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2017, Vol. 55, no. 6, pp. 662-667. (In Russ.)]
7. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. *Cytokines*]. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.
8. Кожевников А.Н., Поздеева Н.А., Конев М.А., Селизов В.В., Прокопович Е.В., Никитин М.С., Москаленко А.В., Афоничев К.А. Ювенильный артрит: клинико-инструментальная картина и дифференциальная диагностика // Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста, 2014. Т. 2, № 4. С. 66-73. [Kozhevnikov A.N., Pozdeeva N.A., Konev M.A., Selizov V.V., Prokopovich E.V., Nikitin M.S., Moskalenko A.V., Afonichev K.A. Juvenile arthritis: clinical manifestations and differential diagnosis. *Ortopediya, travmatologiya i vosstanovitelnaya khirurgiya detskogo vozrasta = Pediatric Traumatology, Orthopaedics and Reconstructive Surgery*, 2014, Vol. 2, no. 4, pp. 66-73. (In Russ.)]
9. Коненков В.И., Ракова И.Г., Авдошина В.В., Гельфгат Е.Л. Комплексная оценка уровня спонтанной продукции цитокинов в культуре мононуклеарных клеток периферической крови здорового человека // Цитокины и воспаление, 2005. № 2. С. 33-37. [Konenkov V.I., Rakova I.G., Avdoshina V.V., Gelfgat E.L. Complex evaluation of spontaneous cytokines production in the culture of peripheral blood mononuclear cells of healthy person. *Citokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2005, no. 2, pp. 33-37. (In Russ.)]
10. Костик М.М. Применение анакинры у пациентов с криопиринассоциированными периодическими синдромами и другими аутовоспалительными заболеваниями // Вопросы современной педиатрии, 2016. Т. 15, № 6. С. 576-583. [Kostik M.M. Use of anakinra in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes and other autoinflammatory diseases. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2016, Vol. 15, no. 6, pp. 576-583. (In Russ.)]
11. Никишина И.П., Каледа М.И. Современная фармакотерапия системного ювенильного артрита // Научно-практическая ревматология, 2015. Т. 53, № 1. С. 84-93. [Nikishina I.P., Kaleda M.I. Current pharmacotherapy for systemic juvenile arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2015, Vol. 53, no. 1, pp. 84-93. (In Russ.)]
12. Пашнина И.А., Криволапова И.М., Козлова Е.С., Скоробогатова О.В., Тузанкина И.А., Черешнев В.А. Аутоантитела при ювенильных артритах у детей // Российский иммунологический журнал, 2013. Т. 7 (16), № 4. С. 437-444. [Pashnina I.A., Krivolapova I.M., Kozlova E.S., Skorobogatova O.V., Tuzankina I.A., Chereshevnev V.A. Autoantibodies in children with juvenile arthritis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (16), no. 4, pp. 437-444. (In Russ.)]
13. Полушина Л.Г., Светлакова Е.Н., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В., Базарный В.В. Клинико-патогенетическое значение некоторых цитокинов при пародонтите // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6.

С. 803-806. [Polushina L.G., Svetlakova E.N., Sementsova E.A., Mandra Yu.V., Bazarny V.V. Clinico-pathogenetic value of some cytokines in periodontitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 803-806. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-803-806.

14. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // Медицинский академический журнал, 2013. Т. 13, № 3. С. 18-41. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and noninfectious human diseases. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2013, Vol. 13, no. 3, pp. 18-41. (In Russ.)]

15. Чернышева О.Е., Конюшевская А.А., Вайзер Н.В., Балычевцева И.В. Ювенильный артрит: терминология, классификация, диагностические критерии, этиология, патогенез, современные аспекты (обзор литературы) // Травма, 2017. Т. 18. № 4. С. 16-24. [Chernyshova O.E., Konyshetskaya A.A., Vaizer N.V., Balychevtseva I.V. Juvenile arthritis: terminology, classification, diagnostic criteria, etiology, pathogenesis, modern aspects (review of the literature). *Travma = Trauma*, 2017, Vol. 18, no. 4, pp. 16-24. (In Russ.)]

16. Aggarwal A., Mishra R. Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells patients with juvenile idiopathic arthritis. *Indian Pediatrics.*, 2002, no. 39, pp. 739-742.

17. Barut K., Adrovic A., Şahin S., Kasapçopur O. Juvenile idiopathic arthritis. *Balkan Med. J.*, 2017, Vol. 34, no. 2, pp. 90-101.

18. Brescia A.C., Simonds M.M., Sullivan K.E., Rose C.D. Secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines and loss of regulatory signals by fibroblast-like synoviocytes in juvenile idiopathic arthritis. *Proteomics Clin. Appl.*, 2017, Vol. 11, no. 5-6.

19. Chyuan I.T., Chen J.Y. Role of interleukin- (IL-) 17 in the pathogenesis and targeted therapies in spondyloarthropathies. *Mediators Inflamm.*, 2018, 2403935, 8 p. doi: 10.1155/2018/2403935.

20. de Jager. Cytokines in juvenile idiopathic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2017, Vol. 76, no. 2, pp. 16-17.

21. de Jager, Hoppenreijns E.P.A.H., Wulffraat N.M., Wedderburn L.R., Kuis W., Prakken B.J. Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional study. *Ann. Rheum. Dis.*, 2007, no. 66, pp. 589-598.

22. Dong C., Fu T., Ji J., Li Z., Gu Z. The role of interleukin-4 in rheumatic diseases. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2018, Vol. 45, no. 8, pp. 747-754.

23. Guo L., Lu M.P., Dong G.J., Teng L.P., Xu Y.P., Zou L.X., Zheng Q. Clinical and laboratory features of macrophage activation syndrome. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 188-192.

24. Guo L., Lu M.P., Tang Y.M., Teng L.P., Xu Y.P., Zou L.X., Zheng R.J., Zheng Q. Serum cytokine levels in children with newly diagnosed active systemic juvenile idiopathic arthritis. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2014, Vol. 16, no. 12, pp. 1241-1244.

25. Gohar F., Kessel Ch., Lavric M., Holzinger D., Foell D. Review of biomarkers in systemic juvenile idiopathic arthritis: helpful tools or just playing tricks? *Arthritis Res. Ther.*, 2016, Vol. 18, p. 163.

26. Harsini S., Ziaee V., Maddah M., Rezaei A., Sadr M., Zoghi S., Moradinejad M.H., Tahghighi F., Aghighi Y., Rezaei N. Interleukin 10 and transforming growth factor beta 1 gene polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis. *Bratisl. Med. J.*, 2016, Vol. 117, no. 5, pp. 258-262.

27. Heney D., Whicher T.J. Factors affecting the measurement of cytokines in biological fluids: implications for their clinical measurement. *Ann. Clin. Biochem.*, 1995, no. 32, pp. 358-368.

28. Hong K.H., Cho M.L., Min S.Y., Shin Y.J., Yoo S.A., Choi J.J., Kim W.U., Song S.W., Cho C.S. Effect of interleukin-4 on vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 147, no. 3, pp. 573-579.

29. Horai R., Saijo S., Tanioka H., Nakae S., Sudo K., Okahara A., Ikuse T., Asano M., Iwakura Y. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 191, no. 2, pp. 313-320.

30. Huang J.L., Kuo M.L., Hung I.J., Wu C.J., Ou L.H., Cheng J.H. Lowered IL-4-producing T cells and decreased IL-4 secretion in peripheral blood from subjects with juvenile rheumatoid arthritis. *Chang Gung Med. J.*, 2001, Vol. 24, no. 2, pp. 77-83.

31. Johdi N.A., Mazlan L., Sagap I., Jamal R. Profiling of cytokines, chemokines and other soluble proteins as a potential biomarker in colorectal cancer and polyps. *Cytokine*, 2017, no. 99, pp. 35-42.

32. Kawasumi H., Gono T., Tanaka E., Kaneko H., Kawaguchi Y., Yamanaka H. Clinical characteristics and cytokine profiles of organizing pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with or without biologics. *J. Rheumatol.*, 2014, Vol. 43, no. 4, pp. 738-744.

33. Kutukculer N., Caglayan S., Aydogdu F. Study of pro-inflammatory (TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters. *Clin. Rheumatol.*, 1998, Vol. 17, no. 4, pp. 288-292.
34. Lee C.K., Lee E.Y., Chung S.M., Mun S.H., Yoo B., Moon H.B. Effects of disease-modifying antirheumatic drugs and antiinflammatory cytokines on human osteoclastogenesis through interaction with receptor activator of nuclear factor kappa B, osteoprotegerin, and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. *Arthritis Rheum.*, 2004, Vol. 50, no. 12, pp. 3831-3843.
35. Lijiao J., Meiping L.U., Li G., Jianqiang W.U., Lixia Z., Yiping X.U. Serum levels of Th1/Th2 cytokines in children with non-systemic juvenile idiopathic arthritis. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2016, Vol. 45, no. 3, pp. 281-286.
36. Muller K., Herner E.B., Stagg A., Bendtzen K., Woo P. Inflammatory cytokines and cytokine antagonists in whole blood cultures of patients with systemic juvenile chronic arthritis. *Br. J. Rheumatol.*, 1998, Vol. 37, no. 5, pp. 562-569.
37. Opal S.M., DePalo V.A. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 2000, Vol. 117, no. 4, pp. 1162-1172.
38. Paramalingam S.S., Thumboo J., Vasoo S., Thio S.T., Connie Tse C., Fong K-Y. *In vivo* pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Acad. Med. Singapore*, 2007, Vol. 36, pp. 96-99.
39. Park M.J., Lee S.H., Kim E.K., Lee E.J., Baek J.A., Park S.H., Kwok S.K., Cho M.L. Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of Tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, p. 3753.
40. Petra A.I., Tsilioni I., Taracanova A., Katsarou-Katsari A., Theoharides T.C. Interleukin 33 and interleukin 4 regulate interleukin 31 gene expression and secretion from human laboratory of allergic diseases 2 mast cells stimulated by substance P and/or immunoglobulin E. *Allergy Asthma Proc.*, 2018, no. 39, pp. 153-160.
41. Pignatti P., Vivarelli M., Meazza C., Rizzolo M.G., Martini A., De Benedetti F. Abnormal regulation of interleukin 6 in systemic juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.*, 2001, Vol. 28, no. 7, pp. 1670-1676.
42. Prieur A.M., Roux-Lombard P., Dayer J.M. Dynamics of fever and the cytokine network in systemic juvenile arthritis. *Rev. Rhum. Engl. Ed.*, 1996, Vol. 63, no. 3, pp. 163-170.
43. Raziuddin S., Bahabri S., Al-Dalaan, Siraj A.K., Al-Sedairy S. A mixed Th1/Th2 cell cytokine response predominates in systemic onset juvenile rheumatoid arthritis: immunoregulatory IL-10 function. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1998, no. 86, pp. 192-198.
44. Sadeghi A., Pezeshgi A., Karimimoghaddam A., Moghimi M., Kamali K., Naseri M., Esmaeilzadeh A. Evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in patients with rheumatoid arthritis in comparison with other rheumatic diseases; a nephrology point of view. *J. Nephropharmacol.*, 2017, Vol. 6, no. 2, pp. 98-105.
45. Sapan H.B., Paturusi I., Jusuf I., Patellongi I., Massi M.N., Pusponogoro A.D., Arief S.K., Labeda I., Islam A.A., Rendy L., Hatta M. Pattern of cytokine (IL-6 and IL-10) level as inflammation and anti-inflammation mediator of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in polytrauma. *Int. J. Burn Trauma*, 2016, Vol. 6, no. 2, pp. 37-43.
46. Singh A.K., Misra R., Aggarwal A. Th-17 associated cytokines in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthropathy. *Clin. Rheumatol.*, 2011, Vol. 30, no. 6, pp. 771-776.
47. Shahin A.A., Shaker O.G., Kamal N., Hafez H.A., Gaber W., Shahin H.A. Circulating interleukin-6, soluble interleukin-2 receptors, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-10 levels in juvenile chronic arthritis: correlations with soft tissue vascularity assessed by power Doppler sonography. *Rheumatol Int.*, 2002, Vol. 22, no. 2, pp. 84-88.
48. Swart J.F., van Dijkhuizen E.H.P., Wulffraat N.M., Sytze de Roock. Clinical juvenile arthritis disease activity score proves to be a useful tool in treat-to-target therapy in juvenile idiopathic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2018, Vol. 77, pp. 336-342.
49. Tong Y., Yang T., Wang J., Zhao T., Wang L., Kang Y., Cheng C., Fan Y. Elevated plasma chemokines for eosinophils in neuromyelitis optica spectrum disorders during remission. *Front. Neurol.*, 2018, Vol. 9, no. 44, pp. 1-7.
50. Vastert S.J., de Jager W., Noordman B.J., Holzinger D., Kuis W., Prakken B.J., Wulffraat N.M. Effectiveness of first-line treatment with recombinant interleukin-1 receptor antagonist in steroid-naïve patients with new-onset systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, 2014, Vol. 66, no. 4, pp. 1034-1043.
51. Yamamoto A., Sato K., Miyoshi F., Shindo Y., Yoshida Y., Yokota K., Nakajima K., Akiba H., Asanuma Y., Akiyama Y., Mimura T. Analysis of cytokine production patterns of peripheral blood mononuclear cells from a rheumatoid arthritis patient successfully treated with rituximab. *Mod. Rheumatol.*, 2010, no. 2, pp. 183-187.

52. Yoshimura A., Wakabayashi Y., Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J. Biochem.*, 2010, Vol. 147, no. 6, pp. 781-792.

53. Yu F.Y., Xie C.Q., Jiang C.L., Sun J.T., Huang X.W. TNF α increases inflammatory factor expression in synovial fibroblasts through the toll like receptor 3 mediated ERK/AKT signaling pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Mol. Med. Rep.*, 2018, Vol. 17, no. 6, pp. 8475-8483.

Авторы:

Криволапова И.М. — биолог клинко-диагностической лаборатории ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1»; младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Пашина И.А. — д.б.н., заведующая клинко-диагностической лабораторией ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1»; старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Черешнев В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Krivolapova I.M., Research Biologist, Laboratory of Clinical Diagnostics, Regional Children's Clinical Hospital No. 1; Junior Research Associate, Laboratory of Immunology of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Science, Ekaterinburg, Russian Federation

Pashnina I.A., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Clinical Diagnostics, Regional Children's Clinical Hospital No. 1; Senior Research Associate, Laboratory of Immunology of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Science, Ekaterinburg, Russian Federation

Chereshnev V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Main Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 07.06.2018

Отправлена на доработку 13.06.2018

Принята к печати 22.06.2018

Received 07.06.2018

Revision received 13.06.2018

Accepted 22.06.2018

СРАВНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ мРНК ЦИТОКИНОВ С ИХ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ В СУПЕРНАТАНТЕ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ U937 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА НЕЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ

Аутеншлюс А.И.^{1,2}, Иванов И.Д.², Голованова А.В.¹,
Студеникина А.А.¹, Михайлова Е.С.^{1,2}, Вавилин В.А.²,
Вараксин Н.А.³, Ляхович В.В.²

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

² Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

³ АО «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. Изучение динамики экспрессии цитокинов, а также цитокинпродуцирующего потенциала иммунокомпетентных клеток позволяет расширить исследования их функциональных характеристик. Матричная РНК ряда генов цитокинов относительно стабильна, поэтому ее уровень может быть использован в качестве маркера для оценки степени активации и пролиферации иммунокомпетентных клеток, а также для оценки цитокинпродуцирующего потенциала иммунокомпетентных клеток.

В нашей работе было проведено сравнение показателей экспрессии матричной РНК цитокинов IL-10, TNF α , GM-CSF в дифференцированной в макрофаги клеточной культуре U937 с концентрацией белков этих же цитокинов в супернатанте культуры клеток U937 без воздействия и после воздействия поликлональных активаторов. Показатели экспрессии матричной РНК цитокинов IL-10, TNF α , GM-CSF определяли методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Концентрацию белков этих же цитокинов IL-10, TNF α , GM-CSF в супернатанте культуры клеток U937 измеряли методом иммуноферментного анализа. Использование в исследовании исходно однородной культуры клеток удобно, ввиду идентичности условий во всех вариантах исследования.

Наибольшее влияние поликлональные активаторы оказывают на экспрессию матричной РНК GM-CSF и на концентрацию этого цитокина в супернатанте клеточной культуры. Уровень матричной РНК TNF α при воздействии поликлональных активаторов снижался, в то время как концентрация данного цитокина в супернатанте возрастала. Белок TNF α в клеточной среде не отражает временных изменений в экспрессии клеточной мРНК TNF α , так как уменьшение клеточной мРНК возможно из-за ингибирования по механизму обратной связи. В то время как цитокины могут накапливаться и оставаться в супернатанте, события на уровне матричной РНК, приводящие к их образованию, могут завершаться ранее. Поэтому пути передачи сигналов и кинетику выделения цитокинов следует

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.И. Аутеншлюс, И.Д. Иванов, А.В. Голованова,
А.А. Студеникина, Е.С. Михайлова, В.А. Вавилин,
Н.А. Вараксин, В.В. Ляхович «Сравнение экспрессии
мРНК цитокинов с их концентрацией в супернатанте
клеточной культуры U937 при воздействии на нее
поликлональных активаторов» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 737-742.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-737-742
© Аутеншлюс А.И. и соавт., 2019

For citation:

A.I. Autenshlyus, I.D. Ivanov, A.V. Golovanova,
A.A. Studenikina, E.S. Mikhaylova, V.A. Vavilin,
N.A. Varaksin, V.V. Liakhovich "Expression of mRNA
for cytokines compared to their concentrations in culture
supernates of U937 cells exposed to polyclonal activators",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 4, pp. 737-742.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-737-742
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-737-742

изучать после описания временной зависимости с короткими интервалами, которая может быть индивидуальной для каждого цитокина.

Таким образом, полученные результаты исследования с использованием поликлональных активаторов позволяют сделать выводы о том, что поликлональные активаторы, являясь митогенами, оказывают существенное влияние на концентрацию секретируемых IL-10, TNF α и GM-CSF. При этом поликлональные активаторы оказывают влияние на уровни мРНК генов этих цитокинов, что указывает на транскрипционный механизм его действия. Но в связи с тем, что данные неоднозначны, для достижения большего соответствия изменений изученных белков и мРНК необходимо подробное описание временной зависимости изменений содержания мРНК.

Ключевые слова: цитокины, клеточная культура, иммуноферментный анализ, экспрессия

EXPRESSION OF mRNA FOR CYTOKINES COMPARED TO THEIR CONCENTRATIONS IN CULTURE SUPERNATES OF U937 CELLS EXPOSED TO POLYCLONAL ACTIVATORS

Autenshlyus A.I.^{a,b}, Ivanov I.D.^b, Golovanova A.V.^a, Studenikina A.A.^a, Mikhaylova E.S.^{a,b}, Vavilin V.A.^b, Varaksin N.A.^c, Liakhovich V.V.^b

^a Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Abstract. Investigation of the cytokine expression dynamics as well as the cytokine-producing potential of immune-competent cells allows extensive studies of their functional characteristics. mRNAs encoding a number of cytokine genes are relatively stable, thus their level may be used as a marker for assessing the levels of activation and proliferation of immunocompetent cells as well as for evaluating the cytokine-producing potential of immunocompetent cells.

In our work, we assessed correlations between the levels of mRNA expression specific for IL-10, TNF α , GM-CSF cytokines determined in a culture of differentiated macrophage U937 cells, and protein concentrations of the same cytokines as measured in supernates of U937 cell cultures, without and after exposure to polyclonal activators. The IL-10, TNF α , GM-CSF mRNA expression was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction. Protein concentrations of IL-10, TNF α , GM-CSF cytokines in the culture supernatant of U937 cells were measured by an enzyme immunoassay. The use of an initially homogeneous cell culture in the study is convenient due to the identical conditions in all experimental variants.

The most pronounced effect of polyclonal activators is exerted upon production of GM-CSF mRNA, as well as protein concentration of this cytokine in the cell culture supernatants, thus actually coinciding with RT-qPCR results. The TNF α mRNA level decreased under the influence of polyclonal activators, whereas concentration of this cytokine was decreased in the cell supernate. The TNF α protein in a culture medium did not reflect temporal changes in the cellular TNF α mRNA expression, probably, due to potential decrease of cellular mRNA occurring by the feedback inhibitory mechanism. While the cytokines can accumulate and remain in the supernatant, the mRNA-related events leading to cytokine formation may be completed earlier. Therefore, the signalling pathways and cytokine release kinetics should be studied after establishing the time dependence at short time intervals, which may be individual for each cytokine.

Thus, the results of a study using polyclonal activators suggest that polyclonal activators applied as mitogens, have a significant effect upon the concentration of secreted IL-10, TNF α and GM-CSF. In this case, polyclonal activators affect the levels of mRNA encoded by cytokine genes, thus indicating transcriptional mechanisms of its action. But, in view of the fact that the data are ambiguous, in order to achieve greater correspondence between the changes in the studied proteins and specific mRNAs, a detailed description of the time dependence is required for the changes in mRNA contents.

Keywords: cytokines, cell culture, linked immunosorbent assay, expression

Известно, что для определения активации клеток иммунной системы используют метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-qPCR), позволяющий оценивать в одной пробе большое количество транскриптов генов и проводить одновременное исследование широкого спектра цитокинов в одной временной точке [9, 12]. Изучение динамики экспрессии цитокинов, а также цитокинпродуцирующего потенциала иммунокомпетентных клеток позволяет расширить исследования их функциональных характеристик.

Так как цитокины являются быстрыми сигнальными молекулами, мРНК многих из них нестабильна, подвергается быстрой деградации и обычно служит субстратом для других сигнальных механизмов в клетке. Тем не менее мРНК ряда генов цитокинов относительно стабильна, поэтому ее уровень может быть использован в качестве маркера для оценки степени активации и пролиферации иммунокомпетентных клеток [2, 7], а также для оценки цитокинпродуцирующего потенциала иммунокомпетентных клеток.

В частности, молекулярные исследования цитокинов проводят на культуре клеток U937, которая является промоноцитарной клеточной линией миелоидного лейкоза человека [11]. Эта линия обладает характеристиками моноцитов и проста в использовании, например в качестве экспериментальной модели для выяснения механизмов дифференциации моноцитов и макрофагов, которые выполняют три основные функции: фагоцитоз, презентация антигена и производство цитокинов [6].

Существующие технологии анализа позволяют провести исследование культуры клеток различными методами одновременно. Например, можно исследовать уровень белковых продуктов методом ELISA и проводить RT-qPCR в одной временной точке. С помощью анализа показателей экспрессии мРНК различных генов, в том числе цитокинов, можно создавать комплексные профили селективной индукции большого количества генов высокоспецифичных для конкретной популяции иммунокомпетентных клеток [1].

Целью настоящего исследования явилось сравнение показателей экспрессии мРНК цитокинов в клетках U937 с концентрацией белков этих же цитокинов в супернатанте культуры клеток U937, подвергнутых воздействию поликлональных активаторов.

Суспензионную культуру U937 выращивали в среде RPMI, содержащей 10% фетальной сыворотки при температуре 37 °С, в атмосфере 5% CO₂ до концентрации $1,5 \times 10^6$ клеток на мл среды. Клетки осаждали при 800 g в течение 5 мин и ресуспендировали в свежей порции среды, со-

держащей форбол-12-миристан-13 ацетат (ФМА) в концентрации 60 нг/мл. Во всех вариантах исследования количество клеток было одинаковым. Использование в исследовании исходно однородной культуры клеток удобно, ввиду идентичности условий во всех вариантах исследования. После того как через 72 ч моноциты трансформировались в макрофаги, удаляли культуральную жидкость и вместе с ней не осевшие клетки. Затем инкубировали макрофаги в свежей порции среды без ФМА в течение 48 ч [5, 10].

Для индукции цитокинов в этих предварительно дифференцированных клетках (макрофагах) использовали комплекс поликлональных активаторов (ПА), состоящий из фитогемагглютинаина Р (PHA-P; Sigma) – 2 мкг, фитогемагглютинаина М (PHA-M; Sigma) – 2 мкг, конканавалина А (ConA; Sigma) – 4 мкг, липополисахарида (LPS; Sigma) – 2 мкг (стандартный набор «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ», производство АО «Вектор-Бест». После 24 часов воздействия из культуральной жидкости удаляли клеточный дебрис центрифугированием при 2000 g × 4 мин, а супернатант использовали для определения концентрации продуцируемых макрофагами цитокинов. В супернатанте с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) определяли концентрации следующих цитокинов: IL-10, TNFα, GM-CSF. Использовали наборы реагентов производства АО «Вектор-Бест».

Из предварительно дифференцированных клеток (макрофагов) выделяли РНК с использованием TRI-REAGENT (MRC, США), согласно протоколу производителя. На обработку одной 3-сантиметровой лунки с клетками брали 200 мкл реагента, клеточный лизат дважды экстрагировали 100 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1), разделяя фазы центрифугированием в течение 5 мин при 10 000 g. Затем вносили 200 мкл изопропилового спирта, осаждали РНК при 12 000 g в течение 10 мин, дважды промывали осадок 80% этанолом, подсушивали и растворяли в бидистиллированной воде, содержащей RNase-free реагент (Ambion, США). Препараты РНК хранили при -70 °С, использовали для обратной транскрипции в течение 24–48 ч.

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems), согласно протоколу производителя. На реакцию брали 2–5 мкг суммарной РНК, добавляли рандом-праймеры, нагревали в течение 5 мин при 70 °С и переносили в ледяную баню на 2 мин, затем вносили смесь остальных реагентов (РНК-зависимую ДНК-полимеразу, дезоксинуклеотидтрифосфаты), инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, затем в термостате

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ

TABLE 1. SEQUENCES OF OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS

Ген Gene	Последовательности Sequences
<i>GAPDH</i>	F:5'-GGAGTCAACGGATTTGGTC-3' R:5'-TGGGTGGAATCATATTGGAACAT-3'
<i>TNFA</i>	F:5'-GCTGAT CCGATTCTGAAAC-3' R: 5'-CTCAGCTTGAGGGTTTGC-3'
<i>GM-CSF</i>	F:5'-GCTGCTGAGATGAATGAAACAG-3' R:5'-CGGAACTTCCTGTGCAAC-3'
<i>IL 10</i>	F:5'-CAAGGCGCATGTGAACTC-3' R:5'-GCTTTGTAGATGCCTTTCTCTTG-3'

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ мРНК РАЗЛИЧНЫХ ЦИТОКИНОВ В КЛЕТКАХ U937, ВЫЯВЛЕННЫЙ ПРИ ПОМОЩИ RT-qPCR

TABLE 2. LEVEL OF mRNA OF VARIOUS CYTOKINES IN U937 CELLS DETECTED BY RT-qPCR

Ген Gene	Ct (СП) Ct (SP)	ΔCt	Ct (ПА) Ct (PA)	ΔCt
<i>IL 10</i>	27,26	10,76	29,19	10,34
<i>GAPDH</i>	16,50		18,85	
<i>TNFA</i>	25,44	9,20	28,65	10,33
<i>GAPDH</i>	16,24		18,32	
<i>GM-CSF</i>	31,10	14,90	27,79	9,49
<i>GAPDH</i>	16,20		18,30	

Примечание. ΔCt – разность между циклами выхода исследуемого цитокина и *GAPDH*. Ct (СП) – пороговый цикл при спонтанной продукции цитокина, Ct (ПА) – пороговый цикл при воздействии поликлональных активаторов.

Note. ΔCt, difference between the yield cycles of the cytokine and *GAPDH* studied. Ct (SP), threshold cycle for spontaneous cytokine production, Ct (PA), threshold cycle when exposed to polyclonal activators.

2 ч при 37 °С. По окончании реакцию останавливали прогреванием при 85 °С в течение 15 мин.

RT-qPCR проводили с использованием “Био-Мастер HS-qPCR SYBR Blue (2×)” (ООО Биоллабмикс, г. Новосибирск). Подобранные условия позволяли проводить амплификацию каждого из выбранных для исследования генов: 95 °С – 3 мин; 45 циклов (95 °С – 12 с, 58 °С – 15 с, 72 °С – 20 с, измерение флуоресценции); построение кривой плавления. На каждую точку брали по три повтора. В качестве референсного гена использовали *GAPDH*. Дизайн праймеров осуществляли с использованием онлайн-программы <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>. Последовательности праймеров приведены в таблице 1.

«Пороговый цикл» Ct строго коррелирует с начальным количеством комплементарной ДНК (кДНК, синтезированная на матрице мРНК в реакции обратной транскрипции) в пробе. Линейно зависит от логарифма количества исходной кДНК (обратно пропорциональная зависимость). Как видно из данных, представленных в таблице 2, наибольшее влияние ПА оказал на уровень мРНК *GM-CSF* – фактора роста продуцируемого дифференцированными в макрофа-

ги клетками U937. Что касается уровней мРНК *IL-10* и *TNFα*, то их изменения под влиянием ПА были менее выражены, по сравнению с мРНК *GM-CSF*.

Анализируя данные таблицы 3, можно прийти к заключению, что наиболее выраженное влияние ПА оказывает на продукцию ростового фактора, вырабатываемого макрофагами *GM-CSF*, что в принципе совпадает с результатами RT-qPCR. Сравнивая данные таблиц 2 и 3, необходимо отметить, что уровень мРНК *TNFα* при воздействии ПА снижался, в то время как концентрация данного цитокина в супернатанте возрастала. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о том, что белок *TNFα* в клеточной среде не отражает временных изменений в экспрессии клеточной мРНК *TNFα*, так как уменьшение клеточной мРНК возможно из-за ингибирования по механизму обратной связи [3, 8, 13].

В то время как цитокины могут накапливаться и оставаться в супернатанте, события на уровне мРНК, приводящие к их образованию, могут завершаться ранее [3, 4, 8, 13]. Поэтому пути передачи сигналов и кинетику выделения цитоки-

ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТЕ КЛЕТОК

TABLE 3. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN THE CELL SUPERNATANT

Цитокины Cytokines	СП (пг/мл) SP (pg/ml)	ПА (пг/мл) PA (pg/ml)	ИВПА (у. е.) IVPA (с. у.)
IL-10	40,4	250,6	6,2
TNF α	96,6	308,3	3,2
GM-CSF	9,5	452,5	47,6

Примечание. СП – спонтанная продукция цитокина; ПА – при воздействии поликлональных активаторов. ИВПА = А/Б, где А – уровень стимулированной ПА продукции цитокина, Б – уровень спонтанной продукции цитокина.

Note. SP, spontaneous production of cytokine; PA, when exposed to polyclonal activators. IVPA = A/B, where A is the level of stimulated PA production of the cytokine, B is the level of spontaneous cytokine production.

нов следует изучать после описания временной зависимости с короткими интервалами, которая может быть индивидуальной для каждого цитокина.

Таким образом, полученные результаты исследования с использованием ПА позволяют сделать выводы о том, что: ПА, являясь митогенами, оказывают существенное влияние на концен-

трацию секретируемых IL-10, TNF α и GM-CSF; ПА оказывают влияние на уровни мРНК генов этих цитокинов, что указывает на транскрипционный механизм его действия; для достижения большего соответствия изменений изученных белков и мРНК необходимо подробное описание временной зависимости изменений содержания мРНК.

Список литературы / References

1. Чулкина М.М., Трофимов Д.Ю., Кофиади И.А., Алексеев Л.П., Савилова А.М. Комплексный анализ кинетики экспрессии мРНК цитокинов в реакции бластной трансформации с митогеном кона // Иммунология, 2014. Т. 36, № 6. С. 306-312. [Chulкина М.М., Trofimov D.Yu., Kofiadi I.A., Alekseev L.P., Savilova A.M. Complex analysis of kinetics of mRNA expression of cytokines in the blast transformation reaction with mitogen of the cola. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 36, no. 6, pp. 306-312. (In Russ.)]
2. Hitti E., Iakovleva T., Brook M., Deppenmeier S., Gruber A.D., Radzioch D., Clark A.R., Blackshear P.J., Kotlyarov A., Gaestel M. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol. Cell. Biol.*, 2006, Vol. 26, no. 6, pp. 2399-2407.
3. Huang H., Fletcher A., Niu Y., Wang T.T.Y., Yu L. Characterization of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression in macrophages and monocytes. *Inflamm. Res.*, 2012, Vol. 61, no. 1, pp. 1329-1338.
4. Jaguin M., Houlbert N., Fardel O., Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.*, 2013, Vol. 281, no. 1, pp. 51-61.
5. Kang K., Jung H., Nam S., Lim J.S. NDRG2 Promotes GATA-1 Expression through regulation of the JAK2/STAT Pathway in PMA-stimulated U937 cells. *Immune Netw.*, 2011, Vol. 11, no. 6, pp. 348-357.
6. Liu L., Zubik L., Collins F.W., Marko M., Meydani M. The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds. *Atherosclerosis*, 2014, Vol. 175, no. 1, pp. 39-49.
7. Mahmoud L., Al-Enezi F., Al-Saif M., Warsy A., Khabar K.S., Hitti E.G. Sustained stabilization of Interleukin-8 mRNA in human macrophages. *RNA Biol.*, 2014, Vol. 11, no. 2, pp. 124-133.
8. Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., Fisher E.A., Gilroy D.W., Goerdt S., Gordon S., Hamilton J.A., Ivashkiv L.B., Lawrence T., Locati M., Mantovani A., Martinez F.O., Mege J.L., Mosser D.M., Natoli G., Saeij J.P., Schultze J.L., Shirey K.A., Sica A., Suttles J., Udalova I., van Ginderachter J.A., Vogel S.N., Wynn T.A. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 2014, Vol. 41, no. 1, pp. 14-20.
9. Nemeth Z.H., Bogdanovski D.A., Barratt-Stopper P., Paglinco S.R., Antonioli L., Rolandelli R.H. Crohn's disease and ulcerative colitis show unique cytokine profiles. *Cureus*, 2017, Vol. 9, no. 4, pp. 1-11.
10. Song M.G., Ryoo I.G., Choi H.Y., Choi B.H., Kim S.T., Heo T.H., Lee J.Y., Park P.H., Kwak M.K. NRF2 signaling negatively regulates phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-Induced differentiation of human monocytic U937 cells into pro-inflammatory macrophages. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 7, pp. 1-18.
11. Sundstrom C., Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer*, 1976, Vol. 17, no. 5, pp. 565-577.
12. Wang X., Guo J., Wang Y., Xiao Y., Wang L., Hua S. Expression levels of interferon regulatory factor 5 (IRF5) and related inflammatory cytokines associated with severity, prognosis, and causative pathogen in patients with community-acquired pneumonia. *Med. Sci. Monit.*, 2018, Vol. 30, no. 24, pp. 3620-3630.

13. Wong L.Y.F., Cheung B.M.Y., Li Y.Y., Tang F. Adrenomedullin is both proinflammatory and antiinflammatory: its effects on gene expression and secretion of cytokines and macrophage migration inhibitory factor in NR8383 macrophage cell line. *Endocrinology*, 2005, Vol. 146, no. 3, pp. 1321-1327.

Авторы:

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

Иванов И.Д. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

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

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

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

Вавилин В.А. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией метаболизма лекарств и фармакокинетики, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Вараксин Н.А. — заведующий лабораторией АО «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Ляхович В.В. — д.б.н., профессор, академик РАН, научный руководитель лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Authors:

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

Ivanov I.D., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

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

Vavilin V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Senior Research Associate, Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

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

Liakhovich V.V., PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Research Supervisor, Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 17.09.2018
Отправлена на доработку 19.09.2018
Принята к печати 19.09.2018

Received 17.09.2018
Revision received 19.09.2018
Accepted 19.09.2018

ЦИТОКИНЫ КАК ПРЕДИКТОРЫ КИШЕЧНОЙ МЕТАПЛАЗИИ ЖЕЛУДКА

Матвеева Л.В.

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Резюме. В основе заболеваний гастродуоденальной зоны лежит воспалительный процесс на фоне изменений мукозальной микробиоты. Хронизация воспаления слизистой оболочки желудка развивается и поддерживается путем индукции *Helicobacter pylori* и другими микроорганизмами секреции эпителиоцитами и иммунными клетками как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. В условиях дисбиоза и иммунной дисрегуляции желудочный эпителий может уподобляться тонкокишечному или толстокишечному. Целью работы стало определение диагностической и прогностической ценности цитокинов при кишечной метаплазии желудочного эпителия.

При информированном согласии 204 больных с обострением хронического гастрита, язвенной болезни желудка, полипозом желудка и 40 здоровых добровольцев проводили забор гастробиоптатов при эзофагогастродуоденоскопии (для гистологического и микробиологического исследования), 5 мл венозной крови с отделением сыворотки (для иммуноферментного анализа). Сывороточные уровни цитокинов исследовали твердофазным иммуноферментным методом. При статистической обработке результатов вычисляли чувствительность, специфичность показателей, уравнения логистической регрессии, строили характеристические кривые с определением индекса согласованности модели по площади под кривыми (AUC).

При гистологическом исследовании гастробиоптатов признаки тонкокишечной метаплазии были обнаружены у 61 (29,90%) больного, толстокишечной — у 40 (19,61%), отсутствовали у клинически здоровых добровольцев. Наибольшая чувствительность при тонкокишечной метаплазии отмечалась у интерлейкина (IL)-6, IL-4, эритропоэтина (EPO), туморнекротизирующего фактора (TNF) α , IL-18, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), интерферона (IFN) α , при толстокишечной метаплазии — у рецепторного антагониста IL-1 β (IL-1ra), IL-8, EPO, IL-18, моноцитарного хемоаттрактантного протеина (MCP)-1, VEGF, IFN α , IL-1 β , IL-6, IL-17. Общим признаком стало увеличение IL-6, EPO, IL-18, VEGF, IFN α , косвенно с учетом функциональной активности цитокинов указывающее на микробную контаминацию желудка, тканевую гипоксию с активацией ангиогенеза, подтверждая этапность кишечной метаплазии в канцерогенезе желудка. Наибольшая специфичность при тонкокишечной метаплазии отмечалась у IL-1 β , IL-1ra, IL-8, IL-17, IL-2, IL-10, при толстокишечной метаплазии — у IL-18, IFN α , IL-4, MCP-1, VEGF. При тонкокишечной метаплазии интервал AUC больше 0,7 определялся у IL-2, больше 0,65 — у VEGF, при толстокишечной метаплазии больше 0,91 — у IL-18, VEGF, MCP-1, IFN α , и имел уровень значимости $< 0,001$. Полученные прогностические модели развития кишечной метаплазии желудка, судя по AUC, имели очень хорошее (табл. 2, формула 1) и отличное качество (табл. 2, 3, формулы 2–11), что подтверждалось высоким процентом верно классифицированных признаков метаплазии.

Адрес для переписки:

Матвеева Любовь Васильевна
ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский
Мордовский государственный университет имени
Н.П. Огарёва»
430032, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск,
ул. Ульянова, 26.
Тел.: 8 (8342) 35-25-16.
Факс: 8 (8342) 32-19-83.
E-mail: MatveevaLjubov1@mail.ru

Address for correspondence:

Matveeva Lyubov V.
National Research Mordovia State University
430032, Russian Federation, Republic of Mordovia, Saransk,
Ulyanov str., 26.
Phone: 7 (8342) 35-25-16.
Fax: 7 (8342) 32-19-83.
E-mail: MatveevaLjubov1@mail.ru

Образец цитирования:

Л.В. Матвеева «Цитокины как предикторы кишечной метаплазии желудка» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 743–748.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-743-748
© Матвеева Л.В., 2019

For citation:

L.V. Matveeva “Cytokines as predictors of intestinal metaplasia of stomach”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 743–748.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-743-748
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-743-748

Определение сывороточных цитокинов при кишечной метаплазии желудочного эпителия является диагностически и прогностически ценным, следует использовать для ранней диагностики предраковых состояний желудка как изолированно (IL-2, VEGF), так и в комбинации показателей согласно рассчитанным уравнениям логистической регрессии.

Ключевые слова: интерлейкин, интерферон, моноцитарный хемотаксический протеин, *Helicobacter pylori*, кишечная метаплазия, желудочный эпителий, диагностическая ценность

CYTOKINES AS PREDICTORS OF INTESTINAL METAPLASIA OF STOMACH

Matveeva L.V.

National Research Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Abstract. An inflammatory process accompanied by the changes in mucosal microbiota is underlying the gastroduodenal diseases. Chronic inflammation of gastric mucosa is developed and supported by secretion of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines by epithelial cells and immune cells induced by *Helicobacter pylori* and other microorganisms. Under the conditions of dysbiosis and immune dysregulation, gastric epithelial layer becomes like intestinal or colonic epithelium. The aim of this work was to determine diagnostic and prognostic value of cytokines in intestinal metaplasia of gastric epithelium.

204 patients with exacerbation of chronic gastritis, gastric ulcer, gastric polyposis and 40 healthy volunteers were included into the study, under their informed consent. The gastric biopsies were sampled by means of esophagogastroduodenoscopy (for histological and microbiological examination), along with drawing 5 ml of venous blood with serum separation (for enzyme immunoassay). Serum cytokine levels were studied by solid-phase enzyme immunoassay. In statistical evaluation of the results, we have calculated sensitivity, specificity of indexes, logistic regression equations, characteristic curves were built with the definition of the index of consistency of the model by the area under the curves (AUC).

Histological examination of gastric biopsies showed features of intestinal metaplasia in 61 patients (29.90%), colonic metaplasia was found in 40 cases (19.61%), being absent in healthy volunteers. The greatest sensitivity of intestinal metaplasia was observed for plasma levels of interleukin (IL)-6, IL-4, erythropoietin (EPO), tumor necrosis factor (TNF) α , IL-18, vascular endothelial growth factor (VEGF), interferon (IFN) α levels; in colonic metaplasia, for receptor antagonist IL-1 β (IL-1ra), IL-8, EPO, IL-18, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, VEGF, IFN α , IL-1 β , IL-6, IL-17. An increase in IL-6, EPO, IL-18, VEGF, IFN α were also common, thus indicative for changed functional activity of cytokines due to microbial contamination of gastric mucosa, tissue hypoxia with activation of angiogenesis, confirming a transition of intestinal metaplasia to gastric carcinogenesis. The greatest specificity in intestinal metaplasia was observed for IL-1 β , IL-1ra, IL-8, IL-17, IL-2, IL-10; in colonic metaplasia, for IL-18, IFN α , IL-4, MCP-1, VEGF. In the intestinal metaplasia, the AUC interval was higher than 0.7 for IL-2, higher than 0.65, in VEG; in colonic metaplasia > 0.91, for IL-18, VEGF, MCP-1, IFN α , having a significance level of < 0.001. The obtained prognostic models of intestinal metaplasia of gastric epithelium, according to the AUC index, had very good (Table 2, formula 1) and excellent quality (Table 2, 3, formula 2-11), confirmed by a high percent of cases which were correctly classified of metaplasia.

Determination of serum cytokines in intestinal metaplasia of gastric epithelium is of diagnostic and prognostic value, and should be used for early diagnosis of precancerous conditions of the gastric mucosa, both as single indexes (IL-2, VEGF), and combined indicators, according to the calculated logistic regression equations.

Keywords: interleukin, interferon, monocyte chemotactic protein, *Helicobacter pylori*, intestinal metaplasia, gastric epithelium, diagnostic value

Introduction

At the heart of the diseases of the gastroduodenal zone there is an inflammatory process against the background of changes in the mucosal microbiota [1, 4]. The chronic inflammation of the gastric mucosa

developed and supported by induction of *Helicobacter pylori* and other microorganisms of secretion of epithelial cells and immune cells as pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines [2-5]. In conditions of dysbiosis and immune dysregulation gastric

epithelium is like intestinal or colonic – metaplasia. Given the high prevalence and mortality of gastric cancer, the study of cytokine profile in intestinal metaplasia of the gastric as a precancerous change in the gastric mucosa is very relevant.

The aim of the work was to determine the diagnostic and prognostic value of cytokines in intestinal metaplasia of gastric epithelium.

Materials and methods

With the informed consent of 204 patients with exacerbation of chronic gastritis, gastric ulcer, gastric polyposis and 40 healthy volunteers, the sampling of gastrobiopsies was carried out with esophagogastroduodenoscopy (for histological and microbiological examination), 5 ml of venous blood with serum separation (for enzyme immunoassay).

Serum cytokine levels interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, receptor antagonist IL-1 β (IL-1ra), interferon (IFN) α , IFN γ , tumor necrosis factor (TNF) α , monocyte chemoattractants protein (MCP)-1, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), erythropoietin (EPO), vascular endothelial growth factor (VEGF) were studied by solid-phase enzyme immunoassay with the use of reagent kits of CC “Vector-Best” (Russia).

Statistical processing of the results was performed on a computer using programs Microsoft Excel 7.0, MedCalc Version 18.11. Calculate the arithmetic mean, the error of the arithmetic average, the significance of the differences in groups according to Student’s criterion, sensitivity, specificity of indicators, logistic regression equations, characteristic curves were built with the definition of the index of consistency of the model by the area under the curves (AUC), use methods Backward and Stepwise. The results were considered reliable at the significance level (P) < 0.05.

Results and discussion

Changes in the gastric microbiota and serum cytokine levels in the examined patients were described earlier [1-3].

Histological examination of gastrobiopsies signs of intestinal metaplasia was detected in 61 (29.90%) patients, colonic – in 40 (19.61%), were absent in healthy volunteers.

The diagnostic value of cytokine determination in gastric metaplasia is presented in Table 1. Prognostic value of cytokines in intestinal metaplasia of the gastric described in Table 2, in the colonic metaplasia of the gastric – in Table 3.

The greatest sensitivity in intestinal metaplasia was observed in IL-6 (10 pg/ml), IL-4 (2-2.5 pg/ml), EPO (> 8.8 mMe/ml), TNF α (> 6.2 pg/ml), IL-18 (> 315 pg/ml), VEGF (> 246-260 pg/ml),

IFN α (> 8 pg/ml). In colonic metaplasia, greater sensitivity was determined in IL-1ra (> 190 pg/ml), IL-8 (> 10 pg/ml), EPO (> 12,8 mMe/ml), IL-18 (> 395 pg/ml), MCP-1 (> 238 pg/ml), VEGF (> 350 pg/ml), IFN α (> 16 pg/ml), IL-1 β (> 8 pg/ml), IL-6 (> 6 pg/ml), IL-17 (> 8 pg/ml). Common signs were an increase in IL-6, EPO, IL-18, VEGF, IFN α , indirectly taking into account the functional activity of cytokines indicating microbial contamination of the gastric, tissue hypoxia with the activation of angiogenesis, confirming the staging of intestinal metaplasia in gastric carcinogenesis.

The greatest specificity in intestinal metaplasia was observed in IL-1 β (5 pg/ml), IL-1ra (126 pg/ml), IL-8 (7-10 pg/ml), IL-17 (> 14 pg/ml), IL-2 (> 15 pg/ml), IL-10 (13-14 pg/ml), in colonic metaplasia – in IL-18, IFN α , IL-4 (> 5 pg/ml), MCP-1, VEGF.

It should be noted that in case of intestinal metaplasia, the significant level of IFN γ (15-17 pg/ml) exceeded the upper limit of normal values, as well as the number of IFN α , TNF α , VEGF, IL-2, IL-17, in case of colonic metaplasia was > 17 pg/ml.

In intestinal metaplasia, the AUC interval was greater than 0.7 in IL-2, greater than 0.65 in VEGF, in colonic metaplasia greater than 0.91 in IL-18, VEGF, MCP-1, IFN α , and had a significance level of < 0.001.

The obtained prognostic models of intestinal metaplasia of the gastric, according to AUC, had very good (Table 2, formula 1) and excellent quality (Table 2, 3, formula 2-11), which was confirmed by a high percent of cases correctly classified of metaplasia.

Logistic regression equations for intestinal metaplasia were successfully tested to predict colonic metaplasia, with partial changes in the formulas taking into account the sensitivity and specificity of cytokines to improve the quality of prognostic models.

The diagnostic value of IL-8 (formulas 2-4, 6, 11) determines the contribution of neutrophilic granulocytes to the development of intestinal metaplasia of the gastric.

The combination of IL-2, IL-10 and IL-17 in formulas 3, 4, 5 indirectly indicates the simultaneous participation of different subpopulations of T-lymphocytes-helpers in the pathomorphosis of the gastric mucosa, which can be caused by dysbiosis gastroduodenal zone, determined in patients [1].

Determination of serum cytokines in intestinal metaplasia of the gastric epithelium is diagnostically and prognostically valuable, should be used for early diagnosis of precancerous conditions of the gastric both in isolation (IL-2, VEGF), and in a combination of indicators according to the calculated logistic regression equations.

TABLE 1. DIAGNOSTIC VALUE OF CYTOKINES IN INTESTINAL METAPLASIA OF THE GASTRIC

Variable	IL-1 β	IL-1ra	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-17	IL-18	IFN α	IFN γ	TNF α	MCP-1	GM-CSF	EPO	VEGF
intestinal metaplasia of gastric epithelium																
Sensitivity, %	24.6	29.5	72.1	96.7	100	41.0	54.1	1.6	86.9	80.3	50.8	90.2	11.5	77.0	91.8	83.6
Specificity, %	96.5	91.6	74.8	42.0	20.3	88.1	71.3	86.0	50.3	42.7	69.2	27.3	62.9	43.4	30.1	55.2
AUC*	0.593	0.602	0.737	0.612	0.563	0.562	0.630	0.510	0.615	0.537	0.591	0.539	0.506	0.555	0.553	0.652
95% CI**	0.523-0.661	0.532-0.670	0.671-0.796	0.541-0.679	0.492-0.632	0.491-0.631	0.560-0.697	0.439-0.581	0.545-0.683	0.466-0.607	0.520-0.659	0.468-0.609	0.436-0.577	0.484-0.625	0.482-0.622	0.582-0.717
P***	0.0408	0.0246	< 0.001	0.0033	0.1452	0.2186	0.0026	0.809	0.0023	0.3649	0.0285	0.3499	0.8729	0.1713	0.2027	< 0.001
colonic metaplasia of gastric epithelium																
Sensitivity, %	90	100	67.5	75.0	90.0	100	82.5	90	97.5	92.5	72.5	87.5	95.0	95.0	100	95.0
Specificity, %	53	55.5	73.8	84.1	69.5	34.1	40.9	68.9	84.1	81.7	71.3	75.6	81.7	70.7	76.8	79.9
AUC	0.770	0.812	0.636	0.814	0.857	0.607	0.549	0.852	0.962	0.915	0.798	0.891	0.920	0.869	0.879	0.924
95% CI	0.706-0.826	0.751-0.863	0.566-0.702	0.753-0.865	0.812-0.910	0.536-0.675	0.478-0.619	0.796-0.898	0.926-0.984	0.869-0.950	0.736-0.851	0.839-0.930	0.873-0.953	0.815-0.912	0.826-0.921	0.879-0.957
P	< 0.001	< 0.001	0.0101	< 0.001	< 0.001	0.0306	0.2802	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Note. * AUC, Area under the ROC Curve; ** CI, Confidence interval; *** P, Significance level.

TABLE 2. PROGNOSTIC VALUE OF CYTOKINES IN INTESTINAL METAPLASIA OF THE GASTRIC

Dependent	Logistic regression equation	Chi-squared	P	Se*	Sp**	Percent of cases correctly classified	AUC	95% CI
Intestinal metaplasia of gastric epithelium	$\text{logit}(p) = -2.957 + 0.210 \times \text{IL-2} + 0.009 \times \text{IL-18} + (-0.283 \times \text{IFN}\gamma) (1)$	65.624	< 0.0001	40.98%	90.91%	75.98%	0.823	0.763-0.873
	$\text{logit}(p) = -8.939 + 1.121 \times \text{GM-CSF} + (-2.237 \times \text{IL-6}) + 0.304 \times \text{IL-8} + (-0.401 \times \text{IL-17}) + 0.072 \times \text{IL-18} + (-0.467 \times \text{IFN}\gamma) (2)$	111.875	< 0.0001	68.85%	89.51%	83.33%	0.916	0.870-0.950
	$\text{logit}(p) = -30.532 + (-0.096 \times \text{IL-1ra}) + 1.117 \times \text{IL-2} + 1.510 \times \text{IL-8} + 2.004 \times \text{IL-10} + (-0.997 \times \text{IFN}\gamma) + 0.866 \times \text{TNF}\alpha (3)$	157.966	< 0.0001	75.41%	91.61%	86.76%	0.958	0.920-0.981
	$\text{logit}(p) = -42.424 + (-0.061 \times \text{MCP-1}) + (-0.144 \times \text{IL-1ra}) + 1.198 \times \text{IL-2} + 1.925 \times \text{IL-8} + 1.689 \times \text{IL-10} + (-0.884 \times \text{IL-17}) + 0.081 \times \text{IL-18} + (-0.950 \times \text{IFN}\gamma) + 1.112 \times \text{TNF}\alpha (4)$	179.155	< 0.0001	85.25%	95.10%	92.16%	0.977	0.946-0.993

Note. *Se, Sensitivity; **Sp, Specificity.

TABLE 3. PROGNOSTIC VALUE OF CYTOKINES IN COLONIC METAPLASIA OF THE GASTRIC

Dependent	Logistic regression equation	Chi-squared	P	Se	Sp	Percent of cases correctly classified	AUC	95% CI
Colonic metaplasia of gastric epithelium	$\text{logit}(p) = -17.624 + 0.167 \times \text{IL-2} + 0.289 \times \text{IL-10} + 0.253 \times \text{IL-17} + 0.696 \times \text{TNF}\alpha (5)$	104.382	< 0.0001	60.00%	96.34%	89.22%	0.942	0.901-0.970
	$\text{logit}(p) = -10.558 + 0.972 \times \text{GM-CSF} + (-0.202 \times \text{IL-8}) + 0.015 \times \text{VEGF} + 0.014 \times \text{IL-1ra} (6)$	107.082	< 0.0001	67.50%	96.34%	90.69%	0.954	0.916-0.979
	$\text{logit}(p) = -25.969 + 0.051 \times \text{IL-18} + 0.197 \times \text{IFN}\alpha (7)$	136.609	< 0.0001	77.50%	95.73%	92.16%	0.974	0.941-0.991
	$\text{logit}(p) = -18.184 + 0.038 \times \text{MCP-1} + (-2.555 \times \text{IL-1}\beta) + 1.832 \times \text{IL-6} + 0.405 \times \text{IL-17} + 0.309 \times \text{IFN}\alpha + 0.499 \times \text{IFN}\gamma (8)$	145.388	< 0.0001	90.00%	96.95%	95.59%	0.982	0.953-0.995
	$\text{logit}(p) = -34.099 + 0.209 \times \text{IL-2} + 0.062 \times \text{IL-18} + 0.197 \times \text{IFN}\alpha (9)$	147.588	< 0.0001	80.00%	97.56%	94.12%	0.983	0.954-0.996
	$\text{logit}(p) = -71.673 + 0.587 \times \text{IL-2} + 1.447 \times \text{IL-4} + 0.578 \times \text{IL-10} + 0.081 \times \text{IL-18} + 1.050 \times \text{TNF}\alpha (10)$	163.738	< 0.0001	87.50%	98.17%	96.08%	0.991	0.967-0.999
	$\text{logit}(p) = -63.861 + (-0.340 \times \text{IL-8}) + 0.122 \times \text{IL-18} + 0.974 \times \text{IFN}\gamma (11)$	163.710	< 0.0001	95.00%	98.78%	98.04%	0.993	0.969-0.999

Список литературы / References

1. Курусин В.М., Матвеева Л.В. Гендерные различия микробиоты желудка при заболеваниях гастродуоденальной зоны // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2016. № 2 (126). С. 25-29. [Kurusin V.M., Matveeva L.V. Gender features changes of microbiota gastric at diseases gastroduodenal zone. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2016, no. 2 (126), pp. 25-29. (In Russ.)]
2. Матвеева Л.В., Капкаева Р.Х., Чудайкин А.Н., Мишанина Л.С. Изменения моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 при *Helicobacter pylori*-ассоциированных гастродуоденальных заболеваниях // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 2. С. 150-156. [Matveeva L.V., Kapkaeva R.Kh., Chudaykin A.N., Mishanina L.S. Changes monocyte chemoattractants protein-1 in *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 2, pp. 150-156. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-150-156.
3. Матвеева Л.В., Мосина Л.М. Серологический уровень интерлейкина-18 при хроническом атрофическом гастрите, язвенной болезни и раке желудка // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2013. № 6. С. 21-24. [Matveeva L.V., Mosina L.M. Serum levels interleukin-18 with chronic atrophic gastritis, peptic ulcer diseases and gastric cancer. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2013, no. 6, pp. 21-24. (In Russ.)]
4. Нелюбин В.Н., Мудров В.П., Чеканов А.В., Сепиашвили Р.И. Цитокиновая регуляция иммунного ответа при бактериально-вирусной инфекции желудочно-кишечного тракта, обусловленной *Helicobacter pylori* и вирусами герпеса // Вестник РУДН, серия Медицина, 2011. № 2. С. 41-46. [Nelyubin V.N., Mudrov V.P., Chekanov A.V., Sepiashvili R.I. Cytokine regulation of immune response against bacterial and viral co-infection of gut, caused by *H. pylori* and *Herpesviridae*. *Vestnik RUDN, seriya Medicina = RUDN Journal of Medicine*, 2011, no. 2, pp. 41-46. (In Russ.)]
5. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 1. С. 7-18. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.

Автор:

Матвеева Л.В. — к.м.н., доцент, доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Author:

Matveeva L.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology, National Research Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Поступила 24.12.2018
Принята к печати 04.01.2019

Received 24.12.2018
Accepted 04.01.2019

ХЕМОКИНОВЫЕ МАРКЕРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАННИМ ОТТОРЖЕНИЕМ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА ПОЧКИ

**Федоренко Т.В.^{1,2}, Колесникова Н.В.¹, Пашкова И.А.²,
Порханов В.А.², Губарева Е.А.¹, Кувда Е.В.¹**

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Краснодар, Россия

² ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 имени профессора
С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Резюме. В настоящее время известно, что иммунологические биомаркеры могут стать более чувствительными методами неинвазивной диагностики отторжения трансплантата, чем используемые на сегодняшний день. Растущий объем исследований на моделях животных показывает, что хемокины, как активные участники иммунного процесса, могут быть использованы в этом качестве. Ранее в наших исследованиях была показана достоверная прогностическая значимость повышения IL-6, IL-2, IL-17a и IL-1ra в предоперационном периоде, как маркеров острого отторжения аллотрансплантата почки, а также среди исследуемых факторов роста периферической крови нами было сделано заключение, что резкое снижение содержания BDNF является диагностически значимым ранним признаком отторжения аллотрансплантата почки. Целью данного исследования является выявление прогностической роли сывороточного содержания хемокинов на предоперационном этапе с учетом выработки HLA-антител в период после трансплантации в риске развития отторжения аллотрансплантата почки. Проведен сравнительный анализ сывороточной концентрации хемокинов у пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) в терминальной стадии. Для этого у пациентов основных клинических групп за 6 часов до трансплантации оценивали содержание в крови Eotaxin (CCL11), GRO-α (CXCL1), IL-8 (CXCL8), IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP-1α (CCL3), MIP-1β (CCL4), SDF-1α (CXCL12), RANTES (CCL5), MIG (CXCL9) методом мультиплексного иммунологического анализа, с использованием соответствующих тест-систем. Исследованиями показаны достоверные изменения ряда хемокинов у пациентов с ХБП относительно возрастного контроля, однако основными диагностически значимыми биомаркерами, ассоциированными с ранним отторжением трансплантируемой почки, следует считать повышение концентрации CCL2 и CCL4 хемокинов, а также резкое снижение CCL11. Маркером благоприятного течения посттрансплантационного периода можно считать достоверное снижение в периферической крови концентрации CXCL12. Появление HLA-антител у реципиентов также ассоциировано с повышенным содержанием в сыворотке крови CXCL8, CXCL10, CCL4 и CCL5.

Ключевые слова: трансплантация почки, хемокины, отторжение аллотрансплантата, трансплантационный иммунитет, биомаркер

Адрес для переписки:

Федоренко Татьяна Владимировна
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
350901, Россия, г. Краснодар, ул. Восточно-
Кругликовская, 68-102.
Тел.: 8 (918) 387-79-09.
E-mail: fedorenko.tv@mail.ru

Address for correspondence:

Fedorenko Tatyana V.
Kuban State Medical University
350901, Russian Federation, Krasnodar, Vostochno-
Kruglikovskaya str., 68-102.
Phone: 7 (918) 387-79-09.
E-mail: fedorenko.tv@mail.ru

Образец цитирования:

Т.В. Федоренко, Н.В. Колесникова, И.А. Пашкова,
В.А. Порханов, Е.А. Губарева, Е.В. Кувда
«Хемокиновые маркеры, ассоциированные с ранним
отторжением аллотрансплантата почки»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4.
С. 749–754. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-749-754
© Федоренко Т.В. и соавт., 2019

For citation:

T.V. Fedorenko, N.V. Kolesnikova, I.A. Pashkova,
V.A. Porkhanov, E.A. Gubareva, E.V. Kuevda “Chemokine
markers associated with early rejection of kidney allograft”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 4, pp. 749–754.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-749-754
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-749-754

CHEMOKINE MARKERS ASSOCIATED WITH EARLY REJECTION OF KIDNEY ALLOGRAFT

Fedorenko T.V.^{a, b}, Kolesnikova N.V.^a, Pashkova I.A.^b, Porkhanov V.A.^b, Gubareva E.A.^a, Kuevda E.V.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b S. Ochapovsky Research Institute – Regional Clinic Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. It is known at the present time that immunological biomarkers may become more sensitive, non-invasive methods of graft rejection diagnosis than those currently used. A growing amount of studies in animal models shows that chemokines, as active participants in the immune process, may be used to this purpose. Our earlier studies have shown an important prognostic significance of IL-6, IL-2, IL-17a and IL-1ra increase in pre-operative period as markers of acute kidney allograft rejection. When assessing changes in studied peripheral blood growth factors, we concluded that a sharp decrease in BDNF content is a diagnostically significant early sign of kidney allograft rejection. The aim of this study was to identify the prognostic role of serum chemokine levels at the preoperative stage, taking into account the production of anti-HLA antibodies during the post-transplant period as a risk factor of kidney allograft rejection. A comparative analysis of chemokine serum concentrations was performed in the patients with terminal-stage chronic kidney disease (CKD). In the patients from main clinical groups, the blood cytokine levels were measured 6 hours before transplantation, i.e., Eotaxin (CCL11), GRO- α (CXCL1), IL-8 (CXCL8), IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), SDF-1 α (CXCL12), RANTES (CCL5), MIG (CXCL9) by means of multiplex immunological assays, using appropriate test systems. The studies have shown significant changes in several chemokines in the CKD patients compared to age-matched controls. However, the following diagnostically significant biomarkers associated with early rejection of transplanted kidney should be considered: increased concentration of CCL2 and CCL4 chemokines, as well as an acute decrease in CCL11. Significantly decreased CXCL12 concentration in peripheral blood could be considered a marker of favorable posttransplant clinical course. Occurrence of HLA antibodies in recipients is also associated with elevated serum levels of CXCL8, CXCL10, CCL4, and CCL5.

Keywords: kidney transplantation, chemokines, allograft rejection, transplantation immunity, biomarker

Введение

В настоящее время известно, что иммунологические биомаркеры могут стать более чувствительными методами неинвазивной диагностики отторжения трансплантата, чем используемые на сегодняшний день [1]. Недавние достижения в методах анализа биомолекул, таких как гены, мРНК и белки, помогли определить биомаркеры, которые можно использовать для мониторинга отторжения трансплантированного органа [11]. Растущий объем исследований на моделях животных показывает, что хемокины, как активные участники иммунного процесса, могут быть использованы в этом качестве [4, 9, 12]. Также было показано, что концентрация хемокинов уменьшается в ответ на терапию отторжения, и их оценка у пациентов может иметь прогностическую ценность для мониторинга в до- и посттрансплантационном периоде [10].

В проведенных нами ранее исследованиях была показана достоверная прогностическая значимость повышения IL-6, IL-2, IL-17a и IL-1ra в предоперационном периоде, как маркеров острого отторжения аллотрансплантата поч-

ки [3]. Наряду с интерлейкинами, среди исследуемых факторов роста периферической крови пациентов с ХБП нами было сделано заключение, что резкое снижение содержания BDNF является диагностически значимым ранним признаком отторжения аллотрансплантата почки [2].

Все вышеизложенное обосновывает целесообразность исследования прогностической роли сывороточного содержания хемокинов на предоперационном этапе с учетом выработки HLA-антител в период после трансплантации в риске развития отторжения аллотрансплантата почки.

Материалы и методы

Материалом исследования послужили образцы крови 58 пациентов (средний возраст $43,2 \pm 0,82$ лет; 67,24% мужчин и 32,76% женщин), которым в «НИИ-ККБ № 1 им. проф. С.В. Очаповского» (г. Краснодар) в период с января 2015 года по август 2016 г. была выполнена трансплантация донорской почки по поводу терминальной стадии ХБП (хроническая болезнь почек). У всех реципиентов предсуществующие HLA-антитела не были выявлены, что свидетельствовало об от-

сутствии иммунизации антигенами главного комплекса гистосовместимости ранее.

В зависимости от характера течения посттрансплантационного периода (180 дней) и факта обнаружения HLA-антител, пациенты были распределены на 3 клинические группы: 1 группа — 43 (74,1%) пациента без HLA-антител и с неосложненным течением послеоперационного периода (без острого отторжения); 2 группа — 7 (12,1%) пациентов с HLA-антителами, но без клинических проявлений отторжения; 3 группа — 8 (13,8%) пациентов с осложненным течением послеоперационного периода (с острым отторжением), среди которых только у 2-х пациентов (25%) были выявлены HLA-антитела в этот период. Контрольную группу (4 группа) составили 20 человек (здоровые доноры крови) обоего пола, с возрастным диапазоном от 18 до 50 лет.

За 6 часов до трансплантации почки в периферической крови у реципиентов всех групп выполнялось количественное определение сывороточной концентрации хемокинов — Eotaxin (CCL11), GRO- α (CXCL1), IL-8 (CXCL8), IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), SDF-1 α (CXCL12), RANTES (CCL5), MIG (CXCL9). Исследование выполняли методом мультиплексного анализа с использованием панели Simplex ProcartaPlex (eBioscience, США) и технологии xMAP (принцип проточной цитометрии). Идентификацию HLA-антител также осуществляли методом мультиплексного иммунологического анализа, с использованием соответствующих тест-систем (Gen-Probe, США), на проточном анализаторе Luminesx 200 по технологии xMap (бимолекулярные реакции на поверхности микросфер).

Статистическую обработку полученных данных выполняли с применением статистической программы GraphPad Prism 6.0 с оценкой непараметрического U-теста Манна—Уитни (Mann—Whitney U). Достоверными считались различия при $p \leq 0,05$ ($\leq 5\%$).

Результаты и обсуждение

При анализе медиан выборок концентрации содержания хемокинов семейства CXCL (англ. CXCL chemokine ligand) в сыворотке крови у пациентов с ХБП перед трансплантацией обращает на себя внимание достоверное повышение уровня хемокинов CXCL8 и CXCL10 (в 3,04 и 1,6 раза соответственно) в группе с неосложненным посттрансплантационным периодом, но с выявленными HLA-антителами (группа 2) по отношению к группе практически здоровых лиц, а также по отношению к другим группам (табл. 1). В то же время уровень CXCL1 был в 10,43 раза выше в той же группе (2 группа), в то время как в

остальных группах концентрация этого цитокина была ниже уровня обнаружения. Чрезмерное содержание этих цитокинов перед трансплантацией приводит к постоянному рекрутированию и активации гранулоцитарных лейкоцитов, а также движению CD4⁺ и CD8⁺T-лимфоцитов, макрофагов, натуральных клеток-киллеров и антигенпрезентирующих клеток к месту повреждения после трансплантации, где они будут вовлечены в посттрансплантационные иммунные процессы, что, в свою очередь, может повлиять на аллотрансплантационную биологию [5, 7, 12].

Проведенная оценка содержания CXCL12 в сыворотке крови пациентов с ХБП показала, что только в случае благоприятного течения посттрансплантационного периода имеет место его более низкий исходный уровень содержания в предоперационный период, чем у здоровых лиц и у пациентов с развившимся впоследствии острым отторжением почки. Это позволяет утверждать, что пониженная его концентрация является благоприятным фактором течения посттрансплантационного периода. С другой стороны, исходный повышенный уровень хемокинов семейства CXCL обеспечивает необходимые условия для гуморального иммунного ответа и выработки HLA-антител после трансплантации.

Сравнительный анализ данных семейства CC-хемокинов (англ. CC chemokine ligand) показал, что, несмотря на однонаправленное повышение CCL2 во всех клинических группах, достоверное его повышение (в 2,7 раза) наблюдается только в 3-й группе, то есть у пациентов с развившимся впоследствии острым отторжением аллотрансплантата (табл. 1). Хемокин CCL2 является мощным хемотаксическим фактором, который направляет инфильтрацию моноцитов и макрофагов в тканевые участки воспаления. В исследованиях на животных показано, что CCL2 играет важную роль в гуморальном отторжении трансплантата почки и сердца у мышей [4]. Что касается уровня содержания хемокинов, которые индуцируют хемотаксис клеток-эффекторов воспаления, то уровень CCL4 был достоверно выше во 2-й и 3-й группах (в 1,16 и 1,19 раза соответственно), а значительное повышение CCL5 (в 5,58 раза) наблюдалось только в группе с неосложненным посттрансплантационным периодом, но с выявленными HLA-антителами (группа 2). Оба этих белка способны индуцировать хемотаксис лейкоцитов и их адгезию к эндотелиальным клеткам, влияют на клеточный и гуморальный иммунный ответ, но основной их эффект — усиление антителогенеза.

Роль эотаксина CCL11 при трансплантации почки изучена недостаточно, хотя его значение отчасти продемонстрировано при транспланта-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ХЕМОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХПБ ПЕРЕД ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ ПОЧКИ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATION OF CHEMOKINES IN THE SERUM OF PATIENTS WITH CKD PRIOR TO KIDNEY TRANSPLANTATION, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Группа/ Интерлейкины Group/ Interleukin	Группа 1 Отсутствие острого отторжения трансплантируемой почки и HLA- антител Group 1 Lack of acute rejection of the transplanted kidney and HLA- antibodies n = 43	Группа 2 Отсутствие острого отторжения трансплантируемой почки, HLA- антитела выявлены Group 2 Lack of acute rejection of the transplanted kidney, HLA-antibodies were revealed n = 7	Группа 3 Острое отторжение трансплантируемой почки, HLA- антитела выявлены только у 25% Group 3 Acute rejection of the transplanted kidney, HLA antibodies were detected only in 25% n = 8	Группа 4 Контроль (здоровые доноры) Group 4 Control (healthy donors) n = 20
GRO-α (CXCL1), пкг\мл pkg\ml	0 (0-0)	10,43 (2,52-45,37) p > 0,05	0 (0-0)	0 (0-0)
IL-8 (CXCL8), пкг\мл pkg\ml	0 (0-0)	3,04 (1,52-6,57) p = 0,008***^	0 (0-0)	0 (0-0)
MIG (CXCL9), пкг\мл pkg\ml	94,61 (69,11-111,91) p > 0,05	92,72 (71,88-151,30) p > 0,05	84,23 (67,08-264,00) p > 0,05	63,85 (19,08-105,81)
IP-10 (CXCL10), пкг\мл pkg\ml	128,21 (120,74-154,46) p > 0,05	209,20 (179,53-276,69) p = 0,015*^	141,84 (135,79-249,23) p > 0,05	132,39 (80,68-166,14)
SDF-1α (CXCL12), пкг\мл pkg\ml	1219,04 (1169,63-1316,75) p = 0,03*^	1522,44 (1495,42-1626,92) p = 0,03*	1640,97 (1511,70-2612,19) p > 0,05	1915,65 (1741,34-2738,00)
MCP-1 (CCL2), пкг\мл pkg\ml	160,31 (143,73-184,71) p > 0,05	229,24 (215,56-263,57) p > 0,05	282,39 (253,21-320,34) p = 0,007**	101,03 (72,43-243,71)
MIP-1α (CCL3), пкг\мл pkg\ml	10,46 (9,51-10,78) p > 0,05	15,01 (13,54-17,82) p > 0,05	12,38 (11,69-41,50) p > 0,05	17,04 (9,85-21,23)
MIP-1β (CCL4), пкг\мл pkg\ml	762,60 (725,71-795,44) p > 0,05	854,80 (839,57-941,91) p = 0,002**	877,34 (847,38-909,68) p = 0,002**	734,25 (718,34-779,88)
RANTES (CCL5), пкг\мл pkg\ml	674,94 (536,66-882,88) p > 0,05	806,30 (760,91-1084,98) p = 0,007**	521,85 (410,51-585,37) p > 0,05	144,32 (134,76-535,18)
Eotaxin (CCL11), пкг\мл pkg\ml	152,68 (148,57-157,49) p > 0,05	175,44 (163,09-189,05) p > 0,05	94,16 (88,84-113,63) p = 0,0002***^	290,16 (168,55-331,20)

Примечание. *, **, *** – достоверность отличий от контроля; ^ – достоверность межгрупповых различий.

Note. *, **, ***, reliability of differences from control; ^, reliability of intergroup differences.

ции и патологии легких. Так, например, в работе Dosanjh A. установлено усиление экспрессии рецептора эозинофилов CCR3 (CC chemokine receptor 3) к эотаксину и повышение концентрации CCL11 (в 2,5 раза) при хроническом отторжении легкого [8]. Наряду с этим, исследованиями Asosingh K. и соавт. показано, что эотаксины (в том числе и CCL11) представляют собой семейство цитокинов, способствующих аномальной неоваскуляризации в воспаленных дыхательных путях [6]. В этой связи интерес представляют полученные в настоящем исследовании данные о довольно низком уровне CCL11 в группе пациентов с развившимся впоследствии острым отторжением аллотрансплантата почки (группа 3) по сравнению с нормой, а также таковым показателем у пациентов 1-й и 2-й клинической группы. Это дает основание считать пониженный уровень хемокина CCL11 в сыворотке крови до трансплантации неблагоприятным критерием выживания трансплантата почки.

Заключение

Анализ полученных данных в целом позволяет заключить, что характер изменения ряда хемоки-

нов в периферической крови пациентов с ХБП, регистрируемый до трансплантации, может быть ассоциирован с острым отторжением аллотрансплантата или с благоприятным течением посттрансплантационного периода. В частности, исходно повышенная концентрация CCL2 и CCL4, а также резкое снижение сывороточного CCL11 накануне трансплантации свидетельствует о высокой вероятности развития острого отторжения, тогда как маркером благоприятного течения посттрансплантационного периода можно считать достоверное снижение в периферической крови концентрации CXCL12. Важно отметить, что появление HLA-антител у реципиентов также ассоциировано с повышенным содержанием в сыворотке крови CXCL8, CXCL10, CCL4 и CCL5.

Таким образом, оценка сывороточной концентрации хемокинов (CCL2, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL8, CXCL10) у пациентов с ХБП до трансплантации аллогенной почки является необходимым и диагностически значимым компонентом программы предтрансплантационного лабораторного обследования.

Список литературы / References

1. Алексеев А.В., Гильманов А.Ж., Гатиятулина Р.С., Ракипов И.Г. Современные биомаркеры острого повреждения почек // Практическая медицина, 2014. №. 3 (79). [Alekseev A.V., Gilmanov A.Zh., Gatiyatullina R.S., Rakipov I.G. Recent biomarkers of acute renal injury. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2014, no. 3 (79). (In Russ.)]
2. Федоренко Т.В., Колесникова Н.В., Филиппов Е.Ф. Ранние интерлейкиновые маркеры риска острого отторжения при трансплантации почки // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, №. 3. С. 541-543. [Fedorenko T.V., Kolesnikova N.V., Filippov E.F. Early interleukin markers of acute risk of renal transplantation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 3, pp. 541-543. (In Russ.)]
3. Федоренко Т.В., Колесникова Н.В., Филиппов Е.Ф. Факторы роста – предикторы острого отторжения трансплантата почки // Молекулярная медицина, 2018. С. 376-377. [Fedorenko T.V., Kolesnikova N.V., Filippov E.F. Growth factors – predictors of acute kidney transplant rejection. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2018, pp. 376-377. (In Russ.)]
4. Abe T., Su C.A., Iida S., Baldwin Lii W.M., Nonomura N., Takahara S., Fairchild R.L. Graft-derived CCL2 increases graft injury during antibody-mediated rejection of cardiac allografts. *Am. J. Transplant.*, 2014, Vol. 14, no. 8, pp. 1753-1764.
5. Amrouche L., Desbuissons G., Rabant M., Sauvaget V., Nguyen C., Benon A., Barre P., Rabaté C., Lebreton X., Gallazzini M., Legendre C., Terzi F., Anglicheau D. MicroRNA-146a in human and experimental ischemic AKI: CXCL8-dependent mechanism of action. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2017, Vol. 28, no. 2, pp. 479-493.
6. Asosingh K., Vasanji A., Tipton A., Queisser K., Wanner N., Janocha A., Grandon D., Anand-Apte B., Rothenberg M.E., Dweik R., Erzurum S.C. Eotaxin-rich proangiogenic hematopoietic progenitor cells and CCR3⁺ endothelium in the atopic asthmatic response. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 5, pp. 2377-2387.
7. Burke S.J., Lu D., Sparer T.E., Masi T., Goff M. R., Karlstad M.D., Collier J.J. NF-κB and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2013, Vol. 306, no. 2, pp. E131-E149.
8. Dosanjh A. Activation of eosinophil CCR3 signaling and eotaxin using a bioinformatics analysis of a mouse model of obliterative airway disease. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2014, Vol. 34, no. 7, pp. 543-546.
9. Lee C.M., Peng H.H., Yang P., Liou J.T., Liao C.C., Day Y.J. CC Chemokine Ligand-5 is critical for facilitating macrophage infiltration in the early phase of liver ischemia/reperfusion. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, p. 3698.
10. Liu B., Li J., Yan L.N. Chemokines in chronic liver allograft dysfunction pathogenesis and potential therapeutic targets. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, 325318, 15 p. doi: 10.1155/2013/325318.

11. Sigdel T.K., Sarwal M.M. Recent advances in biomarker discovery in solid organ transplant by proteomics. *Expert Rev. Proteomics*, 2011, Vol. 8, no. 6, pp. 705-715.
12. Zhuang J., Shan Z., Ma T., Li C., Qiu S., Zhou X., Lin L., Qi Z. CXCL9 and CXCL10 accelerate acute transplant rejection mediated by alloreactive memory T cells in a mouse retransplantation model. *Exp. Ther. Med.*, 2014, Vol. 8, no. 1, pp. 237-242.

Авторы:

Федоренко Т.В. — аспирант ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; биолог лаборатории разработки и изучения новых методов лечения ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Колесникова Н.В. — д.б.н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Пащикова И.А. — д.м.н., руководитель ККЦИОД ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Порханов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, главный врач ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Губарева Е.А. — к.м.н., заведующая лабораторией фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Кувейда Е.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Fedorenko T.V., PhD Student, Kuban State Medical University; Biologist, Laboratory of Development and Studying New Methods of Treatment, S. Ochapovsky Research Institute — Regional Clinic Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation

Kolesnikova N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Pashkova I.A., PhD, MD (Medicine), Head, Krasnodar Regional Transplantology Center, S. Ochapovsky Research Institute — Regional Clinic Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation

Porkhanov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Chief Physician, S. Ochapovsky Research Institute — Regional Clinic Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation

Gubareva E.A., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Fundamental Research in Regenerative Medicine, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Kuevda E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Fundamental Research in Regenerative Medicine, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 29.10.2018
Отправлена на доработку 08.11.2018
Принята к печати 12.11.2018

Received 29.10.2018
Revision received 08.11.2018
Accepted 12.11.2018

УРОВНИ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ α У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ

Прилуцкая И.А., Крюк Ю.Я.

ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», г. Донецк, Донецкая Народная Республика

Резюме. Ишемический инсульт является наиболее частой формой инсульта и связан с изменением функции различных клеток крови, клеток костного мозга, высвобождения ими различных цитокинов, хемокинов и др. Существуют противоречивые данные об уровнях TNF α в сыворотке и плазме крови при остром ишемическом инсульте.

Мы обследовали 21 пациента с диагнозом «ишемический инсульт», проходившего лечение в условиях стационара. Тяжесть ишемического инсульта оценивалась врачами невропатологами в соответствии с критериями шкалы Национального института здоровья при поступлении и при выписке. У пациентов с ишемическим инсультом выявлено достоверное ($p < 0,001$) повышение концентрации TNF α в сыворотке в сравнении со здоровыми лицами. Наиболее высокие значения концентрации указанного маркера регистрировались в 1-й и 3-й дни заболевания, достоверно снижаясь к 14-му дню, но не достигая при этом уровня контрольной группы. Следует указать, что у пациентов с ишемическим инсультом имело место достоверное ($p < 0,001$) увеличение удельного веса лиц с концентрациями исследуемого цитокина выше 10 пг/мл в сыворотке ($76,2 \pm 9,3\%$ в 1-й день заболевания).

С целью статистической характеристики различий индивидуальной динамики пациентов была проведена процедура оптимального разделения обследованных на подгруппы в зависимости от уровня TNF α в 1-й день госпитализации с помощью использования дискриминантного анализа с расчетом классификационной матрицы.

Проведение корреляционного анализа показало многочисленные достоверные сильные положительные корреляционные связи между уровнями TNF α в 1-й и 3-й дни после госпитализации, а также между аналогичными показателями в 1-й и 14-й дни. Корреляционная связь концентрации TNF α ($\tau = 0,711$; $p < 0,01$) была обнаружена также между 3-м и 14-м днем. Также положительные корреляционные связи в различные периоды наблюдения, в основном значимые и сильные, установлены между абсолютными уровнями данного цитокина и разницей изменения его концентрации (дельта). Необходимо указать, что уровень TNF α в первый и третий день госпитализации положительно коррелировал (соответственно $\tau = 0,503$, $p < 0,01$; $\tau = 0,411$, $p < 0,01$) с объемом очага ишемии, выявленным с помощью нейровизуализационных методов исследования. Положительно коррелировал объем очага ишемии и с разницей концентрации TNF α в 1-3 и 1-14 дни (соответственно $\tau = 0,425$, $p < 0,01$; $\tau = 0,507$, $p < 0,01$).

Результаты наших исследований свидетельствуют о необходимости учета уровня TNF α при поступлении для планирования терапевтических мероприятий и интенсификации лечения в данных группах пациентов, особенно если на 3-й день терапии зарегистрировано повышение или недостаточное снижение TNF α .

Ключевые слова: фактор некроза опухолей α , ишемический инсульт, цитокин, тромбоз

Адрес для переписки:

Прилуцкая Ирина Александровна
ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького»
192288, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Димитрова, 37, корп. 1, кв. 9.
Тел.: 8 (981) 747-80-57.
E-mail: priral1986@gmail.com

Address for correspondence:

Prilutskaya Irina A.
Donetsk National M. Gorky Medical University
192288, Russian Federation, St. Petersburg,
Dimitrov str., 37, bldg 1, apt 9.
Phone: 7 (981) 747-80-57.
E-mail: priral1986@gmail.com

Образец цитирования:

И.А. Прилуцкая, Ю.Я. Крюк «Уровни фактора некроза опухолей α у больных ишемическим инсультом» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 755-764. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-755-764
© Прилуцкая И.А., Крюк Ю.Я., 2019

For citation:

I.A. Prilutskaya, Yu. Ya. Kryuk "Levels of tumor necrosis factor alpha in patients with ischemic stroke", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 755-764. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-755-764
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-755-764

LEVELS OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE

Prilutskaya I.A., Kryuk Yu.Ya.

Donetsk National M. Gorky Medical University, Donetsk, Donetsk People's Republic

Abstract. Ischemic stroke is the most common form of brain stroke. It is associated with functional changes of various blood and bone marrow cell populations, altered release of various cytokines, chemokines, etc. There are conflicting data about serum and plasma TNF α levels in acute ischemic stroke.

We have examined 21 patients with a diagnosis of ischemic stroke treated at the hospital. The severity of ischemic stroke was evaluated by neurologists, in accordance with NIHSS criteria at admission and at discharge.

In the patients with ischemic stroke, we have found a significantly increased serum concentration of tumor necrosis factor- α ($p < 0.001$), as compared with healthy individuals. The highest concentrations of this marker were recorded on days 1 and 3 of the disease, being significant at $p < 0.001$ and $p = 0.003$, respectively, then decreasing by day 14, however, not reaching the levels of control group. It should be noted that, among patients with ischemic stroke, there is a significantly ($p < 0.001$) increased proportion of individuals with high serum concentrations (> 10 pg/ml) of this cytokine, i.e., $76.2 \pm 9.3\%$ on day 1 of the disease.

To statistically evaluate the individual differences of the patients' dynamics, they were divided into subgroups, depending on the level of TNF α on the 1st day of hospitalization, using a discriminant analysis with estimation of a classification matrix. The correlation analysis showed numerous strongly positive correlations between TNF α levels on the 1st and 3rd days, as well as between similar indexes on the 1st and 14th days. A correlation between TNF α concentrations on the 3rd and 14th day was also found ($r = 0.711$; $p < 0.01$). Also, positive correlation in various periods of observation was established between the absolute levels of cytokine and differences in their concentration changes. The level of tumor necrosis factor-alpha on the first and third day of hospitalization did positively correlate (respectively, $r = 0.503$, $p < 0.01$; $r = 0.411$, $p < 0.01$) with the volume of the ischemic lesion according neuroimaging methods research. The volume of the ischemic focus was positively correlated with the difference in the concentration of TNF α on days 1-3 and 1-14 (respectively, $r = 0.425$, $p < 0.01$; $r = 0.507$, $p < 0.01$).

The results of our study show a necessity for measuring TNF α levels at admission, in order to plan treatment in these groups of patients, especially in cases of increase or insufficient decrease in TNF α recorded on the 3rd day of therapy.

Keywords: tumor necrosis factor α , ischemic stroke, cytokine, thrombosis

Ведущие позиции в структуре заболеваемости, инвалидизации и смертности взрослого населения большинства стран занимают острые цереброваскулярные заболевания, в частности ишемические инсульты (ИИ), что позволяет считать их проблемой чрезвычайной медицинской и социальной значимости [7, 23, 33]. По прогнозам, к 2030 году каждый год от инсульта будет умирать более 200 миллионов человек [7]. При этом ишемический инсульт является наиболее частой формой инсульта и составляет до 85% случаев от общего количества зарегистрированных его случаев [33]. В настоящее время считается, что одна из наиболее распространенных причин ИИ — это тромбоз. Главными участниками запуска артериального тромбоза и поддержки атерогенеза являются тромбоциты. С другой стороны, дальнейшему повреждению и воспалению при данной патологии способствуют лейкоциты. Во время ишемии головного мозга имеет место увеличение трансэндотелиальной миграции лейкоцитов с последующим высвобождением провоспалительных цитокинов и хемокинов.

На данный момент одними из наиболее изученных маркеров воспаления у пациентов с ишемическими инсультами являются С-реактивный белок, интерлейкин-1 и интерлейкин-6 [1, 5, 11, 31]. Исследования фактора некроза опухолей α (TNF α) у больных ИИ немногочисленны и неоднозначны. Существуют работы, указывающие на нейротоксическое действие высоких уровней провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α , IL-1 β , что усугубляет ишемическое повреждение нервной ткани, вызывая апоптоз нервных клеток, увеличение токсичных форм монооксида азота и торможение нейрогенеза [8, 12, 38]. При этом ряд авторов указывает на нейропротективный эффект TNF α , направленный на защиту нейронов головного мозга от ишемического и эксайтотоксического повреждения [17, 30, 40].

Увеличение уровней TNF α , IL-1 и IL-6 при остром ишемическом инсульте было отмечено как в крови, так и в спинномозговой жидкости [27], а также непосредственно в головном мозге [16, 35]. Было показано, что ишемический инсульт связан с изменением функции различ-

ных клеток крови, в том числе тромбоцитов, а также клеток костного мозга, высвобождения ими различных, в том числе провоспалительных цитокинов, хемокинов и др. [13, 37]. Полученные данные обусловили пристальный интерес к изучению данных маркеров инсульта с целью улучшения диагностики, прогноза и терапии у пациентов, перенесших его [22, 37]. Данный интерес был усилен данными, показывающими, что TNF α , IL-1 и IL-6 могут модулировать развитие поражений при экспериментальном инсульте [18, 22].

Было показано, что анализ цитокинов в периферической крови может отражать их центральную продукцию. Вместе с тем существуют противоречивые данные об уровнях TNF α в сыворотке и плазме крови при остром ишемическом инсульте. Некоторые исследования показали, что уровни TNF α остаются неизменными после инсульта, в то время как другие сообщают о повышенных уровнях цитокина, хотя и с разными пиковыми периодами [10, 25, 41].

Противоречивы и результаты в отношении корреляции между периферическими уровнями TNF α и тяжестью инсульта, его прогнозом и др. [20, 30, 34, 39, 42]. Корреляция изменения вышеуказанного цитокина между 1-м, 3-м и 14 днем, как между собой, так и с объемом поражения головного мозга и показателями шкалы Национального института здоровья (NIHSS), как в момент госпитализации, так и при выписке, также противоречива.

Исходя из этого, определение уровней TNF α в различные сроки после начала ИИ и корреляции как исходной концентрации его, так и кон-

центраций данного цитокина при последующих исследованиях (в 3, 14 день) в динамике терапии, с тяжестью ишемического инсульта как в начале лечения, так и в момент выписки, имеет важное научное и практическое значение и требует дальнейшего изучения.

Таким образом, целью исследования являлась оценка уровня TNF α и динамики его изменений в сыворотке крови пациентов с ишемическим инсультом в на фоне терапии и наличия корреляционных связей уровня данного цитокина в течение 2 недель в различные сроки обследования, а также с объемом поражения головного мозга, тяжестью течения заболевания, оцененной с помощью шкалы NIHSS.

Материалы и методы

Обследован 21 пациент с диагнозом «ишемический инсульт», проходивший лечение в условиях стационара. Тяжесть ишемического инсульта оценивалась врачами-невропатологами в соответствии с критериями шкалы Национального института здоровья как при поступлении, так и при выписке. Дельта показателей шкалы NIHSS, выраженная в баллах, определялась арифметическим вычитанием значения шкалы NIHSS при выписке из значения при поступлении. Для расчета дельты показателей шкалы NIHSS в % полученную дельту в баллах делили на значение шкалы NIHSS при поступлении и умножали на 100%.

Всем пациентам было выполнено визуализирующее исследование головного мозга (КТ или МРТ). Вычислялись как максимальный диаметр, так и объем зоны ишемии. Все пациенты получали лечение по основным направлениям:

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ α

TABLE 1. CHARACTERISTIC OF ELISA TEST-SYSTEM FOR TNF α DETERMINATION

Параметры Parameters	Характеристика Characteristics
Принцип метода Method	Твердофазный, ИФА ELISA
Общее время анализа Time of analysis	4 часа 4 hours
Диапазон измерений Range of measuring	0-500 пг/мл 0-500 pg/ml
Оптическая плотность диапазона Optical density	0,04-2,50
Чувствительность Sensitivity	2,0 пг/мл 2.0 pg/ml
Коэффициент вариации Coefficient of variation	$\leq 5\%$
Объем сыворотки для исследования в дублях Serum volume for double investigation	200 мкл 200 μ l

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ СРЕДНИХ УРОВНЕЙ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ α В СЫВОРОТКЕ БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ, пг/мл

TABLE 2. LEVELS OF SERUM TNF α IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE ON 1ST, 3RD AND 14TH DAYS, pg/ml

	Контрольная группа Control group (n = 50)	Пациенты с ишемическим инсультом Patients with ischemic stroke (n = 21)		
		1-й день 1 st day	3-й день 3 rd day	14-й день 14 th day
Me $\pm$ ошибка Me $\pm$ error	2,9 $\pm$ 0,8	17,3 $\pm$ 2,4*, **	16,2 $\pm$ 2,2*, ***	9,2 $\pm$ 1,0*
95% CI	0,6-4,9	10,5-23,5	9,7-19,4	7,1-12,1

Примечание. * – $p < 0,01$ в сравнении с контрольной группой; ** – $p < 0,001$ в сравнении со значением на 14-й день; *** – $p = 0,003$ в сравнении со значением на 14-й день.

Note. *, $p < 0,01$ vs control group; **, $p < 0,001$ vs 14th day data; ***, $p = 0,003$ vs 14th day data.

поддержание проходимости дыхательных путей и сатурации, поддержание уровня системной перфузии (артериального давления), нейропротекторы, антиагреганты/антикоагулянты, антигипоксанта, ангиопротекторы. Никто из пациентов не получал тромболитическую терапию, механическую тромбэкстракцию или эндоваскулярное лечение. Определение уровня TNF α в сыворотке крови проводилось трижды – в 1, 3 и 14 день заболевания на фоне терапии. В качестве контрольной группы обследованы 50 здоровых доноров.

Определение содержания TNF α проводилось с помощью разработанных ООО «Укрмед-Дон» и сотрудниками кафедры клинической иммунологии, аллергологии и эндокринологии ДонНМУ им. М. Горького (г. Донецк) иммуноферментных тест-систем для определения указанного цитокина. Основные характеристики использованной тест-системы приведены в таблице 1. Данная тест-система имеет высокую чувствительность (2,0 пг/мл), отличается достаточной стабильностью (годна в течение 12 месяцев), низким коэффициентом вариации (не более 5%), комплектуется готовыми к использованию стандартами и конъюгатом [6]. Она была зарегистрирована в Украине для использования как в научных исследованиях, так и в практическом здравоохранении. Тест-система является вариантом твердофазного иммуноферментного анализа. Для увеличения чувствительности ее использовали во время инкубации сыворотки и контрольных образцов (2 часа), после отмывки и конъюгата (1,5 часа), максимальный объем реагентов (200 мкл) при 37,2 °C и встряхивании планшеты с частотой 250 встряхиваний в минуту.

Дельта уровня TNF α (Δ TNF α) между 1-м и 3-м днем, выраженная в пг/мл, определялась арифметическим вычитанием значения уровня цитокина в 3-й день из значения уровня в 1-й день. Для расчета дельты уровня TNF α в %, полу-

ченную дельту в пг/мл делили на значение уровня маркера в 1-й день и умножали на 100%. Для расчета дельты уровня TNF α между 1-м и 14-м днем, а также 3-м и 14-м днем использовали концентрации фактора в соответствующие дни наблюдения и приведенную выше методику.

Проводимая при помощи программы MedStat статистическая обработка полученного материала включала анализ распределения. Оптимальное разделение обследованных в зависимости от уровня TNF α в 1-й день госпитализации проводили с помощью дискриминантного анализа методом расчета классификационной матрицы. В связи с непараметрическим характером распределения данных рассчитывались медиана, ошибка медианы, 95% доверительный интервал, использовались непараметрические критерии сравнения (критерий Данна при сравнении с контрольной группой, Т-критерий Вилкоксона при сравнении центральных тенденций связанных выборок, W-критерий Вилкоксона при сравнении центральных тенденций независимых выборок, угловое преобразование Фишера с учетом поправки Йейтса при сравнении долей). Для определения силы связи между признаками рассчитывался коэффициент корреляции Кендалла. Количественную интерпретацию коэффициентов Кендалла оценивали исходя из шкалы Чеддока [4].

Результаты и обсуждение

Анализ результатов исследования показал, что у обследованных пациентов с ишемическим инсультом имело место достоверное повышение средних уровней фактора некроза опухоли- α в первые 2 недели заболевания в сравнении с контролем (табл. 2). При этом, если средние значения уровней исследуемого цитокина в 1 и 3 день госпитализации существенно не отличались между собой ($p = 0,257$), то на 14 день наблюдалось достоверное снижение концентрации TNF α

в сыворотке обследуемых ($p < 0,001$ в сравнении с предыдущими исследованиями). Вместе с тем через 14 дней уровни фактора некроза опухоли- α не достигали показателей здоровых лиц.

Кроме того, для обследованных с ишемическим инсультом было характерно увеличение удельного веса лиц с более высокими концентрациями TNF α в сыворотке. Так, $76,2 \pm 9,3\%$ пациентов с ИИ в 1-й день и $71,4 \pm 9,9\%$ в 3-й день заболевания характеризовались уровнем исследуемого цитокина выше 10 пг/мл. Частота регистрации указанных значений TNF α на 14-й день составила $38,1 \pm 10,6\%$ ($p = 0,031$ и $p = 0,066$ в сравнении с показателями в 1-й и 3-й дни соответственно). Следует отметить, что в контрольной группе у всех обследованных значения TNF α не превышали 10 пг/мл.

Индивидуальная динамика показателей TNF α в сыворотке крови на 1-й, 3-й и 14-й дни ишемического инсульта представлена на рисунке 1. Необходимо указать на большую гетерогенность как исходных уровней фактора некроза опухоли-альфа, так и динамики его у наших обследованных пациентов. Следует отметить, что большинство из них имели высокие уровни фактора некроза опухоли-альфа, близкие или превышающие 20 пг/мл. Необходимо указать, что 8 из обследованных ($38,1\% \pm 10,6\%$) показали увеличение уровня TNF α на 3-й день по сравнению с показателями на 1-е сутки, но затем снижение на 14-й день ниже первоначального уровня. При этом 2 из них имели показатели фактора некроза опухоли-альфа в пределах до 10 пг/мл. Следует указать, что всего у 5 лиц из 21 обследованного пациента были зарегистрированы низкие показатели (от 5,9 до 9,4 пг/мл) TNF α при поступлении. При этом у одного из них было зарегистрировано небольшое (на 3,3%) повышение уровня фактора некроза опухоли-альфа в сыворотке на 14-й день по сравнению с 1-м днем при его снижении на 3-и сутки от начала заболевания (соответственно, 5,9; 5,3 и 6,1 пг/мл).

С целью статистической характеристики различий индивидуальной динамики пациентов было проведена процедура оптимального разделения обследованных на подгруппы в зависимости от уровня TNF α в 1-й день госпитализации с помощью использования дискриминантного анализа с расчетом классификационной матрицы. В качестве группирующей переменной использовались различные диапазоны содержания TNF α , в качестве независимых переменных — уровни фактора на 3-й и 14-й дни госпитализации, дельты уровней его на 1-й и 3-й, 1-й и 14-й и 3-й и 14-й дни в пг/мл и в %, показатели шкалы NIHSS при поступлении и выписке, а также их дельты в баллах и в %, значения максимального

линейного размера и объема ишемического очага. Максимальный коэффициент результативности (от 76 до 84%) имел место при распределении обследованных по концентрации TNF α в 1-й день на 3 группы: ниже 10 пг/мл, от 10 до 20 пг/мл и выше 20 пг/мл.

Проведенный далее анализ уровня фактора некроза опухоли-альфа в 3-х выделенных дискриминантным анализом вышеуказанных группах лиц показал, что содержание TNF α в 3 и 14 день после госпитализации на фоне проводимого лечения имело достоверную разницу ($p < 0,01$ – $p < 0,001$) в зависимости от исходной концентрации его в день поступления (табл. 3). Уровень его был существенно выше у лиц, имеющих концентрацию данного цитокина в сыворотке крови при поступлении 10–20 пг/мл и > 20 пг/мл. При этом данные различия (в сравнении с группой пациентов с TNF $\alpha < 10$ пг/мл) были зарегистрированы в этих группах, несмотря на существенно большее снижение уровня данного цитокина (Δ TNF α , в том числе и в %) в период с 1-го или с 3-го дня по 14 день (от $p < 0,05$ до $p < 0,001$). Достоверные отличия интенсивности снижения фактора некроза опухоли-альфа установлены на 3 и 14 день терапии между группами лиц, имевших в начале лечения концентрацию TNF α в сыворотке крови в пределах 10–20 пг/мл и > 20 пг/мл в сравнении с пациентами с концентрацией его < 10 пг/мл. При этом обнаружено, что изменения индексов шкалы NIHSS в динамике проведенного лечения существенно отличались ($p < 0,001$) между группами пациентов, имеющих уровни фактора некроза опухоли-альфа в первый день поступления < 10 пг/мл и > 20 пг/мл.

Проведение корреляционного анализа (табл. 4) показало многочисленные достоверные сильные положительные корреляционные связи между уровнями TNF α в 1-й и 3-й дни после госпитализации, а также между аналогичными показателями в 1-й и 14-й дни. Корреляционная связь концентрации фактора некроза опухоли-альфа ($\tau = 0,711$; $p < 0,01$) была обнаружена также между 3-м и 14-м днем. Также положительные корреляционные связи в различные периоды наблюдения, в основном значимые и сильные, установлены между абсолютными уровнями данного цитокина и разницей изменения его концентрации (дельта). Следует отметить, что различия TNF α , выраженные в процентах от исходного уровня в 1–14 и 3–14 дни, положительно коррелировали, соответственно, с концентрацией его в день поступления и с уровнем данного цитокина в 3, 14 день лечения. Необходимо указать, что уровень фактора некроза опухоли-альфа в первый и третий день госпитализации положительно коррелировал (соответственно, $\tau = 0,503$,

ТАБЛИЦА 3. УРОВНИ $TNF\alpha$ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ NIHSS В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ЕГО В 1 ДЕНЬ ($Me \pm m$)

TABLE 3. LEVELS OF $TNF\alpha$ AND NIHSS VALUES, DEPENDING ON THE CONCENTRATION OF HIM IN 1ST DAY ($Me \pm m$)

TNF α в 1 день, пг/мл TNF α on the 1 st day, pg/ml	Анализируемые показатели Analyzed indicators						
	TNF α , пг/мл TNF α , pg/ml		Δ TNF α , пг/мл Δ TNF α , pg/ml		Δ TNF α , %	Δ по шкале NIHSS Δ on the NIHSS scale	
	3 день 3 rd day	14 день 14 th day	1-14 день 1 st -14 th day	3-14 день 3 rd -14 th day	1-14 день 1 st -14 th day	баллов points	%
< 10 (n = 5)	7,90 $\pm$ 0,97	6,10 $\pm$ 0,94	0,60 $\pm$ 0,95	0,90 $\pm$ 1,09	8,06 $\pm$ 11,23	2,00 $\pm$ 1,80	33,30 $\pm$ 9,43
10-20 (n = 9)	15,80 $\pm$ 1,45 *(1)	8,40 $\pm$ 0,89 *(1)	7,60 $\pm$ 0,86 **(1)	6,80 $\pm$ 1,04 *** (1)	47,62 $\pm$ 3,70 *** (1)	1,00 $\pm$ 0,91	10,00 $\pm$ 10,09
> 20 (n = 7)	23,50 $\pm$ 3,51 *(1, 2)	13,40 $\pm$ 1,11 *(1),**(2)	11,50 $\pm$ 2,98 *(1),*** (2)	9,10 $\pm$ 3,11 *(1)	48,73 $\pm$ 5,79 *** (1)	0 $\pm$ 1,25 ** (1)	0 $\pm$ 11,88 ** (1)

Примечание. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$; *** – $p < 0,05$. Группы сравнения: (1) – < 10 пг/мл; (2) – 10-20 пг/мл.

Note. *, $p < 0,01$; **, $p < 0,001$; ***, $p < 0,05$. Comparison groups: (1) – < 10 pg/ml; (2) – 10-20 pg/ml.

$p < 0,01$; $\tau = 0,411$, $p < 0,01$) с объемом очага ишемии, выявленным с помощью нейровизуализационных методов исследования. Положительно коррелировал объем очага ишемии и с разницей концентрации $TNF\alpha$ в 1-3 и 1-14 дни (соответственно, $\tau = 0,425$, $p < 0,01$; $\tau = 0,507$, $p < 0,01$). Немаловажным является также факт обнаруженной обратной связи изменения за 14 дней неврологических нарушений, выявленных по шкале NIHSS (как абсолютных, так и относительных их значений) с изменениями, регистрируемыми в концентрации фактора некроза опухоли-альфа с 1 по 3 день лечения (соответственно, $\tau = 0,324$, $p < 0,03$; $\tau = 0,363$, $p < 0,02$). При этом индексы NIHSS при поступлении и при выписке ($17 \pm 1,71$ дней) имели сильную положительную корреляционную связь ($\tau = 0,779$, $p < 0,01$), причем степень изменения NIHSS в процессе лечения имела достоверную корреляционную связь с показателями ее при поступлении ($\tau = 0,411$, $p < 0,01$).

Таким образом, нами в динамике обследования пациентов, страдающих ишемическим инсультом выявлено повышение уровня фактора некроза опухоли-альфа при поступлении и достоверные корреляционные зависимости изменения его уровня в динамике терапии в течение 14 дней наблюдения за пациентами. Несмотря на противоречивость данных литературы, не каждый из источников которой свидетельствует о достоверном изменении концентрации $TNF\alpha$ [29, 41], наши данные свидетельствуют о существенном увеличении уровня данного цитокина в сыворотке крови в среднем у наблюдаемых нами лиц. Правда, при этом довольно существенный процент лиц имел показатели $TNF\alpha$ (около 20-24%) в пределах < 10 пг/мл. Полученные в нашей работе результаты согласуются с результатами ряда авторов [19, 32, 42], показавших повышение

среднего уровня его в сыворотке периферической крови. Следует отметить, что наши данные показывают у ряда больных возрастание концентрации фактора некроза опухоли-альфа на 3 день лечения, несмотря на то, что отдельные источники указывают на пик его синтеза в первые 24 часа после развития ишемии [9, 42] или в другое более позднее время. Вместе с тем мы считаем, что этот результат не является фактом, существенно противоречащим нашим результатам так как в настоящее время установлена фазность и длительность продукции данного цитокина различными клетками в очаге ишемии [35]. Кроме того, следует указать, что данный факт увеличения фактора некроза опухоли-альфа на 3-й день может свидетельствовать, по нашему мнению, о неблагоприятном развитии заболевания. Ведь эта динамика была зарегистрирована среди большинства лиц, имеющих изначально одни из наиболее высоких показателей $TNF\alpha$. В контексте к этому в работе показаны корреляционные связи фактора некроза опухоли-альфа с выявляемым нейровизуализационными методами объемом поражения головного мозга. Наши данные согласуются с результатами исследований, получивших аналогичные результаты [15, 22, 24, 29, 39]. Следует отметить, что мы не получили существенных корреляционных связей между уровнями $TNF\alpha$ и индексами шкалы NIHSS. Имеются работы, показывающие, что уровень фактора некроза опухоли-альфа может не иметь зависимости со степенью тяжести неврологических нарушений, выявляемых с помощью данной шкалы, исходом ишемического шока [14, 19]. Вместе с тем примененный нами впервые в мире подход при данной патологии (в доступной нам литературе такого типа анализа динамики уровня $TNF\alpha$ и шкалы NIHSS не найдено), анализа разницы

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИЯ УРОВНЕЙ TNF α , ДЕЛЬТЫ ПО ШКАЛЕ NIHSS И ОБЪЕМА ОЧАГА ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

TABLE 4. CORRELATION OF TNF α LEVELS, DELTAS ON THE NIHSS SCALE AND VOLUME OF THE LESION OF ISCHEMIC STROKE

Показатель Indicator		Уровень TNF α , пг/мл TNF α level, pg/ml			Δ уровня TNF α , пг/мл Δ TNF α level, pg/ml			Δ по шкале NIHSS Δ on the NIHSS scale		Объем очага Focal volume
		1 1 st	3 3 rd	14 14 th	1-3 1 st -3 rd	1-14 1 st -14 th	3-14 3 rd -14 th	баллов points	%	
Уровень TNF α , пг/мл TNF α level, pg/ml	1 1 st	–	0,782	0,75	–	0,766	0,558	–	–	0,503
	3 3 rd	< 0,01	–	0,711	–	0,593	0,74	–	–	0,411
	14 14 th	< 0,01	< 0,01	–	–	0,504	0,45	–	–	–
Δ уровня TNF α , пг/мл Δ TNF α level, pg/ml	1-3 1 st -3 rd	–	–	–	–	0,382	–	-0,324	-0,363	0,425
	1-14 1 st -14 th	< 0,001	< 0,01	< 0,01	0,01	–	0,504	–	–	0,507
	3-14 3 rd -14 th	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–	< 0,01	–	–	–	–
Δ по шкале NIHSS Δ on the NIHSS scale	баллов points	–	–	–	0,03	–	–		0,767	–
	%	–	–	–	0,02	–	–	< 0,01		–
Объем очага Focal volume		< 0,01	< 0,01	–	< 0,01	< 0,01	–	–	–	–

Примечание. В верхней половине таблицы представлены коэффициенты корреляции Кендалла, в нижней половине – степень их достоверности.

Note. Kendall correlation coefficients are presented in the upper half of the table, and the confidence degree in the lower half.

изменений данных показателей, в том числе и в процентах от исходных, показал обратные достоверные коррелятивные связи между Δ TNF α и Δ NIHSS. Важность данного подхода при анализе материала показывают также выявленные различия в отобранных с помощью дискриминационного анализа группах Δ уровня TNF α в 1-14 день наблюдения и Δ по шкале NIHSS (в том числе и в процентах от исходных значений). Следует отметить важный факт существенных различий изменения уровня фактора некроза опухоль-альфа в группах с различной его исходной (при поступлении) концентрацией и достоверных отличий в этих группах (обратной динамики) шкалы NIHSS. Это согласуется с фактами наличия в основном сильных корреляционных связей концентрации TNF α в различные дни наблюдения и лечения и корреляции Δ TNF α в динамике. Кроме того, данные ряда авторов подтверждают наши данные и свидетельствуют о более высо-

ких его уровнях при клиническом ухудшении течения ишемического инсульта и корреляции TNF α с исходом заболевания [15, 29, 39]. Показано, что концентрация его >14 пг/мл ассоциируется с плохим исходом болезни [39]. Результаты наших исследований и ряд вышеприведенных данных свидетельствуют о необходимости учета уровня данного показателя при поступлении для планирования терапевтических мероприятий и интенсификации лечения в данных группах пациентов, особенно если на 3-й день терапии зарегистрировано повышение или недостаточное снижение TNF α .

Заключение

Полученные в работе данные указывают на важность исследования фактора некроза опухоль-альфа – цитокина, который вместе с интерлейкином 1 стимулирует продукцию интерлей-

кина 6 [36]. Несомненно, концентрация TNF α в периферической крови может повышаться и отражать динамику его синтеза в очагах ишемии. Провоспалительные цитокины, в основном IL-6 и TNF α , стимулируют продукцию матриксных металлопротеиназ (ММР), особенно ММР-9, которые вызывают разрушение гематоэнцефалического барьера и опосредуют миграцию лейкоцитов [26, 28]. Конечно же, следует учитывать тот факт, что изменения уровня TNF α могут являться не только результатом синтеза его в очагах ишемии. Очень возможно, что это вносит существенный вклад в разноречивость данных литературы и обуславливает поиск новых диагностических маркеров ишемического инсульта и что ряд авторов считает роль биомаркеров и данного цитокина в работах, посвященных данной патологии для определения тяжести течения ишемического инсульта и решения других вопросов не определенной окончательно [21, 28]. Известно, что TNF α может синтезироваться и секретироваться многими клетками, в том числе и вне данных очагов поражения [29]. Несомненно, что данный факт в комплексе с другими вносит свой вклад в гетерогенность результатов, полученных нами как в плане исходных уровней фактора некроза опухоли-альфа, так и при выявленных нами различий динамики его изменений. Вместе с тем, исходя из полученных данных и проведенного

анализа литературы, мы считаем, что его значения могут и отражают, хотя бы частично, уровень и характер реактивности пациентов, их реакцию при ишемическом инсульте. Наши данные показывают перспективность исследования TNF α , особенно его изменений, в определении тяжести течения и прогнозе течения ишемического инсульта. Очень важно, что по исходным показателям данного цитокина и его изменению в течение даже первых 3-х дней мы можем корректировать терапию. В принципе, полученные нами данные согласуются с работами ряда авторов, выявивших сходные закономерности синтеза провоспалительных цитокинов у пациентов с ишемическим инсультом, что указывает на возможность использования оценки цитокинового профиля, в том числе и TNF α , для определения эффективности терапии, ее коррекции, прогнозирования течения заболевания и др. [2, 3, 28, 29]. Конечно же, в различия получаемых данных различными группами авторов вносят вклад и генетические особенности пациентов, различия этиологических факторов ишемического инсульта, наличие сопутствующей патологии и многое другое. Наши исследования свидетельствуют о важности и необходимости дальнейшего изучения данного вопроса, в том числе с использованием современных, многогранных математических подходов.

Список литературы / References

1. Баранова Е.В. Маркер воспаления у больных с различными типами мозговых инсультов // Международный неврологический журнал, 2014. Т. 67, № 5. С. 45-48. [Baranova E.V. Marker of inflammation in patients with different types of cerebral strokes. *Mezhdunarodnyy neurologicheskiy zhurnal = International Neurological Journal*, 2014, Vol. 67, no. 5, pp. 45-48. (In Russ.)]
2. Бояджян А.С., Аракелова Э.А., Айвазян В.А. Интерлейкины и хемокины при остром ишемическом инсульте, осложненном и не осложненном диабетом // Цитокины и воспаление, 2008. № 1. С. 40-43. [Boyajyan A.S., Arakelova E.A., Ayvazyan V.A., Manukyan L.A. Interleukins and chemokines in acute ischemic stroke complicated and non-complicated with diabetes. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2008, Vol. 7, no. 1, pp. 40-43. (In Russ.)]
3. Ефремов В.В. Нарушение цитокинового статуса при ишемии головного мозга и его коррекция флогензимом // Вестник ВолгМУ, 2006. Т. 18, № 2. С. 58-61. [Efremov V.V. Cytokine status disturbances in acute brain ischemia and its correction with phlogenzyme. *Vestnik VolgMU = Journal of Volgograd State Medical University*, 2006, Vol. 18, no. 2, pp. 58-61. (In Russ.)]
4. Любушин Н.П., Лещева В.Б., Дьякова В.Г. Анализ финансово-экономической деятельности предприятия: Учеб. пособие для вузов. М.: ЮНИТИ-ДАНА, 2002. 471 с. [Lyubushin N.P., Leshcheva V.B., Dyakova V.G. Analysis of financial and economic activity of the enterprise: Textbook, a manual for universities]. Moscow: Uniti-Dana, 2002. 471 p.
5. Ованесян И.Г., Ованесян Р.А. Связь показателей агрегации тромбоцитов и концентрации интерлейкинов-1 β и -4 в остром периоде ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски, 2016. Т. 116, № 12. С. 7-9. [Ovanesyan I.G., Ovanesyan R.A. Relationship between platelet aggregation and interleukins IL-1 β and IL-4 in the acute stage of ischemic stroke. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2016, Vol. 116, no. 12, pp. 7-9. (In Russ.)]
6. Прилуцкий А.С., Деев В.А., Лесниченко Д.А., Коваленко В.В. Исследование уровней С-реактивного белка и фактора некроза опухолей при гнойно-септических процессах абдоминальной полости // Питання експериментальної та клінічної медицини, 2012. Вип. 16, Т. 2. С. 403-408. [Prilutsky A.S., Deev V.A., Lesnichenko D.A., Kovalenko V.V. Study of C-reactive protein and tumor necrosis factor α at purulent septic

processes abdominal cavity. *Pytannya eksperymentalnoyi ta klinichnoyi medytsyny = Issues of Experimental and Clinical Medicine*, 2012, Vol. 16, no. 2, pp. 403-408. (In Russ.)]

7. Титов Б.В., Матвеева Н.А., Мартынов М.Ю., Фаворова О.О. Ишемический инсульт как комплексное полигенное заболевание // Молекулярная биология, 2015. Т. 49, № 2. С. 224-248. [Titov B.V., Matveeva N.A., Martynov M.Yu., Favorova O.O. Ischemic stroke as a complex polygenic disease. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2015, Vol. 49, no. 2, pp. 195-216. (In Russ.)]

8. Barreto G., White R.E., Ouyang Y., Xu L., Giffard R.G. Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, 2011, Vol. 11, no. 2, pp. 164-173.

9. Beridze M., Sanikidze T., Shakarishvili R., Intskirveli N., Bornstein N.M. Selected acute phase CSF factors in ischemic stroke: Findings and prognostic value. *BMC Neurol.*, 2011, no. 11, p. 41.

10. Bokhari F.A., Shakoori T.A., Butt A., Ghafoor F. TNF-alpha: a risk factor for ischemic stroke. *J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad.*, 2014, Vol. 26, no. 2, pp. 111-114.

11. Dadu R.T., Fornage M., Virani S.S., Nambi V., Hoogeveen R.C., Boerwinkle E., Alonso A., Gottesman R.F., Mosley T.H., Ballantyne C.M. Cardiovascular biomarkers and subclinical brain disease in the atherosclerosis risk in communities study. *Stroke*, 2013, Vol. 44, pp. 1803-1808.

12. del Zoppo G.J., Milner R., Mabuchi T., Hung S., Wang X., Berg G.I., Koziol J.A. Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2007, Vol. 38, Suppl. 1, pp. 646-651.

13. Denes A., McColl B.W., Leow-Dyke S.F., Chapman K.Z., Humphreys N.E., Grancis R.K., Allan S.M., Rothwell N.J. Experimental stroke-induced changes in the bone marrow reveal complex regulation of leukocyte responses. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2011, Vol. 31, pp. 1036-1050.

14. Dieplinger B., Bocksrucker C., Egger M., Eggers C., Haltmayer M., Mueller T. Prognostic value of inflammatory and cardiovascular biomarkers for prediction of 90-day all-cause mortality after acute ischemic stroke-results from the linz stroke unit study. *Clin Chem.*, 2017, Vol. 63, no. 6, pp. 1101-1109.

15. Domac F.M., Somay G., Misirli H., Erenoglu N.Y. Tumor necrosis factor alpha serum levels and inflammatory response in acute ischemic stroke. *Neurosciences (Riyadh)*, 2007, Vol. 12, no. 1, pp. 25-30.

16. Dziewulska D., Mossakowski M.J. Cellular expression of tumor necrosis factor α and its receptors in human ischemic stroke. *Clin. Neuropathol.*, 2003, Vol. 22, pp. 35-40.

17. Echeverry R., Wu F., Haile W.B., Wu J., Yepes M. The cytokine tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 have a neuroprotective effect in the central nervous system. *J. Neuroinflammation*, 2012, Vol. 9, pp. 45-52.

18. Emsley H.C., Smith C.J., Gavin C.M., Georgiou R.F., Vail A., Barberan E.M., Hallenbeck J.M., del Zoppo G.J., Rothwell N.J., Tyrrell P.J., Hopkins S.J. An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 2003, Vol. 139, pp. 93-101.

19. Intiso D., Zarrelli M.M., Lagioia G., Di Rienzo F., Checchia De Ambrosio C., Simone P., Tonali P., Cioffi Daggar R.P. Tumor necrosis factor alpha serum levels and inflammatory response in acute ischemic stroke patients. *Neurol. Sci.*, 2004, Vol. 24, no. 6, pp. 390-396.

20. Intiso D., Stampatore P., Zarrelli M.M., Guerra G.L., Arpaia G., Simone P., Tonali P., Beghi E. Incidence of first-ever ischemic and hemorrhagic stroke in a well-defined community of southern Italy, 1993-1995. *Eur. J. Neurol.*, 2003, Vol. 10, no. 5, pp. 559-565.

21. Jane J., Lo R., Graham C.A. BET 2: Blood biomarkers as an alternative to imaging in diagnosing acute ischaemic stroke. *Emerg. Med. J.*, 2018, Vol. 35, no. 5, pp. 336-338.

22. Jickling G.C., Sharp F.R. Blood biomarkers of ischemic stroke. *Neurotherapeutics*, 2011, Vol. 8, pp. 349-360.

23. Krishnamurthi R.V., Feigin V.L., Forouzanfar M.H., Mensah G.A., Connor M., Bennett D.A., Moran A.E., Sacco R.L., Anderson L.M., Truelsen T., O'Donnell M., Venketasubramanian N., Barker-Collo S., Lawes C.M., Wang W., Shinohara Y., Witt E., Ezzati M., Naghavi M., Murray C., Global Burden of Diseases IRFS, Group GBDSE. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Glob. Health*, 2013, no. 1, pp. 259-281.

24. Lambertsen K.L., Biber K., Finsen B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2012, Vol. 32, no. 9, pp. 1677-1698.

25. Liu Y.Z., Wang C., Wang Q., Lin Y.Z., Ge Y.S., Li D.M., Mao G.S. Role of fractalkine/CX3CR1 signaling pathway in the recovery of neurological function after early ischemic stroke in a rat model. *Life Sci.*, 2017, Vol. 184, pp. 87-94.

26. Lu G., He Q., Shen Y., Cao F. Potential biomarkers for predicting hemorrhagic transformation of ischemic stroke. *Int. J. Neurosci.*, 2018, Vol. 128, no. 1, pp. 79-89.

27. Maas M.B., Furie K.L. Molecular biomarkers in stroke diagnosis and prognosis. *Biomark Med.*, 2009, Vol. 3, pp. 363-383.

28. Maestrini I., Ducroquet A., Moulin S., Leys D., Cordonnier C., Bordet R. Blood biomarkers in the early stage of cerebral ischemia. *Rev. Neurol. (Paris)*, 2016, Vol. 172, no. 3, pp. 198-219.

29. Martínez-Sánchez P., Gutiérrez-Fernández M., Fuentes B., Masjuán J., Cases M.A., Novillo-López M.E., Díez-Tejedor E. Biochemical and inflammatory biomarkers in ischemic stroke: translational study between humans and two experimental rat models. *J. Transl. Med.*, 2014, no. 12, p. 220.

30. Mattson M.P. NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem. Res.*, 2005, Vol. 30, pp. 883-893.

31. Mazaheri S., Reisi E., Poorolajal J., Ghiasian M. C-Reactive protein levels and clinical outcomes in stroke patients: a prospective cohort study. *Arch. Iran Med.*, 2018, Vol. 21, no. 1, pp. 8-12.
32. Monbailliu T., Goossens J., Hachimi-Idrissi S. Blood protein biomarkers as diagnostic tool for ischemic stroke: a systematic review. *Biomark Med.*, 2017, Vol. 11, no. 6, pp. 503-512.
33. Musuka T.D., Wilton S.B., Traboulsi M., Hill M.D. Diagnosis and management of acute ischemic stroke: speed is critical. *CMAJ*, 2015, Vol. 187, pp. 887-893.
34. Ormstad H., Aass H.C.D., Lund-Sørensen N., Amthor K., Sandvik L. Serum levels of cytokines and C-reactive protein in acute ischemic stroke patients, and their relationship to stroke lateralization, type, and infarct volume. *J. Neurol.*, 2011, Vol. 258, no. 4, pp. 677-685.
35. Sairanen T., Carpen O., Karjalainen-Lindsberg M.L., Paetau A., Turpeinen U., Kaste M., Lindsberg P.J. Evolution of cerebral tumor necrosis factor- α production during human ischemic stroke. *Stroke*, 2001, Vol. 32, pp. 1750-1758.
36. Shalaby M.R., Waage A., Aarden L., Espevik T. Endotoxin, tumor necrosis factor- α and interleukin 1 induce interleukin 6 production *in vivo*. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1989, Vol. 53, no. 3, pp. 488-498.
37. Sharp F.R., Jickling G.C., Stamova B., Tian Y., Zhan X., Liu D., Kuczynski B., Cox C.D., Ander B.P. Molecular markers and mechanisms of stroke: RNA studies of blood in animals and humans. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2011, Vol. 31, pp. 1513-1531.
38. Sieber M.W., Claus R.A., Witte O.W., Frahm C. Attenuated inflammatory response in aged mice brains following stroke. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 10, pp. 5-11.
39. Sotgiu S., Zanda B., Marchetti B., Fois M.L., Arru G., Pes G.M., Salaris F.S., Arru A., Pirisi A., Rosati G. Inflammatory biomarkers in blood of patients with acute brain ischemia. *Eur. J. Neurol.*, 2006, Vol. 13, no. 5, pp. 505-513.
40. Sriram K., O'Callaghan J.P. Divergent roles for tumor necrosis factor- α in the brain. *JNIP*, 2007, Vol. 2, no. 2, pp. 140-153.
41. Wytrykowska A., Prosba-Mackiewicz M., Nyka W.M. IL-1 β , TNF- α , and IL-6 levels in gingival fluid and serum of patients with ischemic stroke. *J. Oral Sci.*, 2016, Vol. 58, no. 4, pp. 509-513.
42. Zaremba J., Losy J. Early TNF- α levels correlate with ischaemic stroke severity. *Acta Neurol. Scand.*, 2001, Vol. 104, no. 5, pp. 288-295.

Авторы:

Прилуцкая И.А. — аспирант кафедры патологической физиологии ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», г. Донецк, Донецкая Народная Республика
Крюк Ю.Я. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», г. Донецк, Донецкая Народная Республика

Authors:

Prilutskaya I.A., Graduate Student, Department of Pathological Physiology, Donetsk National M. Gorky Medical University, Donetsk, Donetsk People's Republic
Kryuk Yu.Ya., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology, Donetsk National M. Gorky Medical University, Donetsk, Donetsk People's Republic

Поступила 16.11.2018
Отправлена на доработку 19.11.2018
Принята к печати 03.05.2019

Received 16.11.2018
Revision received 19.11.2018
Accepted 03.05.2019

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЕ

Саакян С.В., Балацкая Н.В., Катаргина Л.А., Куликова И.Г.,
Мякошина Е.Б.

ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Увеальная меланома — злокачественная опухоль нейроэктодермального происхождения. Несмотря на первичное лечение с применением энуклеации глаза или лучевой терапии, почти у 50% пациентов развивается метастатическая болезнь. Эффективность различных методов лечения злокачественных новообразований, прогноз заболевания в значительной степени зависят от состояния иммунной системы пациента. Данные о соотношении лимфоцитов разных популяций, их взаимосвязи со стадиями увеальной меланомы в настоящее время отсутствуют. Обследовано 84 пациента с увеальной меланомой (44 женщины и 40 мужчин; средний возраст $53,7 \pm 12,2$ года). В 1 группу (малые опухоли) вошли 36 больных, во 2-ю (опухоли среднего размера) — 26 пациентов, 22 пациента составили 3 группу (большие опухоли). В группу контроля вошли 33 практически здоровых донора. Материалом исследования служили пробы цельной крови, взятой из локтевой вены натощак в утренние часы при помощи вакуумных систем в пробирки Vacuette® с антикоагулянтом K3EDTA. Иммунофенотипирование проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием системы моноклональных антител Multitest 6-Color TBNK Reagent в пробирках BD TruCount (Becton Dickinson, США), цитометре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов производили с помощью лизирующего раствора BD FACS TM Lysing Solution (Becton Dickinson, США). Относительное и абсолютное содержание популяций и субпопуляций лимфоцитов определяли в программе Canto (Becton Dickinson, США), с выделением анализируемого региона по общей популяции, экспрессирующей CD45⁺ антиген, и по гранулярности клеток (CD45⁺PerCP-Cy5,5*/SSC); использовались меченные флуорохромами антитела к CD3⁺ (FITC), CD4⁺ (PE-Cy7*), CD8⁺ (APC-Cy7*), CD16⁺/CD56⁺ (PE), CD19⁺ (APC*), позволяющие дифференцировать: Т-лимфоциты (CD3⁺), Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺CD8⁻), Т-цитотоксические (CD3⁺CD4⁻CD8⁺), Т-дубль позитивные (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), NK-клетки (CD16⁺CD56⁺), В-лимфоциты (CD19⁺), вычислить соотношение субпопуляций CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ — индекс, отражающий баланс Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток (CD4⁺/CD8⁺). Проведенный нами индивидуальный анализ состава лимфоцитов позволяет заключить, что рост увеальной меланомы сопровождается системными разнонаправленными сдвигами в качественном и количественном составе иммунокомпетентных клеток, затрагивая как врожденное (NK-клетки), так и адаптивное (Т-лимфоциты) звенья противоопухолевой иммунной защиты. Полученные результаты представляются важными для разработки персонализированных подходов к прогнозу и лечению пациентов с увеальной меланомой. Динамика изменения количественного состава субпопуляций лимфоцитов при онкологических заболеваниях может представлять ценность для мониторинга иммунотерапевтических воздействий и дополнить клиническую оценку течения основного заболевания.

Ключевые слова: субпопуляция лимфоцитов периферической крови, увеальная меланома

Адрес для переписки:

Мякошина Елена Борисовна
ФГБУ «Московский научно-исследовательский
институт глазных болезней имени Гельмгольца»
Министерства здравоохранения РФ
105062, Россия, Москва,
ул. Садовая-Черногрозская, 14/19.
Тел.: 8 (916) 196-90-30.
E-mail: myakoshina@mail.ru

Address for correspondence:

Myakoshina Elena B.
Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases
105162, Russian Federation, Moscow,
Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19.
Phone: 7 (916) 196-90-30.
E-mail: myakoshina@mail.ru

Образец цитирования:

С.В. Саакян, Н.В. Балацкая, Л.А. Катаргина,
И.Г. Куликова, Е.Б. Мякошина «Субпопуляционный
состав лимфоцитов периферической крови при
увеальной меланоме» // Медицинская иммунология,
2019. Т. 21, № 4. С. 765–772.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-765-772
© Саакян С.В. и соавт., 2019

For citation:

S.V. Saakyan, N.V. Balatskaya, L.A. Katargina,
I.G. Kulikova, E.B. Myakoshina "Subpopulation profile
of peripheral blood lymphocytes in uveal melanoma", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019,
Vol. 21, no. 4, pp. 765–772.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-765-772
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-765-772

SUBPOPULATION PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN UVEAL MELANOMA

Saakyan S.V., Balatskaya N.V., Katargina L.A., Kulikova I.G.,
Myakoshina E.B.

Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Abstract. Uveal melanoma is a malignant neuroectodermal tumor. Despite an existing radical primary treatment, i.e., eye enucleation or radiation therapy, metastatic disease develops in almost 50% of the patients. Meanwhile, the efficiency of various approaches to malignancy treatment, the prognosis of the disease largely depends on immune system parameters in the patient. Distinct data on the ratio of different lymphocyte subpopulations and their relationship with the stages of uveal melanoma are currently not available. Eighty-four patients with uveal melanoma were examined including 44 women and 40 men at a mean age of 53.7 ± 12.2 years. Group 1 (small tumors) consisted of 36 patients, and the 2nd group (medium-sized tumors) included 26 cases; 22 patients comprised the 3rd group (large tumors). The control group included 33 practically healthy donors. Blood samples for this study were taken from the ulnar vein in the morning time, using vacuum tubes Vacuette® with K3EDTA. Immune phenotyping was performed by means of flow laser cytofluorimetry with a monoclonal antibody system (Multitest 6-Color TBNK Reagent) in BD TruCount test tubes (Becton Dickinson, USA). The cell populations were discriminated by the BD FACSCanto II cytometer (Becton Dickinson, USA). Erythrocyte lysis and leukocyte fixation were performed using a BD FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, USA). The relative and absolute levels of lymphocyte populations and subpopulations were determined by the Canto program (Becton Dickinson, USA), with selection of the analyzed region in the general population expressing CD45⁺ antigen and cell granularity (CD45⁺ PerCP-Cy5,5*/SSC); fluorochromes labeled antibodies to CD3⁺ (FITC), CD4⁺ (PE-Cy7*), CD8⁺ (APC-CY7*), CD16⁺/CD56⁺ (PE), CD19⁺ (APC*) were used to differentiate: T lymphocytes (CD3⁺), T helper cells (CD3⁺CD4⁺CD8⁻), T cytotoxic (CD3⁺CD4⁻CD8⁺), T-double positive (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), NK cells (CD16⁺CD56⁺), B lymphocytes (CD19⁺). We have calculated the ratio of CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ subpopulations, an index reflecting the balance of T-helper cells and cytotoxic T-cells (CD4⁺/CD8⁺). Our individual analysis of the lymphocyte subpopulation profiles allowed us to conclude that the growth of uveal melanoma is accompanied by systemic multidirectional changes in the qualitative and quantitative composition of immunocompetent cells. This imbalance affects both innate (NK cells) and adaptive (T lymphocytes) links of antitumor immune defense. The results are important for the development of personalized approaches to prognosis and treatment of patients with uveal melanoma. The dynamics of changed quantitative composition of lymphocyte subpopulations in oncological diseases may be of value for monitoring immunotherapeutic effects and improves clinical assessment of the underlying disease course.

Keywords: uveal melanoma, peripheral blood, lymphocyte subpopulations

Введение

Уvealная меланома (УМ) — злокачественная опухоль нейроэктодермального происхождения, заболеваемость которой в Российской Федерации достигает 6–8 случаев на 1 млн взрослого трудоспособного населения [3].

На долю УМ приходится от 3 до 5% меланом всех локализаций [14, 15]. Около 90% опухолей локализуется в хориоиде, 6% — в цилиарном теле, 4% — в радужке [14]. Несмотря на первичное лечение с применением энуклеации глаза или лучевой терапии, почти у 50% пациентов развивается метастатическая болезнь [3, 15]. Витальный

прогноз с момента диагностики метастатического заболевания является низким, при этом общая выживаемость составляет от 6 до 13 месяцев [8].

Эффективность различных методов лечения злокачественных новообразований, прогноз заболевания в значительной степени зависят от состояния иммунной системы пациента [6, 7]. Развивающаяся опухоль активно защищается от иммунной атаки, используя разнообразные механизмы системной иммуносупрессии, приводящие к истощению пула и понижению активности основных эффекторных клеток — компонентов адаптивного иммунитета и врожденной системы противоопухолевого надзора [5, 6].

Нарушения в иммунной системе, в частности субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови, а также дисбаланс в системе иммуномедиаторов были выявлены у больных с различными новообразованиями, в том числе при меланоме кожи [10].

Так, при прогрессировании этой опухоли отмечается увеличение количества регуляторных Т-клеток (Treg), в том числе и с фенотипом $CD3^+CD8^+$ (регуляторных цитотоксических), снижение показателей пролиферативной и цитотоксической активности $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов, также уменьшение количества и подавление функций натуральных киллеров (NK-клеток) [12].

Исследования иммунологического статуса с выделением основных субпопуляций лимфоцитов и медиаторов проводили также у пациентов с УМ, однако в литературе они представлены в немногочисленных публикациях и достаточно противоречивы.

Данные о соотношении лимфоцитов разных популяций, их взаимосвязи со стадиями УМ в настоящее время отсутствуют.

Цель — исследовать состав основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови больных УМ в зависимости от размера опухоли.

Материалы и методы

Обследовано 84 пациента с УМ (44 женщины и 40 мужчин; средний возраст $53,7 \pm 12,2$ года). Всем больным проведены офтальмологические исследования с включением ультразвуковых.

В соответствии с классификацией, разработанной в 1983 г. J. Shields [14], пациентов распределили на 3 группы.

В 1 группу (малые опухоли — проминенция до 3 мм, диаметр до 10 мм) вошли 36 больных, во 2-ю (опухоли среднего размера — проминенция 3–5 мм, диаметр 10–15 мм) — 26 пациентов, 22 пациента составили 3 группу (большие опухоли — проминенция > 5 мм, диаметр > 15 мм) (рис. 1А, Б, В, см. 3-ю стр. обложки).

В группу контроля вошли 33 практически здоровых донора, сопоставимых по возрасту и полу с пациентами основных групп без признаков офтальмопатологии.

Материалом исследования служили пробы цельной крови, взятой из локтевой вены натощак в утренние часы (9.00–10.00 ч) при помощи вакуумных систем в пробирки Vacuette® с антикоагулянтом К3EDTA. Иммунофенотипирование проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием систе-

мы моноклональных антител Multitest 6-Color TBNK Reagent в пробирках BD TruCount (Becton Dickinson, США), цитометре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

Лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов производили с помощью лизирующего раствора BD FACS TM Lysing Solution (Becton Dickinson, США). Относительное и абсолютное содержание популяций и субпопуляций лимфоцитов определяли в программе Canto (Becton Dickinson, США), с выделением анализируемого региона по общей популяции, экспрессирующей $CD45^+$ антиген и по гранулярности клеток ($CD45^+PerCP-Cy5,5^*/SSC$); использовались меченные флуорохромами антитела к $CD3^+$ (FITC), $CD4^+$ (PE-Cy7*), $CD8^+$ (APC-Cy7*), $CD16^+/CD56^+$ (PE), $CD19^+$ (APC*), позволяющие дифференцировать: Т-лимфоциты ($CD3^+$), Т-хелперы ($CD3^+CD4^+CD8^-$), Т-цитотоксические ($CD3^+CD4^-CD8^+$), Т-дубль позитивные ($CD3^+CD4^+CD8^+$), NK-клетки ($CD16^+CD56^+$), В-лимфоциты ($CD19^+$), вычислить соотношение субпопуляций $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ — индекс, отражающий баланс Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток ($CD4^+/CD8^+$).

Статистическая обработка данных проведена с помощью программного комплекса Professional BioStat для Windows Version 2009 (t — критерий Стьюдента, критерии Фишера и χ^2), уровень статистической значимости: $p < 0,05$.

Результаты

Результаты исследования показали, что абсолютное количество лимфоцитов ($CD45^+$) крови у пациентов с УМ находилось в пределах нормы (в среднем $1,95 \pm 0,12 \times 10^9/\text{л}$).

При анализе средних значений общей популяции Т-клеток ($CD3^+$) обнаружили снижение как относительного до $70,4 \pm 1,4\%$, так и абсолютного ($1,45 \pm 0,1 \times 10^9/\text{л}$ и $1,33 \pm 0,07 \times 10^9/\text{л}$ соответственно) ее содержания у больных 1-й и 2-й групп против таковой у здоровых доноров без офтальмопатологии ($73,1 \pm 0,87\%$ и $1,51 \pm 0,08 \times 10^9/\text{л}$; $p > 0,05$). Эта тенденция наблюдалась в отношении субпопуляции $CD3^+CD4^+$ хелперов/индукторов (табл. 1).

Интересная динамика отмечена для цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$): если в крови больных с УМ малого размера (1 группа) имело место незначительное увеличение абсолютного количества этих клеток по сравнению с нормой, то для 2 группы пациентов было характерно снижение как процентного, так и абсолютного содержания данной субпопуляции ($0,52 \pm 0,03 \times 10^9/\text{л}$ и $25,6 \pm 1,04\%$ в норме

до $0,44 \pm 0,03 \times 10^9/\text{л}$ и $23,1 \pm 1,3\%$ во 2 группе соответственно; $p > 0,05$).

При опухолях большого размера (3 группа), обращает внимание значительное достоверное повышение абсолютного и относительного количества циркулирующих $\text{CD}3^+\text{CD}8^+$ лимфоцитов ($0,69 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$ и $27,6 \pm 1,4\%$ соответственно; $p < 0,05$) по сравнению с таковыми показателями больных с УМ 2 стадии. Данное обстоятельство свидетельствует о разбалансировке в звене иммунорегуляторных субпопуляций — хелперов-индукторов/цитотоксических лимфоцитов.

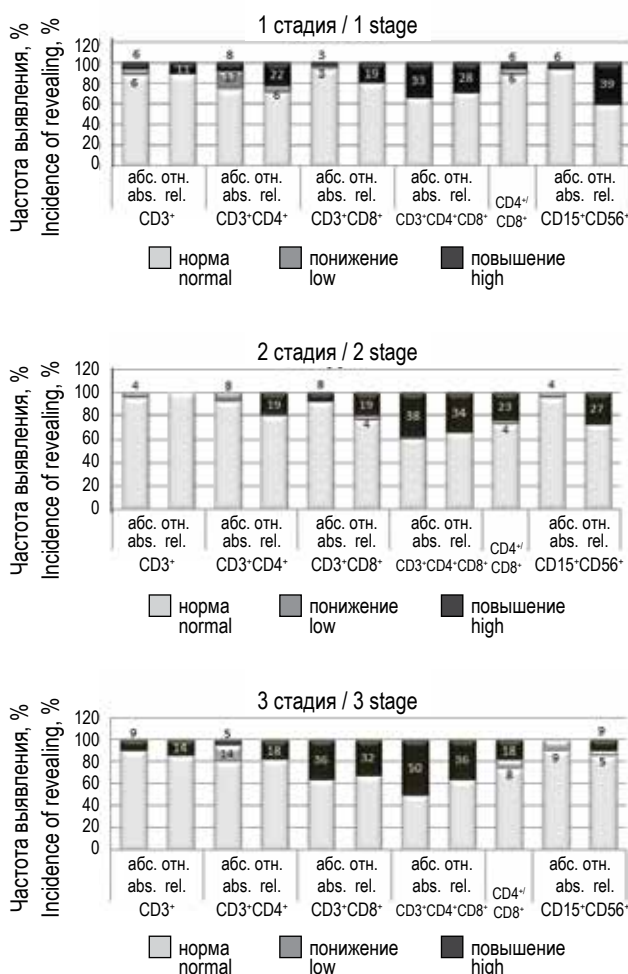


Рисунок 2. Частота случаев сдвигов от нормы (здоровых доноров) в (суб)популяционном составе лимфоцитов крови (относительное и абсолютное количество) и клеточного соотношения $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$
Примечание. А — при УМ малого размера (1 стадия); Б — при УМ среднего размера (2 стадия); В — при УМ большого размера (3 стадия).

Figure 2. Incidence of shifts from the normal values (healthy donors) for the blood lymphocyte population (sub) profile (relative and absolute numbers), and the $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ cell ratios
Note. A, small uveal melanoma; B, medium uveal melanoma; C, large uveal melanoma.

Действительно, при индивидуальном анализе частоты сдвигов от нормы соотношения регуляторных субпопуляций $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ (хелперов-индукторов/цитотоксических лимфоцитов) обнаружили, что по мере увеличения размеров опухоли повышается частота случаев выявления иммунологического дисбаланса у пациентов исследуемых групп. Так, если в 1 группе с УМ сдвиги в соотношении $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ относительно нормы определены в 12% случаев, то при УМ средних и больших размеров они выявлялись в 2,3 раза чаще (в 27%) (рис. 2А, Б, В).

Наряду с «классическими» иммунорегуляторными субпопуляциями, описанными выше, в крови человека могут обнаруживаться «дубль-позитивные» Т-клетки, которые раньше характеризовались как низкодифференцированные лимфоциты с фенотипом $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}8^+$. В последнее время получены доказательства участия этих клеток в противоопухолевой защите. Повышенное количество $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}8^+$ лимфоцитов обнаружено в крови пациентов со злокачественными новообразованиями, инфекционными и аутоиммунными заболеваниями, с длительной антигенной стимуляцией, а также при старении [2, 10].

В наших исследованиях увеличение абсолютного количества циркулирующих дубль-позитивных Т-клеток (табл. 1) выявлено практически у трети больных с УМ малого размера, у 38% 2 группы больных (опухоли среднего размера), в 50% случаев при УМ больших размеров ($p < 0,05$ по сравнению с 1 группой). Аналогичная тенденция отмечена и для относительного (процентного) содержания этой минорной субпопуляции в крови пациентов всех исследуемых групп (28, 34 и 36% случаев соответственно) (рис. 2А, Б, В).

Основными эффекторными лимфоцитами врожденного иммунитета являются НК-клетки (natural killer cells) [1], играющие ключевую роль в системе противоопухолевого надзора. Их повышение наблюдалось у обследованных нами пациентов с УМ малых размеров, но по мере роста опухоли, во 2 группе, у больных отмечается дефицитное состояние данной субпопуляции и дальнейшее его угнетение (табл. 1).

Обсуждение

УМ — часто встречаемая злокачественная опухоль глаза, склонная к метастазированию [3, 4, 14, 15]. По мере накопления данных о патогенезе этого заболевания были выделены факторы риска развития и прогрессирования опухоли: клинические, молекулярно-генетические и иммунологические [8].

Достоверно показано, что иммунная система способна распознавать злокачественные клетки и реагировать на такое распознавание активацией с включением эффективных механизмов уничтожения «измененного своего» [5].

Одним из последствий активации сигнальных каскадов в лимфоцитах является выработка цитокинов и проявление цитотоксических свойств, направленных на элиминацию трансформированных клеток [9].

В связи с этим субпопуляционный состав лимфоцитов, их функциональная активность широко изучаются при разных видах опухолей.

Важнейшими из иммунокомпетентных клеток (ИКК) противоопухолевого адаптивного иммунитета являются цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ) с фенотипом $CD3^+CD8^+$, высокоспецифичные в отношении противоопухолевых антигенов, способные распознавать и осуществлять киллинг малигнизированных клеток.

В нашем исследовании по мере увеличения размера УМ отмечается нарастание как абсолютного, так и относительного количества циркулирующих ЦТЛ (табл. 1).

Этот, на первый взгляд, парадоксальный факт согласуется с данными целого ряда работ отечественных и зарубежных исследователей, обнаруживших увеличение содержания циркулирующих $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов при развитии и прогрессировании различных видов опухолей [5].

В настоящее время известно, что субпопуляция $CD3^+CD8^+$ является морфологически и функционально неоднородной: помимо эффекторных, $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности антиген $CD28^+$ (для получения костимулирующего сигнала к их активации и пролиферации) – $CD3^+CD8^+CD28^+$ клеток, она включает Т-лимфоциты с отсутствием экспрессии молекулы $CD28$ ($CD3^+CD8^+CD28^-$ клетки), обладающие регуляторными свойствами.

Повышение количества лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD8^+CD28^-$ в опухолевом микроокружении и в периферической крови, по данным ряда авторов, ассоциируется с опухолевым ростом [11].

В свою очередь $CD8^+CD28^-$ Т-клетки также являются гетерогенной популяцией и включают в себя как клетки-супрессоры, так и клетки-эффекторы. Это подтверждается продукцией ими и супрессорных (IL-10, IL-4, TGF- β) и эффекторных (IFN γ , TNF α) цитокинов [11]. Во многих экспериментальных и клинических исследованиях эта популяция характеризуется в основном как супрессорная [11, 13].

Показано, что только $CD8^+CD28^-$, но не $CD8^+CD28^+$ Т-клетки, выделенные из опухолевой ткани и метастатических лимфоузлов больных с различными формами злокачественных опухолей, обладали супрессорной активностью. Клетки-супрессоры с фенотипом $CD8^+CD28^-$ были обнаружены и в периферической крови этих пациентов.

Не исключено, что в нашем случае повышение количества циркулирующих ЦТЛ могло происходить за счет прироста этой малой субпопуляции $CD8^+CD28^-$ Т-лимфоцитов. Однако это предположение требует доказательств и дальнейших исследований.

Повышение абсолютного и относительного числа дубль-позитивных клеток при нарастании размеров УМ также согласуется с литературными данными в отношении меланомы кожи [10].

Особая роль отводится НК-клеткам (natural killer cells), которые являются главными эффекторными лимфоцитами врожденного иммунитета; обладают прямой неспецифической активностью: они обеспечивают защиту от вирусных инфекций и участвуют в контроле опухолевого роста и метастазирования [1].

Результаты исследований показали повышение количества НК-лимфоцитов в крови у больных с малыми УМ, с нарастанием же размера опухоли отмечалось снижение их содержания.

По данным ряда авторов, при различных онкологических заболеваниях количество и активность НК-клеток могут служить прогностическим критерием метастазирования, плохого ответа на лечение и уменьшения показателей общей выживаемости [1].

Заключение

Проведенный нами индивидуальный анализ состава лимфоцитов позволяет заключить, что рост УМ сопровождается системными разнонаправленными сдвигами в качественном и количественном составе ИКК, затрагивая как врожденное (НК-клетки), так и адаптивное (Т-лимфоциты) звенья противоопухолевой иммунной защиты.

Полученные результаты представляются важными для разработки персонализированных подходов к прогнозу и лечению пациентов с УМ.

Динамика изменения количественного состава субпопуляций лимфоцитов при онкологических заболеваниях может представлять ценность для мониторинга иммунотерапевтических воздействий и дополнить клиническую оценку течения основного заболевания.

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С УМ И ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ (M±m)

TABLE 1. SUBPOPULATION COMPOSITION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH UVEAL MELANOMA AND HEALTHY VOLUNTEERS (M±m)

Показатели Factors		Группы Groups			
		Контрольная Control (n = 33)	УМ UM		
			Размер опухоли Size of tumor		
			малый small (n = 36)	средний medium (n = 26)	большой big (n = 22)
Лимфоциты CD45 ⁺ Lymphocytes CD45 ⁺	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	2,06±0,11	2,02±1,3	1,8±0,9	2,2±1,5
Т-лимфоциты общая популяция CD3 ⁺ T lymphocytes (bulk population) CD3 ⁺	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	1,50±0,08	1,4±0,1	1,3±0,7	1,6±0,1
	%	73,10±0,87	70,4±1,4	70,4±1,3	73,1±1,7
Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺ T helpers CD3 ⁺ CD4 ⁺	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	0,97±0,06	0,90±0,04	0,86±0,05	0,96±0,07
	%	45,70±1,19	44,3±1,6	45,8±1,4	44,2±1,4
Т-цитотоксические CD3 ⁺ CD8 ⁺ Cytotoxic T lymphocytes CD3 ⁺ CD8 ⁺	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	0,52±0,03	0,53±0,04	0,44±0,03	0,60±0,06 [#]
	%	25,60±1,04	25,60±1,04	23,1±1,3	27,6±1,4 [#]
Т-«дубль позитивные» лимфоциты CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ “duble positive” lymphocytes CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	0,009±0,007	0,030±0,004*	0,020±0,004	0,020±0,004
	%	0,54±0,31	1,10±0,15*	1,30±0,25	1,10±0,15
В-лимфоциты CD19 ⁺ B lymphocytes CD19 ⁺	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	0,24±0,02	0,23±0,02	0,23±0,02	0,28±0,03
	%	12,80±0,63	10,8±0,6	12,0±0,7	12,2±1
Натуральные киллеры CD16 ⁺ CD56 ⁺ Natural killers CD16 ⁺ CD56 ⁺	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	0,29±0,03	0,34±0,02	0,32±0,02	0,30±0,03
	%	14,00±0,87	18,3±1,5*	17,03±1,15*	14,1±1,5
Соотношение хелперы-индукторы/ цитотоксические лимфоциты CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Ratio of helper-inducer T lymphocytes to cytotoxic- suppressor T lymphocytes, CD4 ⁺ /CD8 ⁺	рассч.ед unit of account	1,95±0,12	1,8±0,1	2,2±0,18	1,8±0,17

Примечание. n – количество обследуемых в группе; * – достоверность различия параметров у больных исследуемых групп по сравнению с группой контроля (p < 0,05); # – достоверность различия параметров у больных с большим и средним размером опухоли (p < 0,05).

Note. n, number of subjects in the group; *, reliability of the differences in the parameters of the patients of the studied groups compared with the control group (p < 0.05); #, reliability of differences in parameters in patients with large and medium tumor size (p < 0.05).

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г., Коваленко Е.И. Основные свойства и функции NK-клеток человека // Иммунология, 2012. Т. 33, № 4. С. 220-224. [Abakushina E.V., Kuzmina E.G., Kovalenko E.I. The main characteristics of human natural killers cells. *Immunologiya = Immunology*, 2012, Vol. 33, no. 4, pp. 220-224. (In Russ.)]
2. Балацкая Н.В., Еремеева Е.А., Слепова О.С., Рябина М.В., Куликова И.Г., Сорожкина Е.С. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 461-466. [Balatskaya N.V., Eremeeva E.A., Slepova O.S., Ryabina M.V., Kulikova I.G., Sorozhkina E.S., Peripheral blood subpopulation of lymphocytes of patients with age-related macular degeneration. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 461-466. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-461-466.
3. Бровкина А.Ф. Офтальмоонкология. М.: Медицина, 2002. 421 с. [Brovkina A.F. *Ophthalmooncology*. Moscow: Medicine, 2002. 421 p.]
4. Мякошина Е.Б. Комплексная диагностика начальной меланомы хориоидеи. Russian Electronic Journal of Radiology, 2016. Т. 6, № 4. С. 19-28. [Myakoshina E.B. Complex diagnostics of early choroidal melanoma. *Russian Electronic Journal of Radiology*, 2016, Vol. 6, no. 4, pp. 19-28. (In Russ.)]
5. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н., Короткова О.В., Славина Е.Г., Борунова А.А. Новые возможности регуляции противоопухолевого иммунного ответа // Злокачественные опухоли, 2015. Т. 1. С. 24-30. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Zabolina T.N., Korotkova O.V., Slavina E.G., Borunova A.A. New regulation of antitumor immune response. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumours*, 2015, Vol. 1, pp. 24-30. (In Russ.)]
6. Саакян С.В., Катаргина Л.А., Кричевская Г.И., Мякошина Е.Б., Денисова Е.В. Специфические иммуноглобулины G и M в сыворотке крови при ретинобластоме и «псевдоретинобластомах» // Вестник офтальмологии, 2017. Т. 133, № 4. С. 12-16. [Saakyan S.V., Katargina L.A., Krichevskaya G.I., Myakoshina E.B., Denisova E.V. Specific immunoglobulins G and M in blood serum in retinoblastoma and "pseudoretinoblastoma". *Vestnik oftalmologii = Bulletin of Ophthalmology*, 2017, Vol. 133, no. 4, pp. 12-16. (In Russ.)]
7. Лихванцева В.Г., Бровкина А.Ф., Гусев Г.А., Юровская Н.Н. Способ выявления скрытого метастазирования при увеальной меланоме. Патент № 2147373. [Likhvantseva V.G., Brovkina A.F., Gusev G.A., Yurovskaya N.N. A method for detecting latent metastasis in uveal melanoma. Patent No. 2147373].
8. Саакян С.В., Амирян А.Г., Цыганков А.Ю., Склярова Н.В., Залетаев Д.В. Клинические, патоморфологические и молекулярно-генетические особенности увеальной меланомы с высоким риском метастазирования // Российский офтальмологический журнал, 2015. Т. 8, № 2. С. 47-52. [Saakyan S.V., Amiryany A.G., Tsygankov A.Yu., Sklyarova N.V., Zaletaev D.V. Clinical, pathomorphological and molecular genetic aspects of uveal melanoma with high metastatic risk. *Rossiyskiy oftalmologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmology Journal*, 2015, Vol. 8, no. 2, pp. 47-52. (In Russ.)]
9. Чернявская М.А., Ефремов А.В., Черных В.В. Взаимосвязь цитокинов в слезной и внутриглазной жидкости при меланоме хориоидеи. Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки, 2015. Т. 20, № 3. С. 710-712. [Chernyavskaya M.A., Efremov A.V., Chernykh V.V. Interrelation of cytokines in the lacrimal and intraocular fluid in choroidal melanoma. *Vestnik Tambovskogo universiteta. Seriya: Estestvennyye i tekhnicheskie nauki. = Bulletin of Tambov University. Series: Natural and Technical Sciences*, 2015, Vol. 20, no. 3, pp. 710-712. (In Russ.)]
10. Desfrancois J. Double positive CD4CD8 alpha beta T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas. *PLoS ONE*, 2010, Vol. 5, no. 1, e8437. doi: 10.1371/journal.pone.0008437.
11. Filaci G., Fenoglio D., Fravega M. CD8⁺CD28⁻ T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, pp. 4323-4334.
12. Houghton A.N., Gold J.S., Blachere N.E. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr. Opin. Immunol.*, 2001, Vol. 13, pp. 134-140.
13. Meloni F., Morosini M., Solari N. Foxp3 expressing CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁻ T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Hum. Immunol.*, 2006, Vol. 67, pp. 1-12.
14. Shields J.A. Diagnosis and management of intraocular tumors – St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1983, p. 703.
15. Singh A.D., Turell M.E., Topham A.K. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology*, 2011, Vol. 118, no. 9, pp. 1881-1885.

Авторы:

Саакян С.В. — д.м.н., профессор, начальник отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Балацкая Н.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, начальник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Saakyan S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Ophthalmooncology and Radiology, Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Balatskaya N.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Head, Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Катаргина Л.А. — д.м.н., профессор, начальник отдела патологии глаз у детей, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Куликова И.Г. — старший научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии

Мякошина Е.Б. — к.м.н., научный сотрудник отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Katargina L.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pediatric Eye Pathology, Deputy Director for Research, Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Kulikova I.G., Senior Research Associate, Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Myakoshina E.B., PhD (Medicine), Research Associate, Department of Ophthalmology and Radiology, Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Поступила 05.12.2018
Отправлена на доработку 26.12.2018
Принята к печати 04.03.2019

Received 05.12.2018
Revision received 26.12.2018
Accepted 04.03.2019

СИСТЕМА КОМПЛЕМЕНТА КАК МАРКЕР ИММУННОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ РАССТРОЙСТВАХ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА У ДЕТЕЙ

**Черемных Е.Г., Иванов П.А., Фактор М.И., Чикина Е.Ю.,
Никитина С.Г., Симашкова Н.В., Брусов О.С.**

ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Известно, что уровень функциональной активности системы комплемента зависит не только от соотношений и концентраций компонентов, участвующих в образовании конечных продуктов системы, но и от уровня активности ингибиторов. Также многочисленные взаимосвязи с гемостазом вносят существенный вклад в общий уровень активности системы комплемента. При хронических заболеваниях, сопровождающихся дисрегуляцией иммунной системы, неизбежны изменения в функционировании системы комплемента. Все психические заболевания имеют хронический характер, а изменения в иммунной системе у таких больных усиливают их тяжесть. Расстройства аутистического спектра у детей являются психическими заболеваниями. Как правило, у таких детей выявляется дисрегуляция защитных механизмов, что проявляется в чрезмерной восприимчивости к вирусным и бактериальным инфекциям. Поэтому уровень функциональной активности всей системы комплемента, как ключевого элемента иммунной системы, имеет диагностическую и прогностическую значимость для этой патологии.

Нами проведены исследования функциональной активности системы комплемента у больных расстройствами аутистического спектра с помощью ранее разработанного метода. Метод основан на реакции простейших *Tetrahymena pyriformis*, которые являются активаторами и мишенями для системы комплемента. В качестве основного параметра при оценке комплемента использовали потенциал комплемента — "СК. Для каждого образца сыворотки при 4-х ее концентрациях (титры 1/20, 1/40, 1/80, 1/160) определяли время гибели половины простейших — T_{50} , с помощью прибора «Био-лат». Потенциал комплемента вычисляли как площадь, ограниченную кривой зависимости величины обратной T_{50} от величины обратной титру сыворотки. В соответствии с U-критерием Манна–Уитни установлено различие между группой больных и группой здоровых по параметру T_{50} при титре 1/160 — $Z = 4,43$, $p < 0,001$ и по параметру "СК — $Z = 5,8$, $p < 0,001$. Параметр "СК вычислен с учетом результатов при всех измеренных концентрациях сыворотки, и различие между двумя группами по U-критерию Манна–Уитни больше, чем различие между этими группами по параметру T_{50} . Поэтому параметр "СК принят нами в качестве основного показателя общей функциональной характеристики СК.

Оценку вклада плазменной составляющей гемостаза в уровень функциональной активности системы комплемента проводили с помощью определения потенциала комплемента в сыворотке и плазме

Адрес для переписки:

Черемных Елена Григорьевна
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»
Российской академии наук
115522, Россия, Москва, Каширское ш., 34.
Тел.: 8 (985) 225-98-07.
E-mail: elcher10@yandex.ru

Address for correspondence:

Cheremnykh Elena G.,
Mental Health Research Center, Russian Academy
of Sciences
115522, Russian Federation, Moscow,
Kashirskoye highway, 34.
Phone: 7 (985) 225-98-07.
E-mail: elcher10@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Черемных, П.А. Иванов, М.И. Фактор,
Е.Ю. Чикина, С.Г. Никитина, Н.В. Симашкова,
О.С. Брусов «Система комплемента как маркер
иммунной дисфункции при расстройствах
аутистического спектра у детей» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 773–780.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-773-780
© Черемных Е.Г. и соавт., 2019

For citation:

E.G. Cheremnykh, P.A. Ivanov, M.I. Factor, E.Yu. Chikina,
S.G. Nikitina, N.V. Simashkova, O.S. Brusov "Complement
system as a marker of immune dysfunction in children
autism spectrum disorders", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4, pp.
773–780.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-773-780
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-773-780

для каждого образца крови у 6 больных расстройствами аутистического спектра и 5 здоровых доноров. Для здоровых разница потенциалов комплемента в плазме и сыворотке небольшая и активность комплемента у всех выше в плазме, чем в сыворотке. Для больных уровни потенциала комплемента в сыворотке и плазме отличаются значительно — у 2-х больных уровень выше в сыворотке, чем в плазме, у 3-х больных уровень в плазме намного выше, чем в сыворотке. Разная вовлеченность коагуляции в активацию СК может свидетельствовать об особенностях дисфункции иммунной системы у больных расстройствами аутистического спектра, причины заболеваний которых различны.

Ключевые слова: комплемент, инфузории *Tetrahymena pyriformis*, подсчет клеток, аутизм, иммунная дисфункция, коагуляция

COMPLEMENT SYSTEM AS A MARKER OF IMMUNE DYSFUNCTION IN CHILDREN AUTISM SPECTRUM DISORDERS

Cheremnykh E.G., Ivanov P.A., Factor M.I., Chikina E.Yu., Nikitina S.G., Simashkova N.V., Brusov O.S.

Mental Health Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. It is known that functional activity of complement system depends not only on balance and concentration of components participating in formation of the system end products, but also on levels of inhibitory activities. Numerous relations with hemostasis also substantially contribute to general level of complement system activity. Changes in complement system functioning are inevitable during chronic diseases accompanied with immune system dysregulation. All mental diseases tend to be chronic and are they aggravated by patients' immune system changes. Autism spectrum disorders in children is a group of mental disorders. Immune system dysregulation is usually detected in such patients, manifesting as excessive susceptibility to viral and bacterial infections. Therefore, the level of its functional activity is diagnostically and prognostically significant in this pathology, since the complement system is a key element of immune system.

We have evaluated functional activity of complement system in patients with autistic spectrum disorders, using the method which was developed earlier. It is based on the reaction of the protozoa (*Tetrahymena pyriformis*) which are both targets and activators for the complement system. The complement system capacity ($^{\circ}\text{SC}$) was used as the main parameter of complement evaluation. The half-time of protozoa survival (T_{50}) was defined using the BioLat device for each serum specimen added at four concentrations (1/20, 1/40, 1/80, 1/160 dilution). The complement capacity was calculated as the area enclosed by influence curve of the reciprocals of T_{50} and the serum dilution. According to Mann–Whitney U test, the difference between patients' and healthy volunteers' groups was established as $Z = 4.43$ (by T_{50} at 1/160 dilution), $p < 0.001$ and by $^{\circ}\text{SC}$ as $Z = 5.8$, $p < 0.001$. $^{\circ}\text{SC}$ was calculated from the results obtained at each serum concentration measured. The difference between the two groups according to Mann–Whitney U test appeared to be more significant than the difference according to T_{50} . Therefore, $^{\circ}\text{SC}$ was taken as the main characteristic of complement system function.

The contribution of hemostasis plasma components to complement system functional activity level was estimated by determination of complement capacity in plasma and serum of each blood sample from 6 patients with autism spectrum disorders and 5 healthy donors. All healthy donors showed small difference between plasma and serum complement capacity, and their complement activity was higher in plasma. In patients' group, the complement capacity levels in plasma and serum differed significantly. The $^{\circ}\text{SC}$ levels of two patients were higher in serum than in plasma, and the $^{\circ}\text{SC}$ levels of three other patients were significantly higher in plasma than in serum. Differential involvement of coagulation into the complement system activation may be indicative for the immune system dysfunction which is observed in patients with autistic spectrum disorders of different etiology.

Keywords: complement, infusoria *Tetrahymena pyriformis*, cell counting, autism, immune dysfunction, coagulation

Введение

Современные представления о роли и функциях системы комплемента (СК) определяют ее как быстрого и эффективного организатора иммунных реакций, вносящего существенный вклад в гомеостаз [10]. Многочисленные функции СК реализуются с учетом точной настройки положительных и отрицательных обратных связей, как в рамках самой системы, так и за счет ее внешних взаимодействий с другими участниками защиты внутренней среды организма.

Существование в сложных системах положительных обратных связей потенциально является угрозой так называемого триггерного эффекта, когда небольшое изменение баланса участников системы вызывает ее перескок на новый уровень функционирования. Для достижения гомеостаза и, соответственно, для выживаемости в сложной системе организму человека необходимы регуляторы в узловых точках, снижающие риск неконтролируемого роста активных компонентов. Уровень функциональной активности СК зависит не только от соотношений и концентраций компонентов, участвующих в образовании конечных продуктов системы, но и от уровня активности ингибиторов. Также многочисленные взаимосвязи с гомеостазом, кинин-калликреиновой системой и иммунными клетками вносят вклад в общий уровень активности СК. При хронических заболеваниях, сопровождающихся дисрегуляцией иммунной системы, неизбежны изменения в функционировании СК.

Все психические заболевания имеют хронический характер, а изменения в иммунной системе у таких больных усиливают их тяжесть. Существуют многочисленные исследования с использованием иммуномодуляторов при лечении шизофрении, которые приводят к стойкой ремиссии [2].

Расстройства аутистического спектра (РАС) у детей также являются психическими заболеваниями, для которых характерно аномальное поведение, трудность социальной коммуникации, сужение интересов и многократное повторение поведенческих актов. РАС часто сопровождаются эпилепсией, депрессией, тревожным состоянием и гиперактивным расстройством с дефицитом внимания. Как правило, у таких детей выявляется дисрегуляция иммунной системы, дети с этим заболеванием чрезмерно восприимчивы к вирусным и бактериальным инфекциям, что свидетельствует о нарушениях в защитных механизмах организма, в том числе и в системе комплемента. Поэтому уровень функциональной активности СК имеет диагностическую и прогностическую значимость для этой патологии [8, 12].

Как правило, СК оценивают по количеству отдельных ее компонентов — например, С3, С4, С5, что не может служить общей характеристикой функциональной активности системы. В связи с этим нами был разработан количественный метод и методика определения общей функциональной оценки СК [3, 4]. Кроме того, для определения вклада гомеостаза в уровень функциональной активности СК разработан метод для оценки взаимодействия СК и гомеостаза, первые результаты этого исследования представлены в настоящей статье.

Материалы и методы

Оценку СК в сыворотке крови проводили для группы 64 больных детей с РАС (детский аутизм, инфантильный психоз — F84.02) в возрасте от 3 до 15 лет и контрольной группы в 28 соматически и психически здоровых детей, сопоставимых по возрасту. Сравнения между группами проводили в программе Statistica 7.0 с использованием непараметрического метода Манна—Уитни.

Уровень взаимодействия СК и коагуляции оценивали в группе больных детей с РАС (6 человек) при сравнении с группой здоровых в 5 человек. Для этого сравнивали функциональную

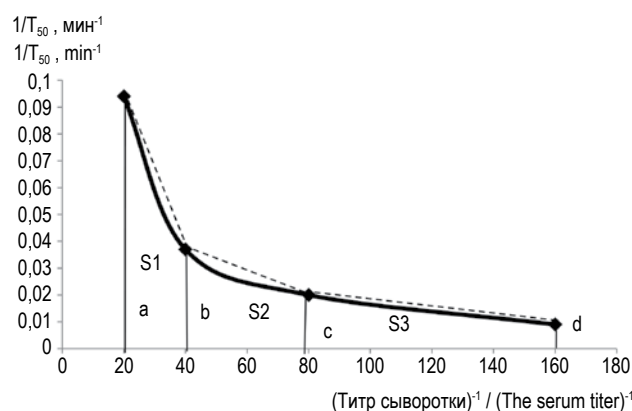


Рисунок 1. Пример вычисления потенциала СК

Данные для примера вычисления потенциала СК				
(Титр сыворотки) ⁻¹	20	40	80	160
T ₅₀ , мин	10,61	26,77	49,86	110,87
1/T ₅₀ мин ⁻¹	0,094	0,037	0,02	0,009

$$^{\circ}\text{СК} = S1 + S2 + S3 = (a+b)/2 \cdot 20 + (b+c)/2 \cdot 40 + (c+d)/2 \cdot 80 = 3,6 \text{ (мин}^{-1} \cdot \text{ч титр}^{-1})$$

Figure 1. Example of calculating the SC potential SK

Data for the example of calculating the potential of SC				
(The serum titer) ⁻¹	20	40	80	160
T ₅₀ , min	10.61	26.77	49.86	110.87
1/T ₅₀ min ⁻¹	0.094	0.037	0.02	0.009

$$^{\circ}\text{SC} = S1 + S2 + S3 = (a+b)/2 \cdot 20 + (b+c)/2 \cdot 40 + (c+d)/2 \cdot 80 = 3,6 \text{ (min}^{-1} \cdot \text{ч titer}^{-1})$$

активность СК в сыворотке и плазме для каждого образца крови.

Метод оценки СК основан на реакции гибели простейших — инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (штамм WH14 коллекция Всероссийского НИИ Ветеринарной санитарии и экологии) при добавлении сыворотки, разведенной в буферном растворе с титром 1/20, 1/40, 1/80, 1/160. Для каждой концентрации сыворотки определяли время гибели половины (T_{50}) от начального количества клеток.

В качестве основного параметра при оценке СК использовали потенциал СК (рис. 1). Потенциал СК (°СК) вычисляли как площадь, ограниченную кривой зависимости величины обратной времени гибели половины простейших $1/T_{50}$ мин⁻¹ от величины обратной титру сыворотки, т.е. коэффициента разведения. На рисунке 1 показан пример вычисления потенциала СК как суммы площадей 3-х трапеций.

Все оценки производили на основании подсчета количества простейших на приборе «Биолат» [5] при воздействии на них раствора сыворотки или плазмы.

Ранее в качестве основы буфера был использован триэтаноламин, но, ввиду невысокой стабильности этого реактива, он был заменен на трис-(гидроксиметил)-аминометан (Трис), титрованный концентрированной кислотой HCl до pH = 7,5. Буферный раствор включал 0,03 М Трис, 2,5 mM Ca⁺⁺, 1,5 mM Mg⁺⁺, 0,05 M Na⁺. Все реактивы фирмы Sigma.

Результаты и обсуждение

У 43 больных РАС из 64 при титре сыворотки 1/160 в буферном растворе параметр T_{50} увели-

чен и, соответственно, снижен потенциал СК. В группе здоровых только у 5 из 28 человек эти параметры отличаются от нормальных. Полученные результаты T_{50} при титре сыворотки 1/160 и вычисленные °СК для двух групп после статистической обработки представлены в таблице 1.

В соответствии с U-критерием Манна–Уитни установлено различие между группой больных и группой здоровых по параметру T_{50} (0,625%) — $Z = 4,43$, $p < 0,001$ и по параметру °СК — $Z = 5,8$, $p < 0,001$.

Параметр °СК вычислен с учетом результатов при всех измеренных концентрациях сыворотки, и различие между двумя группами по U-критерию Манна–Уитни больше, чем различие между этими группами по параметру T_{50} . Поэтому параметр °СК принят нами в качестве основного показателя общей функциональной характеристики СК.

Активация СК в растворах сыворотки крови происходит вследствие взаимодействия пусковых компонентов СК с пептидогликанами клеточной стенки инфузорий. Конечные продукты СК — мембранно-атакующие комплексы, образующиеся на мембране простейших, являются причиной их гибели [1].

К системе комплемента относят более 40 белков — эффекторов, ингибиторов и рецепторов, растворимых и локализованных на мембранах клеток крови. Эта каскадная протеолитическая система, имеет 3 пути активации — классический, лектиновый и альтернативный. Каждый последующий фермент системы является субстратом предыдущего, активированного протеолизом или комплексованием с другими компонентами. Все три пути приводят к общей точке — ферментативной реакции образования из профермента

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

TABLE 1. RESULTS OF THE EVALUATION OF THE COMPLEMENT SYSTEM FUNCTIONAL ACTIVITY

Параметр Parameter	Группа больных РАС (64) Group of patients with RAS (64)		Контрольная группа (28) Control group (28)	
	T_{50} при титре сыворотки 1/160 T_{50} with a titer sera 1/160	°СК °SC	T_{50} при титре сыворотки 1/160 T_{50} with a titer sera 1/160	°СК °SC
Медиана Median	91,4	5,45	56,6	7,8
$Q_{0,25}$ $Q_{0,25}$	62,6	4,35	45,7	6,9
$Q_{0,75}$ $Q_{0,75}$	120	6,3	71,1	10,6
Максимум Maximum	200	14,5	107,5	21,6
Минимум Minimum	28,3	2,8	28,1	4,6

С3 узлового компонента СК — С3b и анафила-токсина С3а.

Пусковые компоненты каждого из путей активации: в классическом пути — C1q, в лектиновом — MBL. Альтернативный путь начинается с взаимодействия С3 с липополисахаридами мембран патогенов. Существует также спонтанный гидролиз С3, продукт которого С3b(H₂O), объединяясь с фактором В (фВ), гидролизует С3 до С3а и С3b, а С3b совместно с Вb может гидролизовать С3, тем самым реализовывая положительную обратную связь. Белки С2b, С3а, С4а, С5а — остатки после протеолиза активных компонентов, также являются участниками общей системы гомеостаза в крови. Обязательным условием для систем с положительной обратной связью является наличие ингибиторов в узловых точках системы. Для СК такими ингибиторами являются белки серпины — ингибиторы сериновых протеаз: для С1 — ингибитор С1INC, для С3b — фактор I совместно с фактором Н и С4ВР. Их концентрация может существенно изменять результирующую функциональную активность СК.

Концентрация в сыворотке профермента С3 самая высокая среди всех компонентов СК, и эта концентрация выше, чем концентрация С4 в 2,4 раза, а для С2 в 35 раз! [6]. Поскольку положительная обратная связь СК включает узловой компонент — С3 с его увеличенной концентрацией, необходим регулятор, не позволяющий системе чрезмерно увеличивать конечный продукт — мембрану атакующий комплекс (МАК). Основным ингибитор этого звена, фактор I (фI), в присутствии фактора Н (фН) и ингибитора С4ВР расщепляет активный фермент С3b на фрагменты, iC3b, С3d, С3с, которые взаимодействуют с рецепторами клеток крови, включают их внутриклеточные пути синтеза цитокинов и других сигнальных молекул. Таким образом, от этого ингибирования зависят потенциалы 2 путей после гидролиза С3:

— образование молекул, обеспечивающих взаимодействие СК с нейтрофилами и моноцитами,

а также натуральными киллерами, дендритными и тучными клетками, В и Т-лимфоцитами;

— терминальный путь синтеза конечного продукта комплемента — МАК.

Оказывается, что у детей с РАС концентрации фI, фН и С1q выше, чем у психически здоровых детей [9], а, следовательно, количество конечных продуктов СК — МАК уменьшено, и при этом увеличено количество фрагментов С3b — iC3b, С3с, С3d. Следствием такой особенности данной патологии является дисбаланс иммунной системы, который проявляется в увеличенной чувствительности больных РАС к вирусным и бактериальным инфекциям.

Результаты настоящего исследования показывают, что в группе больных детей снижена функциональная активность СК, т.е. количество конечных продуктов СК уменьшено у 67% больных по сравнению со здоровыми. Этот результат особенно выражен при титре сыворотки 1/160, а вычисленный показатель — потенциал комплемента также достоверно отличается между группами больных и здоровых. И если учесть излишнюю восприимчивость к вирусным инфекциям больных РАС, то для успешного фагоцитоза патогенов у этих больных нет достаточного количества сильных опсоинов С3b и литических комплексов МАК. Фрагменты iC3b, С3с и увеличенные количества молекул С1q приводят к излишней несбалансированной активации иммунной системы. Уменьшение количества конечного продукта СК (МАК), непосредственно убивающего чужеродные объекты в крови, является фактором риска по отношению к защите от бактериальных агентов.

Но увеличенная активность фI — проявление системного регулирования гомеостаза, так как при выявленной у больных РАС излишней активности С1q, возможно, обусловленной генетическими факторами, СК может повреждать собственные клетки организма. Установлено [11], что в постнатальном созревании синаптических сетей — «обрезка синапсов» — принимает

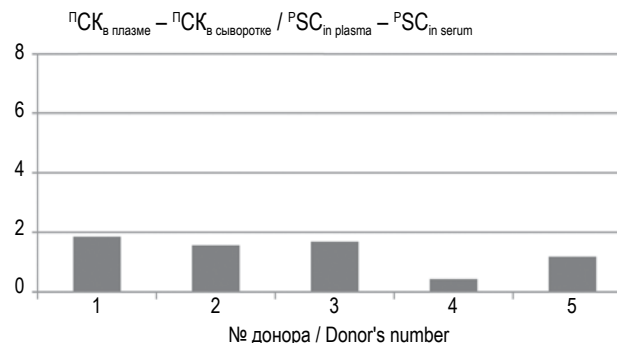
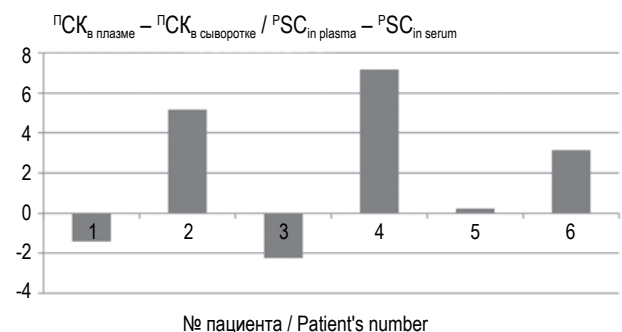


Рисунок 2. Разность потенциалов СК в плазме и сыворотке крови: А – больных РАС, Б – здоровых доноров

Figure 2. Difference in SC potentials in plasma and serum: A, patients with RAS; B, healthy donors

непосредственное участие C1q, и его увеличенные концентрации могут приводить к неверной настройке нейронных связей. Таким образом, генетически предопределенное увеличенное количество молекул пускового элемента СК является причиной дисбаланса не только в иммунной системе таких больных, но и причиной функциональных изменений в мозге.

Для оценки уровня и суммарной направленности функциональных связей между СК и одной из составляющих гемостаза — коагуляцией, использовали вычисления разности потенциалов СК в плазме и сыворотке одного и того же образца крови.

Уровень взаимодействия СК и коагуляции для 6 больных и 5 здоровых показаны на диаграммах рисунка 2.

Гомеостаз организма зависит от многих взаимодействующих факторов, в том числе уровней активности путей коагуляции, связь которых с СК многоточечна и двунаправлена [7]. Связь гемостаза и комплемента настолько плотная, что они рассматриваются как единая система сериновых протеаз. Эта система имеет важнейшее значение для эффективной защиты от патогенов, а также при травмах от кровотечения и внедрения микроорганизмов в рану. Но в связи с наличием и в комплементе, и в гемостазе положительных обратных связей при сбоях в иммунном ответе возможна неконтролируемая активация не только СК, но и коагуляции. Гомеостаз во многом определяется устойчивостью этих систем, т.е. от сбалансированности активаторов и ингибиторов, многие из которых участвуют и в СК, и в коагуляции. Нарушения баланса могут определяться наследственными причинами или эпигенетическими изменениями экспрессии белков, из-за неблагоприятного воздействия на организм внешних факторов. Для оценки результирующего уровня взаимодействия СК и коагуляции нами начаты исследования функциональной активности комплемента в сыворотке и плазме крови,

где, кроме компонентов СК, присутствуют ферменты путей коагуляции.

При активации СК в плазме в эту систему вовлекаются активные компоненты путей коагуляции, и разница в результатах оценки СК в плазме и сыворотке может отражать уровень взаимодействия СК и коагуляции.

Для здоровых разница "СК в плазме и сыворотке" небольшая и активность СК у всех выше в плазме, чем в сыворотке. Для больных уровни СК в сыворотке и плазме отличаются значительно — у 2-х больных активность СК выше в сыворотке, чем в плазме, у 3-х больных плазме намного выше, чем в сыворотке. Такая разная вовлеченность коагуляционных факторов в активацию СК может свидетельствовать об особенностях дисфункции иммунной системы у больных РАС, причины заболеваний которых различны, например, это могут быть генетически обусловленные или постнатально действующие факторы на развивающийся организм ребенка.

Выводы

Для оценки функциональной активности СК наиболее информативным является рассчитанный по 4-м измеренным титрам сыворотки потенциал системы комплемента — "СК ($\text{мин}^{-1} \times \text{титр}^{-1}$).

Группа из 64 детей, больных РАС, статистически достоверно отличается от группы здоровых, а снижение "СК у 67% больных может свидетельствовать о дисбалансе в иммунной системе, который проявляется излишней восприимчивостью таких детей к вирусным и бактериальным инфекциям.

Оценка взаимодействия систем коагуляции и комплемента позволит получать более подробную информацию об особенностях функционирования системы сериновых протеаз и в процессе следующего этапа наших исследований будет охарактеризована с целью получения новых маркеров дисбаланса иммунной системы.

Список литературы / References

1. Иванов П.А., Фактор М.И., Карпова Н.С., Черемных Е.Г., Брусов О.С. Комплемент-опосредованная гибель инфузорий *Tetrahymena pyriformis* под воздействием сыворотки крови человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2015. Т. 160, № 12. С. 739-743. [Ivanov P.A., Faktor M.I., Karpova N.S., Cheremnykh E.G., Brusov O.S. Complement-mediated death of ciliate *Tetrahymena pyriformis* caused by human blood serum. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016, Vol. 160, no. 12, pp. 739-743. (In Russ.)]
2. Крыжановский Г.Н., Акмаев И.Г., Магаева С.В., Морозов С.Г. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в норме и патологии. М.: Медицинская книга, 2010. 288 с. [Kryzhanovskiy G.N., Akmaev I.G., Magaeva S.V., Morozov S.G. Neuroimmunoendocrine interactions in norm and pathology]. Moscow: Medical Book, 2010. 288 p.
3. Кулешина О.Н., Козлов Л.В., Черемных Е.Г. Универсальный метод определения функциональной активности комплемента человека, лабораторных, домашних и сельскохозяйственных животных, земноводных и птиц // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2014. Т. 157, № 2. С. 254-257. [Kuleshina O.N., Kozlov L.V., Cheremnykh E.G. A universal method for measuring functional activity of complement

in humans, laboratory, domestic, and agricultural animals, amphibians, and birds. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, Vol. 157, no. 2, pp. 254-257. (In Russ.)]

4. Черемных Е.Г., Иванов П.А., Фактор М.И., Карпова Н.С., Васильева Е.Ф., Гусев К.В., Брусов О.С. Новый метод оценки функциональной активности системы комплемента // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 479-488. [Cheremnykh E.G., Ivanov P.A., Faktor M.I., Karpova N.S., Vasilyeva E.F., Gusev K.V., Brusov O.S. A new method to assess functional activity of serum complement system. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 479-488. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-479-488.

5. Черемных Е.Г., Покатаев А.С., Гридунова В.Н. Прибор для биологических исследований. Патент РФ № 2361913 С2, Бюл. № 20, 2009. [Cheremnykh E.G., Pokataev A.S., Gridunova V.N. The device for biological research. RF Patent 2361913 С2, Bull. 20, 20.07.2009.]

6. Шавлюгин Е.А., Ханин М.А. Математическая модель активации системы комплемента при участии контактной системы свертывания крови // Фундаментальные исследования, 2012. № 1. С. 172-178. [Shavlyugin E.A., Khanin M.A. A mathematical model of activation of the complement system with the participation of the contact system of blood coagulation. *Fundamentalnye issledovaniya* = *Fundamental Research*, 2012, no. 1, pp. 172-178. (In Russ.)]

7. Amara U., Flierl M.A., Rittirsch D., Klos A., Chen H., Acker B., Brückner U.B., Nilsson B., Gebhard F., Lambris J.D., Huber-Lang M. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 9, pp. 5628-5636.

8. Gupta S., Aggarwal S., Heads C. Dysregulated immune system in children with autism: Beneficial effects of intravenous immune globulin on autistic characteristics. *J. Autism Dev. Disord.*, 1996, Vol. 26, no. 4, pp. 439-452.

9. Momeni N., Brudin L., Behnia F., Nordstrom B., Yosefi-Oudarji A., Sivberg B., Joghataei M.T., Persson B.L. High complement factor I activity in the plasma of children with autism spectrum disorders. *Autism Res. Treat.*, 2012, 868576, 6 p. doi: 10.1155/2012/868576.

10. Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., Lambris J.D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 9, pp. 785-797.

11. Stephan A.H., Barres B.A., Stevens B. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2012, no. 35, pp. 369-389.

12. Torrente F., Ashwood P., Day R., Machado N., Furlano R.I., Anthony A., Davies S.E., Wakefield A.J., Thomson M.A., Walker-Smith J.A., Murch S.H. Small intestinal enteropathy with epithelial IgG and complement deposition in children with regressive autism. *Mol. Psychiatry*, 2002, no. 7, pp. 375-382.

Авторы:

Черемных Е.Г. — к.т.н., старший научный сотрудник лаборатории биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» Российской академии наук, Москва, Россия

Иванов П.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» Российской академии наук, Москва, Россия

Фактор М.И. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Cheremnykh E.G., PhD (Technical Sciences), Senior Research Associate, Laboratory of Biochemistry, Mental Health Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Ivanov P.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Neuroimmunology Mental Health Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Faktor M.I., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Biochemistry, Mental Health Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Чикина Е.Ю. — лаборант-исследователь лаборатории патофизиологии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» Российской академии наук, Москва, Россия

Никитина С.Г. — младший научный сотрудник отделения детской психиатрии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» Российской академии наук, Москва, Россия

Симашкова Н.В. — д.м.н., профессор, заведующая отделом детской психиатрии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» Российской академии наук, Москва, Россия

Брусов О.С. — к.б.н., заведующий лабораторией биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» Российской академии наук, Москва, Россия

Chikina E.Yu., Research Laboratory Assistant, Laboratory of Pathophysiology, Mental Health Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Nikitina S.G., Junior Research Associate, Department of Pediatric Psychiatry, Mental Health Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Simashkova N.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pediatric Psychiatry, Mental Health Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Brusov O.S., PhD (Biology), Head, Laboratory of Biochemistry, Mental Health Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 18.06.2018

Отправлена на доработку 22.06.2018

Принята к печати 02.07.2018

Received 18.06.2018

Revision received 22.06.2018

Accepted 02.07.2018

ВЫЯВЛЕНИЕ АУТОАНТИТЕЛ, РАСПОЗНАЮЩИХ РАКОВО-СЕТЧАТОЧНЫЙ АНТИГЕН РЕКОВЕРИН, В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НЕИНВАЗИВНЫМИ ФОЛЛИКУЛЯРНЫМИ ОПУХОЛЯМИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ЯДРАМИ ПАПИЛЛЯРНОГО ТИПА (NIFTP)

**Белоусов П.В.¹, Бобровская Я.И.³, Боголюбова А.В.^{1,3},
Сазыкин А.Ю.³, Шебзухов Ю.В.³, Шварц А.М.¹, Ланцаков К.В.⁴,
Ванушко В.Э.⁵, Купраш Д.В.^{1,3}, Абросимов А.Ю.^{2,5}**

¹ ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГАУ ВПО «Национальный исследовательский технологический университет „МИСиС“», Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁴ ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

⁵ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Циркулирующие аутоантитела, распознающие раково-сетчаточный аутоантиген рековерин (RCVRN-АутоАТ), являются высокоспецифичными биомаркерами раково-ассоциированной ретинопатии; в то же время они также могут выявляться у значительного числа пациентов с опухолями некоторых локализаций, не сопровождающимися возникновением ретинопатии. В настоящем исследовании при помощи дот-блот иммуноферментного анализа и Вестерн-блот анализа циркулирующие RCVRN-АутоАТ были выявлены у 4/7 (57%) пациентов с опухолями щитовидной железы (ЩЖ), принадлежащими к недавно выделенным в отдельную диагностическую категорию неинвазивным фолликулярным опухолям ЩЖ с ядрами папиллярного типа (NIFTP); при этом в других исследованных группах опухолей ЩЖ частота встречаемости RCVRN-АутоАТ была низкой (фолликулярные аденомы — 0/15, классический и фолликулярный варианты папиллярного рака — 1/20 (5%) и 1/15 (7%) соответственно) и значимо не отличалась от таковой в группе здоровых индивидов (0/15). Полученные нами данные позволяют рассматривать циркулирующие RCVRN-АутоАТ как потенциальный

Адрес для переписки:

Боголюбова Аполлинария Васильевна
ФГБУН «Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.
Тел.: 8 (499) 135-99-64.
Факс: 8 (499) 135-14-05.
E-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com

Address for correspondence:

Bogolyubova Apollinariya V.
V. Engelhardt Institute of Molecular Biology
119991, Russian Federation, Moscow, Vavilov str., 32.
Phone: 7 (499) 135-99-64.
Fax: 7 (499) 135-14-05.
E-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com

Образец цитирования:

П.В. Белоусов, Я.И. Бобровская, А.В. Боголюбова, А.Ю. Сазыкин, Ю.В. Шебзухов, А.М. Шварц, К.В. Ланцаков, В.Э. Ванушко, Д.В. Купраш, А.Ю. Абросимов «Выявление аутоантител, распознающих раково-сетчаточный антиген рековерин, в крови пациентов с неинвазивными фолликулярными опухолями щитовидной железы с ядрами папиллярного типа (NIFTP)» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 781-788.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-781-788
© Белоусов П.В. и соавт., 2019

For citation:

P.V. Belousov, Ya.I. Bobrovskaya, A.V. Bogolyubova, A.Yu. Sazykin, Yu.V. Shebzukhov, A.M. Schwartz, K.V. Lanshchakov, V.E. Vanushko, D.V. Kuprash, A.Yu. Abrosimov "Detection of autoantibodies recognizing cancer-retina antigen recoverin in blood of patients with non-invasive follicular thyroid neoplasms with papillary-like nuclear features (NIFTP)", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 781-788.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-781-788
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-781-788

биомаркер NIFTP, позволяющий дифференцировать эти опухоли от других опухолевых поражений ЩЖ.

Ключевые слова: рековерин, аутоантитела, раково-сетчаточный антиген, неинвазивные фолликулярные опухоли щитовидной железы с ядрами папиллярного типа, щитовидная железа, рак щитовидной железы

DETECTION OF AUTOANTIBODIES RECOGNIZING CANCER-RETINA ANTIGEN RECOVERIN IN BLOOD OF PATIENTS WITH NON-INVASIVE FOLLICULAR THYROID NEOPLASMS WITH PAPILLARY-LIKE NUCLEAR FEATURES (NIFTP)

Belousov P.V.^a, Bobrovskaya Ya.I.^c, Bogolyubova A.V.^{a,b}, Sazykin A.Yu.^c, Shebzukhov Yu.V.^c, Schwartz A.M.^a, Lanshchakov K.V.^d, Vanushko V.E.^e, Kuprash D.V.^{a,c}, Abrosimov A.Yu.^{b,e}

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

^c Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^d Central Clinical Hospital of the Russian Presidential Administration, Moscow, Russian Federation

^e National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Autoantibodies recognizing the cancer-retina autoantigen called recoverin (RCVRN-AutoAb) may serve as a highly specific biomarker of cancer-associated retinopathy. However, they may also be found in some cancer patients without clinical evidence of retinopathy. In the present study, dot-ELISA and Western blot assays were used to demonstrate the presence of circulating RCVRN-AutoAb in 4/7 (57%) of patients with recently recognized pathological entity, non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP); other thyroid tumors represented by follicular adenomas, and classical and follicular variants of papillary thyroid carcinomas, demonstrated low frequencies of RCVRN-AutoAb (0/15, 1/20 (5%) and 1/15 (7%), respectively), with no significant differences from healthy individuals (0/15). Our data implicate the circulating RCVRN-AutoAb as a potential biomarker of NIFTP capable of discrimination of this novel pathological entity from other thyroid tumors.

Keywords: recoverin, autoantibodies, cancer-retina antigen, non-invasive follicular-patterned tumor with papillary-like nuclear features, thyroid, thyroid cancer

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 16-15-10423).

Введение

Рековерин (RCVRN) представляет собой Ca^{2+} -связывающий белок, в норме экспрессирующийся исключительно фоторецепторными клетками сетчатки глаза и отвечающий за Ca^{2+} -зависимую регуляцию десенситизации фотоактивированного родопсина [5, 10]. Аберрантная экспрессия рековерина опухолевыми клетками за пределами гематоретинального барьера является ключевым событием в патогенезе паранеопластического аутоиммунного синдрома — раково-ассоциированной ретинопатии (cancer-associated retinopathy, CAR), чаще всего выявляемой у пациентов с мелкоклеточным раком легкого [3]. Циркулирующие рековерин-распознающие аутоантитела

(RCVRN-АутоАТ) являются высокоспецифичным маркером паранеопластической этиологии при ретинопатии неясного генеза. Вместе с тем такие аутоантитела также выявляются у значительного числа пациентов с карциномами легких и некоторых других опухолей, не демонстрирующих клинических признаков ретинопатии, что позволяет рассматривать их как биомаркер соответствующих опухолей в более широком контексте, нежели редкие случаи CAR [11].

В представленном исследовании, с использованием дот-блот и Вестерн-блот гибридизации сывороток пациентов с рекомбинантным рековерином, мы продемонстрировали наличие циркулирующих RCVRN-АутоАТ в значительном проценте (4/7, 57%) пациентов с неинвазивными фолликулярными опухолями щитовидной железы с ядрами папиллярного типа (non-invasive

follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features, NIFTP) – нового класса опухолей щитовидной железы (ЩЖ), занимающих промежуточное положение между доброкачественными фолликулярными аденомами (ФАЩЖ) и злокачественными опухолями ЩЖ [1, 7, 9]. При этом частоты встречаемости RCVRN-АутоАТ при других опухолевых поражениях ЩЖ (классический (1/20, 5%) и фолликулярный (1/15, 7%) варианты папиллярного рака, а также фолликулярные аденомы (0/15)) значимо не отличались от таковой в группе здоровых индивидов (0/15). Полученные нами данные позволяют рассматривать RCVRN-АутоАТ как перспективный биомаркер NIFTP, потенциально применимый для предоперационной дифференциальной диагностики новообразований ЩЖ в случае «неопределенных» заключений по результатам тонкоигольной пункционной биопсии.

Материалы и методы

В исследование были включены пациенты, прооперированные в 2008–2009 годах в Эндокринологическом научном центре (в настоящее время – ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России) по поводу узловых образований щитовидной железы, у которых по данным гистологического исследования послеоперационного материала был установлен один из следующих диагнозов: фолликулярная аденома щитовидной железы (ФАЩЖ), классический вариант папиллярного рака ЩЖ (кПРЩЖ) и фолликулярный вариант папиллярного рака ЩЖ (ФВ-ПРЩЖ). В дальнейшем часть опухолей в группах ФАЩЖ и ФВ-ПРЩЖ была реклассифицирована с учетом новых диагностических критериев как «неинвазивные фолликулярные опухоли с ядрами папиллярного типа» (NIFTP) [1, 7, 9]. Все пациенты подписывали информированное согласие на использование их биологического материала в исследовательских целях.

Для получения рекомбинантного RCVRN тотальную мРНК человеческих семенников обратно транскрибировали с использованием олиго(dT)-праймера, и полноразмерную кодирующую последовательность гена RCVRN амплифицировали при помощи ПЦР с праймерами 5'-ATACAATTG CATGGGGAACAGCAAAAGT GG-3' (прямой праймер, жирным шрифтом выделен сайт рестрикции MfeI) и СТАCTCGAGTCA GGCGTTCTTCATCTTTTCCT (обратный праймер, жирным шрифтом выделен сайт рестрикции XhoI). Кодирующую последовательность RCVRN клонировали в вектор pET-28b (Novagen) по сайтам EcoRI/XhoI. Рекомбинантный белок получали в штамме *E. coli* BL21(DE3) после 12-часовой

индукции изопропил-β-тиогалактопиранозидом (IPTG) в конечной концентрации 5 мМ. Очищенный препарат рекомбинантного RCVRN получали из телец включения при помощи металлохелатной аффинной хроматографии (BioScale Mini Profinity IMAC column (Bio-Rad)) в денатурирующих условиях согласно протоколу производителя.

Для выполнения дот-блот ИФА препарат белка в растворе, содержащем 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Tris-HCl; pH 8,0 и 8М мочевины, наносили на нитроцеллюлозную мембрану (0,5–1 мкг белка на точку в объеме 1 мкл) и высушивали. Мембраны уравнивали в буфере TBST (Tris-HCl 0,01М pH 8,0, NaCl 0,15М, Tween-20 0,05 % (v/v)) и инкубировали при комнатной температуре на орбитальном шейкере в блокирующем растворе 5% обезжиренного сухого молока в TBST в течение 1 часа. Далее каждую мембрану на протяжении ночи инкубировали при +4 °С с индивидуальной сывороткой, преинкубированной с осветленным клеточным лизатом штамма *E. coli* BL-21(DE3) (2 мг/мл) и разведенной в блокирующем буфере в отношении 1/300. Мембраны промывали в трех сменах TBST по 15 мин и инкубировали при комнатной температуре на орбитальном шейкере в течение 1 часа со взятыми в разведении 1/3000 вторичными антителами к Fcγ-фрагментам человеческих иммуноглобулинов, конъюгированными с щелочной фосфатазой (Jackson ImmunoResearch). После конечной отмывки мембран 3 раза по 15 минут в TBST, выявление гибридационного сигнала проводили при помощи хромогенной реакции с использованием нитросинего тетразолия (NBT) и 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата (NBT/BCIP, Sigma-Aldrich).

Для выполнения Вестерн-блот анализа препарат рекомбинантного рековерина (500 нг на дорожку) электрофоретически разделяли в 10% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по стандартной методике. После окончания электрофореза гель уравнивали в буфере для переноса (47,9 мМ Tris-base, 38,6 мМ глицина, 0,04% (w/v) додецилсульфата натрия, 20% (v/v) этанола), после чего выполняли электроблоттинг стандартным полусухим методом. Блокировка, гибридизация с сыворотками пациентов и вторичными антителами проводилась по протоколу, аналогичному вышеописанному для дот-блот ИФА с нижеследующими модификациями: разведение сыворотки 1/1200, вторичные антитела – анти-Fcγ человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Thermo Scientific Pierce), разведение вторичных антител – 1/10 000. Детекцию иммунохимического сигнала проводили с помощью набора Pierce SuperSignal West Pico

Chemiluminescent Substrate. Хемилюминесценцию фиксировали на синечувствительной пленке для общей рентгенологии KODAK MXB Medical X-Ray Film.

Результаты и обсуждение

Ранее для выявления потенциальных аутоантителных биомаркеров для дифференциальной диагностики высокодифференцированных опухолей ЩЖ нами был применен подход, основанный на одновременной детекции аутоантител ко множеству кандидатных аутоантигенов (в том числе рековерину) с помощью гибридизации с рекомбинантными антигенами в точке на носителе (дот-блот ИФА) [2]. В когорте из 42 пациентов RCVRN-АутоАТ в титре $\geq 1/300$ были выявлены у трех (7%) пациентов, опухоли которых были изначально диагностированы как кПРЩЖ (1/19, 5%) и ФАЩЖ (2/14, 14%) (рис. 1), что, очевидно, не удовлетворяло критериям дифференциально-диагностического биомаркера.

Вместе с тем пересмотр изначальных диагнозов с использованием неконсервативных критериев злокачественности [4] и новых диагностических критериев ВОЗ 2017 года [1, 7, 9] привел к реклассификации значительного числа опухолей, изначально диагностированных как ФАЩЖ или ФВ-ПРЩЖ, однако в настоящее время выделяемых в отдельную группу «неинвазивных

фолликулярных опухолей с ядрами папиллярного типа» (non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features, NIFTP) (см. ниже); среди реклассифицированных таким образом опухолей оказались опухоли двух из трех пациентов, у которых были выявлены RCVRN-АутоАТ (рис. 1).

С учетом этих данных, мы предположили, что RCVRN-АутоАТ могут служить специфичным биомаркером опухолей новой диагностической категории NIFTP. Для проверки данной гипотезы мы исследовали сывороточную реактивность против рекомбинантного RCVRN в расширенной когорте пациентов ($n = 57$, табл. 1) с различными опухолями ЩЖ с использованием Вестерн-блот – анализа (рис. 1 и табл. 1). В результате проведенного анализа, RCVRN-АутоАТ в титре $\geq 1/1200$ были выявлены у 1/20 (5%) пациентов с кПРЩЖ, 1/15 (7%) пациентов с ФВ-ПРЩЖ и ни у одного из 15 пациентов с ФАЩЖ (табл. 1). Следует отметить, что низкая частота встречаемости RCVRN-АутоАТ у пациентов с кПРЩЖ соответствует опубликованным данным Savchenko с соавт. [11], не обнаруживших RCVRN-АутоАТ ни в одном из 12 проанализированных случаев ПРЩЖ. В то же время в подгруппе из семи пациентов с NIFTP, RCVRN-АутоАТ были выявлены у четырех (57%) (рис. 1 и табл. 1); различия в частотах встречаемости анти-RCVRN аутоантител между группой NIFTP и другими ис-

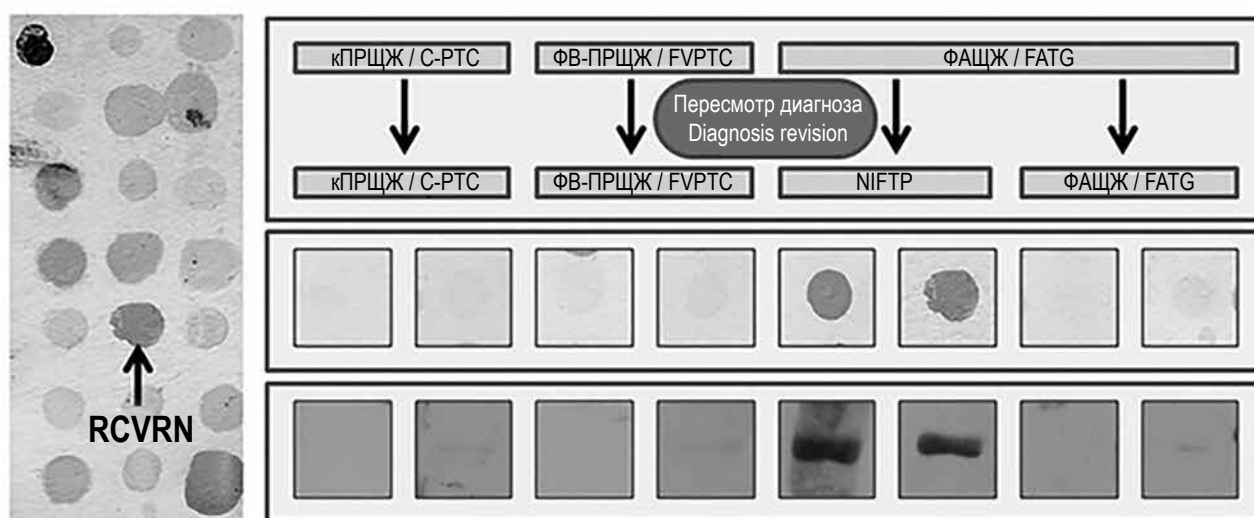


Рисунок 1. Выявление RCVRN-АутоАТ у пациентов с NIFTP

Примечание. Слева – дот-блот ИФА с кандидатными опухолевыми аутоантигенами, положительный гибридационный сигнал RCVRN-АутоАТ отмечен стрелкой; справа сверху – изначальные и пересмотренные диагнозы некоторых пациентов; справа посередине и внизу – репрезентативные гибридационные сигналы RCVRN-АутоАТ в дот-блот ИФА (разведение сыворотки 1/300) и Вестерн-блот анализе (разведение сыворотки 1/1200) соответственно.

Figure 1. Detection of RCVRN-AutoAb in NIFTP patients

Note. Left, dot-blot ELISA with candidate tumor autoantigens, the positive RCVRN-AutoAb hybridization signal is marked with arrow; upper right, initial and revised diagnoses in some patients; middle and lower right, representative RCVRN-AutoAb hybridization signals in dot-blot ELISA (serum dilution 1/300) and WB analysis (serum dilution 1/1200), respectively.

следованными группами пациентов оказались статистически значимыми ($p < 0,05$ во всех парных сравнениях, табл. 1).

На протяжении длительного времени обнаружение в гистологическом материале удаленной опухоли характерных ядерных изменений (продольные борозды, ядерные псевдовключения, полиморфизм размера и формы ядер и др.) являлось необходимым и достаточным критерием установления диагноза ПРЩЖ, при этом опухоли преимущественно либо исключительно фолликулярного строения трактовались как ФВ-ПРЩЖ. Фактически для инкапсулированных опухолей фолликулярного строения без гистологических признаков инвазивного роста обнаружение соответствующих ядерных изменений являлось единственным критерием, отличающим доброкачественную ФАЩЖ от злокачественного ФВ-ПРЩЖ.

Вместе с тем постепенно накапливались данные о том, что хирургическое удаление неинвазивных форм ФВ-ПРЩЖ приводит к полному излечению даже при минимальном допустимом

объеме хирургического вмешательства (лобэктомия/гемитиреоидэктомия) и без проведения послеоперационной радиойодтерапии [9]. В конечном счете это привело к переводу этих опухолей из категории «категорично злокачественных» в категорию «опухоли с низкой степенью злокачественности» (low-grade) с введением новой диагностической категории «неинвазивных фолликулярных опухолей с ядрами папиллярного типа» (NIFTP) [1, 7, 9]. Несмотря на то что текущие стандарты лечения NIFTP соответствуют таковым для доброкачественных опухолей ЩЖ, большинство авторов рассматривает данные опухоли как пограничные между доброкачественными и злокачественными поражениями ЩЖ [1].

Таким образом, с учетом новизны данной диагностической категории, принципиально пограничной природы соответствующих опухолей, а также предсказуемо высокой степени пересечения патоморфологических и молекулярных особенностей ФАЩЖ, ФВ-ПРЩЖ и NIFTP, биомаркеры, способные дифференцировать NIFTP и родственные ей опухоли, представляют несо-

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ДОТ-БЛОТ ИФА И ВЕСТЕРН-БЛОТ АНАЛИЗА НА НАЛИЧИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ RCVRN-АутоАТ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ОПУХОЛЕВЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ ЩЖ И ЗДОРОВЫХ ИНДИВИДОВ

TABLE 1. RESULTS OF DOT-BLOT ELISA AND WESTERN-BLOT ANALYSIS FOR THE PRESENCE OF CIRCULATING RCVRN-AutoAb IN PATIENTS WITH VARIOUS THYROID NEOPLASMS AND HEALTHY VOLUNTEERS

Частоты встречаемости RCVRN-АутоАТ у пациентов с опухолевыми поражениями ЩЖ Frequencies of RCVRN-AutoAb in patients with thyroid neoplasms					
	кПРЩЖ cPTC	ФВ-ПРЩЖ FVPTC	NIFTP	ФАЩЖ FTA	Контроль Control
RCVRN-АутоАТ RCVRN-AutoAb	1/20 (5%)	1/15 (7%)	4/7 (57%)	0/15	0/15
Статистический анализ различий в частотах встречаемости RCVRN-АутоАТ между группами пациентов с опухолевыми поражениями ЩЖ (p-уровень по критерию точной вероятности Фишера) Statistical analysis of differences between frequencies of RCVRN-AutoAb between groups of patients with thyroid neoplasms (p-value for Fisher's exact test)					
	кПРЩЖ cPTC	ФВ-ПРЩЖ FVPTC	NIFTP	ФАЩЖ FTA	Контроль Control
кПРЩЖ cPTC		1	0,0089	0,44	1
ФВ-ПРЩЖ FVPTC			0,021	1	1
NIFTP				0,0048	0,0048
ФАЩЖ FTA					1
Контроль Control					

Примечание. кПРЩЖ – классический вариант папиллярного рака щитовидной железы; ФВ-ПРЩЖ – фолликулярный вариант папиллярного рака щитовидной железы; NIFTP – неинвазивная фолликулярная опухоль щитовидной железы с ядрами папиллярного типа; ФАЩЖ – фолликулярная аденома щитовидной железы.

Note. cPTC, classical papillary thyroid cancer; FVPTC, follicular variant of papillary thyroid cancer; NIFTP, non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features; FTA, follicular thyroid adenoma.

мненную ценность. В этом контексте полученные нами данные позволяют рассматривать RCVRN-АутоАТ как перспективный класс-специфичный биомаркер NIFTP, потенциально применимый для предоперационной дифференциальной диагностики новообразований ЩЖ в случае «неопределенных» заключений тонкоигольной пункционной биопсии.

Традиционно экспрессию реоверина и возникновение аутоиммунного ответа на этот аутоантиген связывают с очевидно злокачественными опухолями, преимущественно раком легкого. В то же время описаны единичные случаи возникновения CAR с RCVRN-АутоАТ и при доброкачественных новообразованиях различных локализаций [8, 12]. Недавний анализ экспрессии реоверина в опухолях почки продемонстрировал ее наличие в 11/12 (92%) случаев доброкачественных онкоцитом почки, однако сывороточные RCVRN-АутоАТ не были обнаружены ни в одном из проанализированных случаев [6]. В нашем исследовании наличие RCVRN-АутоАТ специфично маркировало NIFTP – группу опухолей с пограничной степенью злокачественности [1]. Таким образом, вышеописанные данные позволяют сделать вывод о том, что экспрессия и иммуногенность реоверина не являются эксклюзивными характеристиками злокачественных опухолей и в зависимости от тканевого контекста могут иметь место в опухолях, лежащих

в любой части спектра от полностью доброкачественных до высокозлокачественных. Альтернативной гипотезой появления циркулирующих RCVRN-АутоАТ при NIFTP может быть кросс-реактивность с эпитопами других нейрональных белков, гомологичных реоверину (гиппокальцин HPCA, гиппокальцин-подобные белки HPCAL1, VSNL1 и HPCAL4, нейрокальцин NCALD). Дальнейший детальный анализ экспрессии реоверина и его гомологов в тканях NIFTP и других опухолей ЩЖ, а также эпитопной специфичности RCVRN-АутоАТ у пациентов с NIFTP позволит более детально изучить иммунобиологические аспекты обнаруженного феномена, а также перспективы диагностического применения RCVRN-АутоАТ для дифференциальной диагностики опухолевых поражений ЩЖ.

Благодарности

Авторы благодарят заведующего кафедрой иммунологии биологического факультета МГУ, отделом молекулярной иммунологии НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского и лабораторией молекулярной иммунологии ИМБ имени В.А. Энгельгардта РАН, академика РАН, доктора биологических наук, профессора С.А. Недоспасова за ценные замечания в процессе подготовки рукописи.

Список литературы / References

1. Абросимов А.Ю. Инкапсулированные фолликулярные опухоли щитовидной железы неопределенного злокачественного потенциала в новой международной гистологической классификации // Клиническая и экспериментальная тиреоидология, 2018. Т. 13, № 4. С. 9-15. [Abrosimov A.Yu. Encapsulated follicular thyroid tumors of uncertain malignant potential in the new international histological classification. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya tireoidologiya = Clinical and Experimental Thyroidology*, 2018, Vol. 13, no. 4, pp. 9-15. (In Russ.)]
2. Ланщачков К.В., Белоусов П.В., Ванушко В.Э., Абросимов А.Ю., Купраш Д.В., Кузнецов Н.С. Аутоантительные биомаркеры в дифференциальной диагностике фолликулярных опухолей щитовидной железы // Эндокринная хирургия, 2012. Т. 2. С. 15-20. [Lanshchakov K.V., Belousov P.V., Vanushko V.E., Abrosimov A.Yu., Kuprash D.V., Kuznetsov N.S. Autoantibody profiling of benign and malignant thyroid tumors and design of a prototype diagnostic array. *Endokrinnyaya khirurgiya = Endocrine Surgery*, 2012, Vol. 2, pp. 15-20. (In Russ.)]
3. Bazhin A.V., Schadendorf D., Philippov P.P., Eichmüller S.B. Recoverin as a cancer-retina antigen. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2007, Vol. 56, no. 1, pp. 110-116.
4. Belousov P.V., Bogolyubova A.V., Kim Y.S., Abrosimov A.Y., Kopylov A.T., Tvardovskiy A.A., Lanshchakov K.V., Sazykin A.Y., Dvinskikh N.Y., Bobrovskaya Y.I., Selivanova L.S., Shilov E.S., Schwartz A.M., Shebzukhov Y.V., Severskaia N.V., Vanushko V.E., Moshkovskii S.A., Nedospasov S.A., Kuprash D.V. Serum immunoproteomics combined with pathological reassessment of surgical specimens identifies TCP-1ζ autoantibody as a potential biomarker in thyroid neoplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2015, Vol. 100, no. 9, pp. E1206-E1215.
5. Dizhoor A.M., Ray S., Kumar S., Niemi G., Spencer M., Brolley D., Walsh K.A., Philipov P.P., Hurley J.B., Stryer L. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science*, 1991, Vol. 251, no. 4996, pp. 915-918.
6. Golovastova M.O., Tsoy L.V., Bocharnikova A.V., Korolev D.O., Gancharova O.S., Alekseeva E.A., Kuznetsova E.B., Savvateeva L.V., Skorikova E.E., Strelnikov V.V., Varshavsky V.A., Vinarov A.Z., Nikolenko V.N., Glybochko P.V., Zernii E.Y., Zamyatnin A.A. Jr, Bazhin A.V., Philippov P.P. The cancer-retina antigen recoverin as a potential biomarker for renal tumors. *Tumour Biol.*, 2016, Vol. 37, no. 7, pp. 9899-9907.
7. Lloyd R.V., Osamura R.Y., Klöppel G., Rosai J. WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2017.

8. Machida S., Ohguro H., Ishida K., Suzuki M., Kawagishi K. Recoverin-associated retinopathy secondary to Warthin tumor of parotid gland. *Doc. Ophthalmol.*, 2014, Vol. 129, no. 2, pp. 123-128.
9. Nikiforov Y.E., Seethala R.R., Tallini G., Baloch Z.W., Basolo F., Thompson L.D.R., Barletta J.A., Wenig B.M., Al Ghuzlan A., Kakudo K., Giordano T.J., Alves V.A., Khanafshar E., Asa S.L., El-Naggar A.K., Gooding W.E., Hodak S.P., Lloyd R.V., Maytal G., Mete O., Nikiforova M.N., Nosé V., Papotti M., Poller D.N., Sadow P.M., Tischler A.S., Tuttle R.M., Wall K.B., LiVolsi V.A., Randolph G.W., Ghossein R.A. Nomenclature revision for encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma: A paradigm shift to reduce overtreatment of indolent tumors. *JAMA Oncol.*, 2016, Vol. 2, no. 8, pp. 1023-1029.
10. Philippov P.P., Zernii E.Y. Recoverin. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. New York: Springer New York, 2016, pp. 1-9.
11. Savchenko M.S., Goncharskaia M.A., Skorikova E.E., Eichmüller S.B., Kushlinsky N.E., Bazhin A.V., Philippov P.P. Autoantibodies against the Ca(2+)-binding protein recoverin in blood sera of patients with various oncological diseases. *Oncol. Lett.*, 2012, Vol. 3, no. 2, pp. 377-382.
12. Tanaka A., Takase H., Adamus G., Mochizuki M. Cancer-associated retinopathy caused by benign thymoma. *Br. J. Ophthalmol.*, 2010, Vol. 94, no. 4, pp. 526-528.

Авторы:

Белоусов П.В. — младший научный сотрудник лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Бобровская Я.И. — лаборант кафедры иммунологии биологического факультета ГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Боголюбова А.В. — младший научный сотрудник лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук; кафедра иммунологии биологического факультета ГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Сазыкин А.Ю. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной иммунологии НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Шебзухов Ю.В. — к.б.н., научный сотрудник отдела молекулярной иммунологии НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Authors:

Belousov P.V., Junior Research Associate, Laboratory of Intracellular Signaling in Health and Disease, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Bobrovskaya Ya.I., Laboratory Assistant, Immunology Department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Bogolyubova A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Intracellular Signaling in Health and Disease, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Immunology Department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Sazykin A.Yu., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Molecular Immunology, A. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Shebzukhov Yu.V., PhD (Biology), Research Associate, Department of Molecular Immunology, A. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Шварц А.М. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Ланицаков К.В. — хирург отдела хирургии ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

Ванушко В.Э. — д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела хирургии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Купраш Д.В. — д.б.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий лабораторией передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук; кафедра иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Абросимов А.Ю. — д.м.н., профессор, заведующий отделом фундаментальной патоморфологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ; лаборатория «Физические методы, акустооптическая и лазерная аппаратура для задач диагностики и терапии онкологических заболеваний» ФГАУ ВПО «Национальный исследовательский технологический университет „МИСиС“», Москва, Россия

Schwartz A.M., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Intracellular Signaling in Health and Disease, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russian Federation

Lanshchakov K.V., Surgeon, Department of Surgery, Central Clinical Hospital of the Russian Presidential Administration, Moscow, Russian Federation

Vanushko V.E., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Surgery, National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Kuprash D.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Intracellular Signaling in Health and Disease, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Immunology Department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abrosimov A.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Basic Pathology, National Medical Research Center for Endocrinology; Laboratory “Physical Methods, Acousto-Optical and Laser Devices for Diagnosis and Therapy of Oncological Diseases”, National University of Science and Technology “MISIS”, Moscow, Russian Federation

Поступила 28.11.2018
Принята к печати 07.12.2018

Received 28.11.2018
Accepted 07.12.2018

ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ НА ЛПС-ИНДУЦИРОВАННУЮ СЕКРЕЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Серов Д.А.¹, Кабанов Д.С.¹, Косякова Н.И.², Прохоренко И.Р.¹

¹ ФГБУН «Институт фундаментальных проблем биологии РАН», г. Пущино, Московская обл., Россия

² ФГАУЗ «Больница Пущинского научного центра РАН», г. Пущино, Московская обл., Россия

Резюме. Среди хронических воспалительных заболеваний респираторного тракта бронхиальная астма (БА) является одним из самых распространенных в мире. Поскольку БА индуцирует системный воспалительный процесс, необходимо всестороннее исследование влияния этого заболевания и его терапии на функциональное состояние организма и иммунной системы крови в частности. В фазе обострения БА клетки респираторного тракта пациентов могут усиливать секрецию не только провоспалительных, но и противовоспалительных медиаторов, последние из которых способны подавлять активность клеток иммунной системы крови. В настоящей работе была проведена оценка влияния терапии БА на выраженность воспаления и функциональное состояние клеток иммунитета периферической крови. Тестом функциональной активности иммунных клеток крови служила липополисахарид (ЛПС)-индуцированная секреция цитокинов *ex vivo*. ЛПС является классическим провоспалительным агентом бактериальной природы. Нами исследованы ответы клеток крови пациентов с верифицированным диагнозом БА до начала лечения и через две недели базисной противовоспалительной терапии. По клиническим показателям пациентам была назначена терапия комбинацией ингаляционных глюкокортикостероидов и агонистов β -адренорецепторов или антилейкотриеновый препарат (монтелукаст). Параллельно были исследованы ответы клеток крови условно здоровых добровольцев на ЛПС. Секрецию TNF α , IL-6, IL-8 клетками крови оценивали после экспозиции с ЛПС (100 нг/мл) в течение 6 ч, IFN γ , IL-17A, IL-1 β – 24 ч. Параллельно оценивали секрецию цитокинов клетками крови, не стимулированными ЛПС. Проведен контроль уровней IL-4 в плазме крови пациентов и условно здоровых добровольцев. Концентрации цитокинов определяли методом ИФА. Показано, что через две недели терапии у пациентов уменьшалась фоновая секреция IL-6 клетками крови, что может указывать на снижение выраженности воспаления. Терапия не оказывала влияния на фоновую и ЛПС-индуцированную секрецию IL-1 β , IL-1 α , IFN γ и IL-8 клетками пациентов с БА. В течение 2-недельной терапии концентрация IL-4 в плазме крови пациентов не изменялась. Клетки крови пациентов с БА секретировали значительно меньше TNF α и IL-8 в контроле и после стимуляции ЛПС, чем клетки условно здоровых добровольцев, что подтверждает предположение о частичном угнетении активности иммунных клеток крови при БА. Через две недели терапии наблюдалось увеличение ЛПС-индуцированной секреции TNF α клетками крови пациентов. С целью определения механизма усиления ЛПС-индуцированной секреции TNF α была оценена фоновая секреция растворимой формы рецептора CD14 (sCD14) в крови пациентов с БА до терапии и через две недели после терапии. Показано, что после терапии БА в крови пациентов не происходит увеличения концентрации sCD14. Полученные результаты указывают на sCD14-независимый механизм усиления ЛПС-

Адрес для переписки:

Серов Дмитрий Александрович
ФГБУН «Институт фундаментальных проблем
биологии РАН»
142290, Россия, Московская обл., г. Пущино,
ул. Институтская, 2.
Тел.: 8 (985) 319-03-21.
Факс: 8 (4967) 33-05-32.
E-mail: dmitriy_serov_91@mail.ru

Address for correspondence:

Serov Dmitry A.
Institute of Fundamental Problems of Biology
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino,
Institutskaya str., 2.
Phone: 7 (985) 319-03-21.
Fax: 7 (4967) 33-05-32.
E-mail: dmitriy_serov_91@mail.ru

Образец цитирования:

Д.А. Серов, Д.С. Кабанов., Н.И. Косякова,
И.Р. Прохоренко «Влияние терапии на ЛПС-
индуцированную секрецию цитокинов клетками
врожденного иммунитета крови пациентов
с бронхиальной астмой» // Медицинская иммунология,
2019. Т. 21, № 4. С. 789–796.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-789-796

© Серов Д.А. и соавт., 2019

For citation:

D.A. Serov, D.S. Kabanov, N.I. Kosyakova., I.R. Prokhorenko
“Influence of therapy upon LPS-induced cytokine secretion
by the blood-derived innate immunity cells of the bronchial
asthma patients”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4,
pp. 789–796. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-789-796

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-789-796

индуцированной секреции TNF α . Базисная противовоспалительная терапия не только снижает концентрацию IL-6 в крови, но частично восстанавливает активность клеток врожденного иммунитета крови пациентов с БА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, врожденный иммунитет, лейкоциты крови человека, липополисахариды, продукция цитокинов

INFLUENCE OF THERAPY UPON LPS-INDUCED CYTOKINE SECRETION BY THE BLOOD-DERIVED INNATE IMMUNITY CELLS OF THE BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS

Serov D.A.^a, Kabanov D.S.^a, Kosyakova N.I.^b, Prokhorenko I.R.^a

^a Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

^b Clinical Hospital at the Pushchino Research Center, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Abstract. Bronchial asthma (BA) is the most widespread chronic inflammatory disease. Since BA is associated with a systemic inflammation state, a comprehensive study of its effect in this disease, and influence of pathogenetic therapy should be performed, by studying the whole blood cytokine status of the patients suffering with BA. The cells from respiratory tract in acute-phase BA patients may produce pro-, as well as anti-inflammatory mediators. The anti-inflammatory mediators are able to suppress activity of immune cells in peripheral blood. Thus, the aim of present study was to evaluate eventual inflammation-associated and functional activity of immune cells from the patients' peripheral blood in BA and following appropriate therapy. Bacterial lipopolysaccharide (LPS) a classical pro-inflammatory agent. We have studied an LPS-induced cytokine-induced *ex vivo* secretion model by peripheral blood immune cells, as a relevant test for their functional activity. The LPS-induced responses of whole blood cells from patients with proven BA diagnosis have been studied at pre-treatment time points, and following two weeks of basic anti-inflammatory therapy. According to clinical indications, the antagonists of CysLTR1, or combinations of glucocorticosteroids and β -adrenoreceptor agonists were administered by inhalation to BA patients. LPS-induced production of TNF α , IL-6, IL-8 (at 6 h) and IFN γ , IL-17A or IL-1 β (at 24 h) by whole blood cells from BA patients or healthy volunteers has been assessed by ELISA technique. The cytokine production from non-stimulated whole blood cells from BA patients and healthy volunteers were used as the baseline control. IL-4 concentrations in plasma of BA patients and healthy volunteers were also measured. We have shown a decrease of IL-6 production in control blood samples from BA patients after two weeks of therapy. This may indicate the attenuation of the observed inflammatory process. The therapy applied did not influence the background levels and LPS-induced secretion of IL-1 β , IL-1ra, IFN γ , and IL-8 in whole blood samples from BA patients. IL-4 plasma levels in BA patients were not changed after two weeks of therapy. It has been shown that whole blood from BA patients produced less TNF α and IL-8, both in control samples, and during their response to LPS, than the values obtained in healthy volunteers. These findings are in agreement with a notion that BA causes partial depression of innate immune cells activity. The increased LPS-induced TNF α secretion by the whole blood cells from BA patients has been observed following two weeks of basic anti-inflammatory therapy. We suggest that the increased LPS-induced TNF α secretion could be explained by partial restoration of peripheral blood immune cell activity associated with anti-inflammatory BA therapy. To elucidate the mechanism of increased LPS-induced TNF α secretion, we have estimated whole blood concentration of soluble CD14 (sCD14) in BA patients. No significant differences between sCD14 concentrations have been found. Obtained result presume existence of sCD14-independent mechanism of TNF α regulation by whole blood cells in response on LPS which may occur during anti-inflammatory therapy of BA. We suppose that basic anti-inflammatory therapy of BA does not simply reduce IL-6 concentration in peripheral blood, but may also partially restore the activity of innate immune cells in BA patients.

Keywords: bronchial asthma, innate immunity, blood leukocyte, human, lipopolysaccharides, cytokine production

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0478-2017-006 «Общие механизмы ответа врожденного иммунитета при сепсисе и аллергических заболеваниях».

Введение

Бронхиальная астма (БА) относится к самым распространенным хроническим заболеваниям

респираторного тракта, встречающимся в клинической практике. Суммарно БА страдают до 10-20% населения в развитых странах [30, 46]. В связи с этим всестороннее исследование данного патологического процесса является важной задачей современной клинической медицины [44]. Считается, что астма развивается у лиц с генетической предрасположенностью к этому заболеванию на фоне воздействия аллергенов

и инфекционных агентов на клетки респираторного тракта [14, 16, 25, 32]. Респираторные аллергены, попадая в организм больного БА, вызывают активацию системного воспалительного ответа по Th2- или Th17-зависимому (Th2-независимому) механизму [23-25].

Обнаружено, что в фазе обострения БА повышается секреция противовоспалительных цитокинов IL-1ra и sTNFRII клетками респираторного тракта пациентов по сравнению с клетками здоровых добровольцев [41, 43]. Избыточная секреция противовоспалительных цитокинов может снижать способность клеток иммунной системы отвечать на инвазию инфекционного агента. В частности, повышение концентрации IL-1ra в плазме крови пациентов после инсульта может являться фактором риска развития инфекционных заболеваний и обострения хронических очагов инфекции [9]. Это может усугублять течение БА [7]. В связи с этим необходимо, чтобы терапия не только купировала основные симптомы БА, но и не угнетала эффекторные функции иммунных клеток крови.

Большинство исследований, посвященных терапии БА, направлены на изучение процессов, происходящих непосредственно в респираторном тракте [25, 30]. Однако неизвестно, как воспаление, развивающееся при БА, влияет на функциональные ответы иммунных клеток в системном кровотоке.

В 60% случаев возбудителями инфекционных заболеваний дыхательных путей при БА являются грамотрицательные микроорганизмы [18]. Один из наиболее сильных провоспалительных агентов, высвобождаемых в кровь при грамотрицательной бактериемии, — липополисахарид (ЛПС), или эндотоксин [21, 22]. Эндотоксины активируют каскад воспалительных реакций, в частности секрецию клетками врожденного иммунитета провоспалительных (TNF α , IL-6, IL-8, IL-1 β , IFN γ) и противовоспалительных (IL-1ra) цитокинов [13, 23, 28]. ЛПС в высоких концентрациях (100 нг/мл) вызывает активацию клеток адаптивного иммунитета по Th1-зависимому пути [26, 39]. В связи с вышесказанным мы исследовали влияние терапии БА на реактивность клеток врожденной иммунной системы крови в ответ на ЛПС как фактор инфекционного генеза.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе отделения аллергологии и иммунологии больницы Пущинского научного центра (БПНЦ РАН) и лаборатории молекулярной биомедицины Института фундаментальных проблем биологии РАН (ИФПБ РАН), одобрено Локальным этическим комитетом БПНЦ РАН (протокол № 7 от 17.10.2016 г.). Все пациенты и условно здоровые добровольцы дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Верификация диагноза БА проводилась согласно рекомендациям GINA-2017. В группу исследования были включены пациенты (n = 10), которым впервые был

поставлен диагноз БА (возраст 18-48 лет, м. — 3, ж. — 7, курящие — 4 пациента, ИК < 10 лет).

На основании клинических показателей (в частности, оценки функции внешнего дыхания) пациентам была назначена базисная противовоспалительная терапия на основе ингаляционных глюкокортикостероидов, агонистов β -адренорецепторов или монтелукаста согласно рекомендациям GINA-17. Контроль симптомов БА проводили после двух недель терапии. Для оценки функциональной активности иммунных клеток крови у пациентов с БА нами исследованы ответы клеток крови на ЛПС до начала терапии и через две недели после терапии. Параллельно оценивали ЛПС-индуцированные ответы клеток крови условно здоровых добровольцев *ex vivo*.

Критерии включения пациентов (n = 10) в исследование: верифицированный диагноз БА, отсутствие других тяжелых хронических заболеваний, гельминтозов, отсутствие применения бронхолитиков короткого действия и антигистаминных препаратов в течение месяца до начала исследования. Критерии включения в контрольную группу для иммуносерологических исследований (n = 9): отсутствие клинико-лабораторных признаков респираторной патологии и тяжелых хронических заболеваний, неиспользование медикаментозной терапии в течение последних 3-х месяцев.

Забор крови у пациентов и условно здоровых добровольцев осуществлялся персоналом Больницы ПНЦ РАН в гепаринизированные (5%) пробирки (Becton Dickinson International, США). Кровь разводили средой RPMI 1640 в соотношении 1:9 в ячейках 24-луночного планшета (Greiner bioone, Германия) и инкубировали с ЛПС из *Escherichia coli* штамм O55:B5 (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 100 нг/мл в течение 6 ч или 24 ч. ЛПС из *E. coli* O55:B5 был выбран в качестве активирующего агента, поскольку он обладает выраженной провоспалительной активностью [Alexander and Rietschel, 2001; Gaekwad et al., 2010].

Контролем служили образцы крови пациентов с БА и условно здоровых добровольцев, не стимулированные ЛПС. Все пробы инкубировали в CO₂-инкубаторе (Jouan, Франция) при 37 °C, 100% влажности и атмосфере 5% CO₂. После инкубации образцы центрифугировали 10 мин при 300 g, отбирали супернатанты, замораживали и хранили при -20 °C до процедуры измерения. В пробах после 6 ч инкубации измеряли концентрации TNF α , IL-6, IL-8, после 24 ч — IL-1 β , IL-1ra, IFN γ , IL-17A, sCD14.

Концентрацию IL-4 измеряли в плазме крови пациентов до и через 2 недели терапии и у условно здоровых добровольцев. Для получения плазмы цельную гепаринизированную кровь центрифугировали 20 мин при 300 g и отбирали супернатанты. Полученную плазму замораживали и хранили при -20 °C до процедуры измерения.

Концентрацию цитокинов измеряли методом ИФА с использованием наборов реагентов

(ООО «Цитокин», Санкт-Петербург) согласно инструкции, рекомендованной производителем.

Результаты экспериментов анализировали с использованием методов непараметрической статистики. Статистическую значимость различий выборочных медианных значений оценивали с использованием U-теста Манна–Уитни и W-критерия Вилкоксона.

Результаты

TNF α

Статистически значимых различий между концентрациями TNF α , секретируемыми в контроле клетками крови пациентов с БА и условно здоровых добровольцев, не обнаружено. ЛПС-индуцированная секреция TNF α клетками крови пациентов с БА до терапии была значительно ниже, чем ЛПС-индуцированная секреция TNF α клетками условно здоровых добровольцев (рис. 1). Через две недели терапии наблюдалось усиление ЛПС-индуцированной секреции TNF α *ex vivo*.

IL-6

В образцах клеток крови пациентов с БА, инкубированных в течение 6 ч без стимуляции ЛПС, обнаружены уровни IL-6, значительно превышающие уровни этого цитокина в контрольных образцах клеток крови условно здоровых добровольцев. Через две недели базисной противовоспалительной терапии наблюдалось снижение секреции IL-6 клетками крови пациентов с БА (контроль). После стимуляции ЛПС, количество IL-6, секретируемого клетками крови пациентов с БА, значительно превышало количество этого цитокина в образцах клеток крови условно здоровых добровольцев. Терапия не оказывала значимых эффектов на ЛПС-индуцированную секрецию IL-6 клетками крови пациентов *ex vivo*.

IL-8

Статистически значимых различий между концентрациями IL-8, секретируемыми клетками крови пациентов с БА и условно здоровых добровольцев, в контроле не обнаружено. До базисной терапии клетки крови пациентов с БА, стимулированные ЛПС, секретируют меньше IL-8, чем клетки крови условно здоровых добровольцев. После двух недель терапии БА не наблюдалось изменений в продукции IL-8, индуцированной ЛПС.

IL-1 β

У пациентов до и через две недели после терапии БА в контрольных образцах обнаружены низкие уровни IL-1 β , сопоставимые с уровнями IL-1 β в пробах крови условно здоровых добровольцев. Продукция IL-1 β клетками крови пациентов с БА, стимулированных ЛПС до терапии, превышала продукцию этого цитокина клетками крови условно здоровых добровольцев в ответ на ЛПС. Через две недели терапии БА не наблюдалось изменений в продукции IL-1 β клетками крови пациентов, стимулированных ЛПС.

IL-1ra

В контрольных образцах клеток крови условно здоровых добровольцев не обнаружено IL-1ra,

тогда как значительные концентрации этого цитокина идентифицированы нами в контрольных образцах клеток крови пациентов с БА.

В ответ на ЛПС клетки крови условно здоровых добровольцев нарабатывали значительные количества IL-1ra. В отличие от условно здоровых добровольцев, после стимуляции эндотоксином клеток крови пациентов с БА уровни IL-1ra в образцах достоверно снижались. Терапия не оказывала статистически значимых эффектов на фоновую и ЛПС-индуцированную секрецию IL-1ra клетками крови пациентов *ex vivo*.

IFN γ

Клетки крови условно здоровых добровольцев и пациентов с БА не секретируют IFN γ без стимуляции ЛПС. В ответ на ЛПС клетки крови условно здоровых добровольцев секретируют значительные количества IFN γ . Количества IFN γ , секретируемого клетками крови пациентов с БА в ответ на ЛПС и контроле, не отличались. Через две недели базисной терапии не наблюдалось усиления продукции IFN γ клетками крови пациентов с БА, стимулированных ЛПС *ex vivo*.

IL-4

Концентрации IL-4 в плазме крови пациентов с БА значительно выше, чем в плазме крови условно здоровых добровольцев (рис. 2). Через две недели базисной терапии не наблюдалась статистически значимых изменений уровней IL-4 в плазме крови пациентов с БА.

Обсуждение

У пациентов с БА после терапии отмечается тенденция к снижению выраженности симптомов заболевания, положительная динамика в сторону прироста ОФВ1 и улучшение качества жизни (АСТ-тест), что указывает на купирование симптомов БА при базисной противовоспалительной терапии.

Из литературных данных известно, что в альвеолярной жидкости и в крови пациентов с БА могут обнаруживаться существенные концентрации TNF α [10, 11, 17, 43]. В настоящее время описаны два механизма развития БА. Первый, Th2-зависимый механизм, активируется в ответ на аллергены, тогда как второй, Th2-независимый (Th17-зависимый), реализуется при инфекции [18].

Уровни IL-4 в плазме крови пациентов с БА превышали уровни этого цитокина в плазме крови условно здоровых добровольцев, что указывает на развитие заболевания по Th2-зависимому механизму [46]. Кроме того, уровни TNF α в контрольных образцах пациентов с БА и условно здоровых добровольцев были сравнимы, подтверждая развитие БА по Th2-зависимому механизму, для которого не характерно увеличение продукции TNF α [8]. Полученные в ходе настоящего исследования результаты, подтверждают, что высокие уровни TNF α характерны для БА, развивающейся по Th2-независимому механизму [8, 35].

Одним из маркеров ослабления иммунного ответа является снижение секреции TNF α клет-

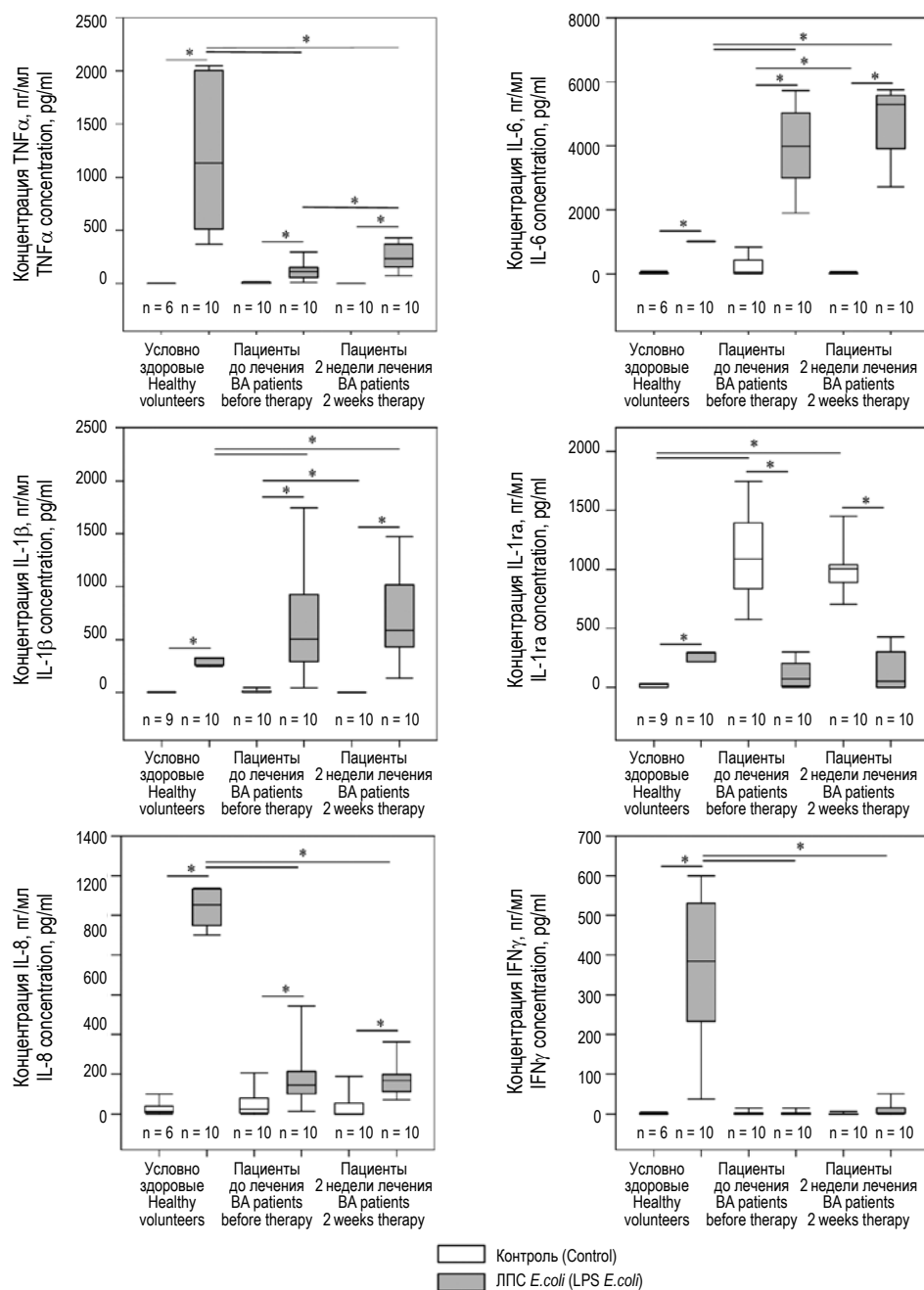


Рисунок 1. Секретция цитокинов клетками крови условно здоровых добровольцев, пациентов с БА до терапии и через две недели терапии

Примечание. Концентрации цитокинов оценивали в контрольных образцах крови (белые гистограммы) и после стимуляции ЛПС *E. coli* (100 нг/мл) (серые гистограммы). Концентрации TNFα, IL-6, IL-8 определяли после 6 ч инкубации, IL-1β, IL-1ra и IFNγ – после 24 ч инкубации. Определение концентраций цитокинов проводили методом ИФА. * – $p < 0,05$, U-тест Манна-Уитни и W-критерий Вилкоксона.

Figure 1. Cytokines secretion by whole blood cells of healthy volunteers, patients with bronchial asthma (BA) before treatment or after 2 weeks therapy

Note. Cytokine secretion was measured in control samples (white histograms) and after LPS (100 ng/ml) challenge (gray histograms). TNFα, IL-6 and IL-8 concentrations were measured after 6 h exposure, IL-1β, IL-1ra and IFNγ concentrations were measured after 24 h exposure. Cytokine concentrations were measured by ELISA. *, $p < 0.05$, Mann–Whitney U test, Wilcoxon signed-rank test.

ками цельной крови, стимулированными эндотоксином *ex vivo* [31]. В нашем исследовании ЛПС-индуцированная секреция TNFα клетками крови пациентов с БА была значительно ниже,

чем ЛПС-индуцированная секреция этого цитокина клетками условно здоровых добровольцев, что может указывать на снижение активности иммунных клеток крови у пациентов с БА. Снижение

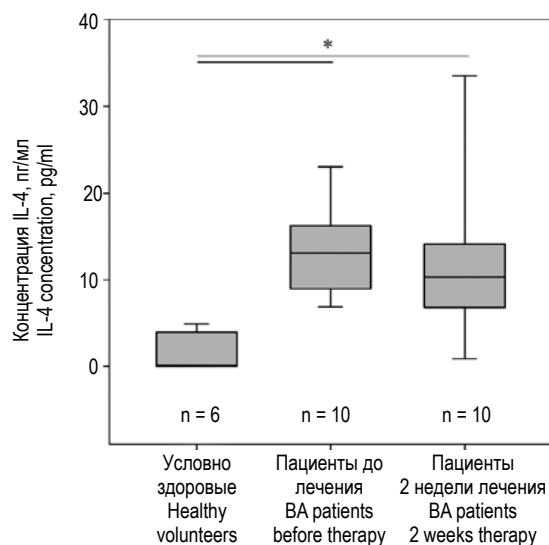


Рисунок 2. Концентрации IL-4 в плазме крови условно здоровых добровольцев, пациентов с БА до терапии и через две недели терапии

Примечание. Определение концентраций цитокинов проводили методом ИФА. * – $p < 0,05$, U-тест Манна–Уитни и W-критерий Вилкоксона.

Figure 2. IL-4 plasma levels of healthy volunteers, patients with bronchial asthma (BA) before treatment or after 2 weeks therapy. Note. Cytokine concentrations were measured by ELISA. *, $p < 0.05$, Mann–Whitney U test, Wilcoxon signed-rank test.

количеств TNF α в образцах крови пациентов с БА может объясняться повышением уровней sTNFR II, секретируемого клетками крови и связывающего TNF α [43, 48]. Через две недели терапии наблюдалось усиление ЛПС-индуцированной секреции TNF α *ex vivo*. ЛПС-индуцированный синтез TNF α характерен для моноцитов, но не характерен для лимфоцитов крови человека [2]. В связи с этим нами предположено, что усиление ЛПС-индуцированной секреции TNF α (6 ч) через две недели после терапии может быть связано с частичным восстановлением активности моноцитов крови пациентов с БА.

Одним из механизмов усиления ЛПС-индуцированной секреции TNF α клетками крови пациентов с БА на фоне терапии может быть повышение в крови концентраций растворимой формы рецептора CD14 (sCD14), который способствует доставке ЛПС к рецепторному комплексу TLR4/MD-2 на поверхности клеток-мишеней [27]. Нами не обнаружено достоверных изменений концентрации sCD14 в образцах клеток крови пациентов с БА на фоне терапии в контроле и после стимуляции ЛПС (данные не представлены). Полученные результаты указывают на то, что усиление ЛПС-индуцированной секреции TNF α клетками иммунной системы на фоне терапии БА происходит по sCD14-независимым механизмам.

Неполное восстановление ЛПС-индуцированной секреции TNF α клетками крови пациентов с БА до уровней, характерных для клеток крови условно здоровых добровольцев, может

объясняться способностью используемых в терапии ингаляционных глюкокортикостероидов (иГКС) индуцировать развитие иммунологической толерантности к ЛПС [36].

Цитокин IL-6 секретируется альвеолярными макрофагами пациентов с астмой после контакта с аллергеном [35, 45]. В контрольных образцах клеток крови пациентов с БА нами обнаружены уровни IL-6, превышающие уровни этого цитокина в контрольных образцах клеток крови условно здоровых добровольцев, что хорошо согласуется с литературными данными о влиянии астмы на продукцию IL-6 иммунными клетками крови [37, 49]. Терапия снижала фоновую секрецию IL-6 клетками крови пациентов до уровней, регистрируемых в пробах условно здоровых добровольцев, что может указывать на снижение выраженности воспаления.

Нами не было обнаружено статистически значимых различий между концентрациями IL-8 в контрольных образцах клеток крови, полученных от условно здоровых добровольцев и пациентов с БА, что согласуется с литературными данными [19, 29]. ЛПС-индуцированная секреция IL-8 клетками крови пациентов с БА значительно ниже ЛПС-индуцированной секреции IL-8 клетками крови условно здоровых добровольцев, что подтверждает снижение активности иммунных клеток крови пациентов с БА.

Из литературных данных известно, что в течение развития БА повышается экспрессия IL-1 β клетками эпителия дыхательных путей и увеличивается количество альвеолярных макрофагов, секретирующих IL-1 β [41–43]. В отличие от альвеолярных макрофагов клетки периферической крови пациентов с БА (контроль) секретируют концентрации IL-1 β , сопоставимые с концентрациями IL-1 β в пробах клеток крови условно здоровых добровольцев. Полученные результаты могут указывать на различия в регуляции секреции IL-1 β иммунными клетками респираторного тракта и периферической крови.

В контрольных образцах пациентов с БА обнаружены существенные количества IL-1 α в отличие от контрольных образцов условно здоровых добровольцев. Эти результаты согласуются с литературными данными [43]. Стоит отметить, что высокие концентрации IL-1 α в бронхоальвеолярной жидкости пациентов с БА не блокируют эффекты IL-1 β [43]. После активации ЛПС уровни IL-1 α в пробах клеток крови пациентов с БА снижались. Это может объясняться связыванием IL-1 α с IL-1R, экспрессия которого повышается на поверхности мононуклеарных клеток, стимулированных ЛПС [3, 4, 5, 6, 38].

Клетки пациентов с БА практически не секретируют IFN γ , как в контроле, так и в ответ на ЛПС. Низкие концентрации IFN γ подтверждают развитие БА по Th2-зависимому механизму [18, 33]. Через две недели после терапии БА не обнаружено усиления ЛПС-индуцированной секреции IFN γ *ex vivo*, что косвенно указывает на развитие воспаления по Th2-зависимому ме-

ханизму. Секретция Th2-клетками цитокинов IL-4 и IL-10 подавляет дифференцировку наивных Th-клеток в зрелые Th1-клетки и, как следствие, синтез IFN γ зрелыми Th1-клетками [15]. Результаты, полученные нами, показывают, что уровни IFN γ не могут использоваться для оценки эффективности терапии БА. Это согласуется со слабой терапевтической эффективностью IFN γ при лечении БА [12].

Из литературных данных известно, что иГКС являются неэффективными терапевтическими агентами при лечении БА, развивающейся по Th2-независимому пути [40]. Маркером иГКС-резистентной БА являются повышенные уровни IL-17A в крови пациентов. В связи с этим мы оценили продукцию IL-17A клетками крови пациентов и условно здоровых добровольцев (данные не представлены). Концентрации IL-17A во всех пробах были ниже концентрации, ассоциированной с риском иГКС-резистентной астмы (20 пг/мл) [1], что подтверждает развитие

БА по Th2-зависимому механизму [18] и адекватность подобранной терапии.

Оценка продукции IFN γ и IL-17A, клетками крови, стимулированными ЛПС, наряду с уровнями IL-4, может быть использована для подтверждения развития БА по Th2-зависимому механизму.

В настоящем исследовании показано, что через две недели после базисной противовоспалительной терапии у пациентов с БА наблюдается снижение фоновой секреции IL-6 клетками крови и частичное восстановление чувствительности иммунных клеток крови, выраженное в усилении ЛПС-индуцированной секреции TNF α *ex vivo*.

Благодарности

Авторы выражают свою благодарность сотрудникам БПНЦ РАН Акимовой О.Н. за забор биоматериала для обследования и Банниковой Н.П. за помощь в организации исследования.

Список литературы / References

1. Agache I., Ciobanu C., Agache C., Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respir. Med.*, 2010, Vol. 104, no. 8, pp. 1131-1137.
2. Andersson U., Matsuda T. Human interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha production studied at a single-cell level. *Eur. J. Immunol.*, 1989, Vol. 19, no. 6, pp. 1157-1160.
3. Arend W.P. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv. Immunol.*, 1993, Vol. 54, pp. 167-227.
4. Arend W.P., Malyak M., Guthridge C.J., Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998, Vol. 16, pp. 27-55.
5. Arend W.P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, Vol. 13, no. 4-5, pp. 323-340.
6. Arend W.P., Gaba C. Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Res.*, 2000, Vol. 2, no. 4, pp. 245-248.
7. Atkinson T.P. Is asthma an infectious disease? New evidence. *Curr. Allergy. Asthma Rep.*, 2013, Vol. 13, no. 6, pp. 702-709.
8. Baines K.J., Simpson J.L., Wood L.G., Scott R.J., Gibson P.G. Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 127, no. 1, pp. 153-160.
9. Becker K.J., Dankwa D., Lee R., Schulze J., Zierath D., Tanzi P., Cain K., Dressel A., Shibata D., Weinstein J. Stroke, IL-1ra, IL1RN, infection and outcome. *Neurocrit. Care.*, 2014, Vol. 21, no. 1, pp. 140-146.
10. Berry M.A., Brightling C., Pavord I., Wardlaw A. TNF-alpha in asthma. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2007, Vol. 7, no. 3, pp. 279-282.
11. Berry M.A., Hargadon B., Shelley M., Parker D., Shaw D.E., Green R.H., Bradding P., Brightling C.E., Wardlaw A.J., Pavord I.D. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N. Engl. J. Med.*, 2006, Vol. 354, no. 7, pp. 697-708.
12. Boguniewicz M., Schneider L.C., Milgrom H., Newell D., Kelly N., Tam P., Izu A.E., Jaffe H.S., Bucalo L.R., Leung D.Y. Treatment of steroid-dependent asthma with recombinant interferon-gamma. *Clin. Exp. Allergy*, 1993, Vol. 23, no. 9, pp. 785-790.
13. de Bont N., Netea M.G., Rovers C., Smilde T., Hijmans A., Demacker P.N. LPS-induced release of IL-1 beta, IL-1Ra, IL-6, and TNF-alpha in whole blood from patients with familial hypercholesterolemia: no effect of cholesterol-lowering treatment. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2006, Vol. 26, no. 2, pp. 101-107.
14. Cookson B. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature*, 1999, Vol. 402, B5-11.
15. Cunha F.Q., Moncada S., Liew F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, Vol. 182, no. 3, pp. 1155-1159.
16. Davies R.J., Wang J., Jiahua W., Abdelaziz M., Calderon M.A., Khair O., Devalia J.L., Rusznak C. New insights into the understanding of asthma. *Chest*, 1997, Vol. 111, pp. 2-10.
17. Desai D., Brightling C. TNF-alpha antagonism in severe asthma? *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, 2010, Vol. 4, no. 3, pp. 193-200.
18. Earl C.S., An S.Q., Ryan R.P. The changing face of asthma and its relation with microbes. *Trends Microbiol.*, 2015, Vol. 23, no. 7, pp. 408-418.
19. Ghaffari J., Rafiei A.R., Ajami A., Mahdavi M., Hoshidar D. Serum interleukins 6 and 8 in mild and severe asthmatic patients, is it difference? *Caspian J. Intern. Med.*, 2011, Vol. 2, no. 2, pp. 226-228.
20. Godwin M.S., Blackburn J., Steele C. IL-1R and IL-1RA differentially contribute to immunopathogenesis during fungal asthma. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, pp. 53-54.
21. Gomes N.E., Brunialti M.K., Mendes M.E., Freudenberg M., Galanos C., Salomão R. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2010, Vol. 43, no. 9, pp. 853-858.
22. Jansky L., Reymanova P., Kopecky J. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or Infected by borrelia. *Physiol. Res.*, 2003, Vol. 52, no. 6, pp. 593-598.
23. Holt P.G., Macaubas C., Stumbles P.A., Sly P.D. The role of allergy in the development of asthma. *Nature*, 1999, Vol. 402, B12-17.
24. Karjalainen J., Hulkkonen J., Nieminen M.M., Huhtala H., Aromaa A., Klaukka T., Hurme M. Interleukin-10 gene promoter region polymorphism is associated with eosinophil count and circulating immunoglobulin E in adult asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2003, Vol. 33, no. 1, pp. 78-83.
25. Holgate S.T., Davies D.E., Powell R.M., Howarth P.H., Haitchi H.M., Holloway J.W. Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. *Eur. Respir. J.*, 2007, Vol. 29, no. 4, pp. 793-803.
26. Kim Y., Lee S., Kim Y.S., Lawler S., Gho Y.S., Kim Y.K., Hwang H.J. Regulation of Th1/Th2 cells in asthma development: a mathematical model. *Math. Biosci. Eng.*, 2013, Vol. 10, no. 4, pp. 1095-1133.

27. Kitchens R.L., Thompson P.A. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J. Endotoxin Res.*, 2005, Vol. 11, no. 4, pp. 225-229.
28. Kumolosasi E., Salim E., Jantan I., Ahmad W. Kinetics of intracellular, extracellular and production of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Trop. J. Pharm. Res.*, 2014, Vol. 13, pp. 536-543.
29. Liu G., Zhu R., Li B. TNF-alpha and IL-8 of the patients with allergic asthma. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.*, 2005, Vol. 25, no. 3, pp. 274-275.
30. McCracken J.L., Veeranki S.P., Ameredes B.T., Calhoun W.J. Diagnosis and management of asthma in adults: a review. *JAMA*, 2017, Vol. 318, no. 3, pp. 279-290.
31. Muszynski J.A., Nofziger R., Greathouse K., Nateri J., Hanson-Huber L., Steele L., Nicol K., Groner J.I., Besner G.E., Raffel C., Geyer S., El-Assal O., Hall M.W. Innate immune function predicts the development of nosocomial infection in critically injured children. *Shock*, 2014, Vol. 42, no. 4, pp. 313-321.
32. Nelson H.S. The importance of allergens in the development of asthma and the persistence of symptoms. *Dis. Mon.*, 2001, Vol. 47, pp. 5-15.
33. Peters M.C. Measures of gene expression in sputum cells can identify T(H)2-high and T(H)2-low subtypes of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 133, no. 2, pp. 388-394.
34. Poynter M.E., Irvin C.G. Interleukin-6 as a biomarker for asthma: hype or is there something else? *Eur. Respir. J.*, 2016, Vol. 48, no. 4, pp. 979-981.
35. Ray A., Oriss T.B., Wenzel S.E. Emerging molecular phenotypes of asthma. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2015, Vol. 308, no. 2, pp. L130-140.
36. Rearte B., Landoni V., Laborde E., Fernández G., Isturiz M. Differential effects of glucocorticoids in the establishment and maintenance of endotoxin tolerance. *Clin. Exp. Immunol.*, 2010, Vol. 159, no. 2, pp. 208-216.
37. Rincon M., Irvin C.G. Role of IL-6 in Asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int. J. Biol. Sci.*, 2012, Vol. 8, no. 9, pp. 1281-1290.
38. Saccani S., Polentarutti N., Penton-Rol G., Sims J.E., Mantovani A. Divergent effects of LPS on expression of IL-1 receptor family members in mononuclear phagocytes *in vitro* and *in vivo*. *Cytokine*, 1998, Vol. 10, no. 10, pp. 773-780.
39. Schnare M., Barton G.M., Holt A.C., Takeda K., Akira S., Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, 2001, Vol. 2, no. 10, pp. 947-950.
40. Silva M.J., Santana M.B.R., Pitangueira H.M., Marques C.R., Carneiro V.L., Figueiredo C.A., Costa R.S. Glucocorticoid resistant asthma: the potential contribution of IL-17. *Biomark. J.*, 2016, Vol. 1, p. 6.
41. Sousa A.R., Lane S.J., Nakhosteen J.A., Lee T.H., Poston R.N. Expression of interleukin-1 beta (IL-1beta) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on asthmatic bronchial epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, Vol. 154, no. 4, Pt 1, pp. 1061-1066.
42. Thomas S.S., Chhabra S.K. A study on the serum levels of interleukin-1beta in bronchial asthma. *J. Indian. Med. Assoc.*, 2003, Vol. 101, no. 5, pp. 282-284.
43. Tillie-Leblond I., Pugin J., Marquette C.H., Lamblin C., Saulnier F., Bricet A., Wallaert B., Tonnel A.B., Gosset P. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 1999, Vol. 159, no. 2, pp. 487-494.
44. Uwaezuoke S.N., Ayuk A.C., Eze J.N. Severe bronchial asthma in children: a review of novel biomarkers used as predictors of the disease. *J. Asthma Allergy*, 2018, Vol. 11, pp. 11-18.
45. Vercelli D., Jabara H.H., Arai K., Yokota T., Geha R.S. Endogenous interleukin 6 plays an obligatory role in interleukin 4-dependent human IgE synthesis. *Eur. J. Immunol.*, 1989, Vol. 19, no. 8, pp. 1419-1424.
46. Wegmann M. Th2 cells as targets for therapeutic intervention in allergic bronchial asthma. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2009, Vol. 9, no. 1, p. 85-100.
47. Wohlleben G., Erb K.J. Immune stimulatory strategies for the prevention and treatment of asthma. *Curr. Pharm. Des.*, 2006, Vol. 12, no. 25, pp. 3281-3292.
48. Zahorska-Markiewicz B., Janowska J., Olszanecka-Glinianowicz M., Zurakowski A. Serum concentrations of TNF- α and soluble TNF- α receptors in obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 2000, Vol. 24, no. 11, pp. 1392-1395.
49. Zhu Z., Tang W., Ray A., Wu Y., Einarsson O., Landry M.L., Gwaltney J., Elias J.A. Rhinovirus stimulation of interleukin-6 *in vivo* and *in vitro*: Evidence for nuclear factor- κ B-dependent transcriptional activation. *J. Clin. Invest.*, 1996, Vol. 97, no. 2, pp. 421-430.

Авторы:

Серов Д.А. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биомедицины ФГБУН «Институт фундаментальных проблем биологии РАН», г. Пушкино, Московская обл., Россия

Кабанов Д.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биомедицины ФГБУН «Институт фундаментальных проблем биологии РАН», г. Пушкино, Московская обл., Россия

Косякова Н.И. — д.м.н., заведующий отделением иммунологии-аллергологии ФГАУЗ «Больница Пушкинского научного центра РАН», г. Пушкино, Московская обл., Россия

Прохоренко И.Р. — д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биомедицины ФГБУН «Институт фундаментальных проблем биологии РАН», г. Пушкино, Московская обл., Россия

Authors:

Serov D.A., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Biomedicine, Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Kabanov D.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Biomedicine, Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Kosyakova N.I., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Immunology/Allergology, Clinical Hospital at the Pushchino Research Center, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Prokhorenko I.R., PhD, MD (Biology), Main Research Associate, Laboratory of Molecular Biomedicine, Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Поступила 18.07.2018

Отправлена на доработку 10.12.2018

Принята к печати 14.12.2018

Received 18.07.2018

Revision received 10.12.2018

Accepted 14.12.2018

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С апреля 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, №1. С. 64-69.

Varjushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbircev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no.1, pp. 64-69.

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с.

Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абросимов А.Ю.	781	Дылева Ю.А.	633	Леплина О.Ю.	653	Сазыкин А.Ю.	781
Алешкин В.А.	595	Жданова А.А.	669	Ляхович В.В.	737	Сельков С.А.	669
Арсентьева Н.А.	617	Жебрун Д.А.	617	Макарова О.В.	643	Семенов А.В.	617
Аутеншлюс А.И.	737	Заморина С.А.	603	Малыгина Д.А.	669	Серов Д.А.	789
Афанасьев С.С.	595	Зурочка А.В.	715	Маркова К.Л.	669	Симашкова Н.В.	773
Балацкая Н.В.	765	Иванова А.Н.	669	Матвеева Л.В.	743	Сладкопеевцев А.С.	643
Баторов Е.В.	653	Иванов И.Д.	737	Милютина Ю.П.	669	Соколов Д.И.	669
Белик Е.В.	633	Иванов П.А.	773	Михайлова В.А.	669	Студеникина А.А.	737
Белоусов П.В.	781	Кабанов Д.С.	789	Михайлова Е.С.	737	Стуров Н.В.	587
Бессмельцев С.С.	703	Карягина Е.В.	703	Мошев А.В.	689	Тимганова В.П.	603
Бобровская Я.И.	781	Катаргина Л.А.	765	Мякошина Е.Б.	765	Тихонова М.А.	653
Боголюбова А.В.	781	Козырева А.Р.	669	Никитина С.Г.	773	Тотолян Арег А.	617
Борисов А.Г.	689	Колесникова Н.В.	749	Онохин К.В.	669	Учасова Е.Г.	633
Бочкова М.С.	603	Корневский А.В.	669	Останин А.А.	653	Фактор М.И.	773
Брусов О.С.	773	Корнева Е.А.	661	Павлова А.А.	703	Федоренко Т.В.	749
Бубнова Л.Н.	703	Косырева А.М.	643	Павлова И.Е.	703	Хайдуков С.В.	587, 715
Вавилин В.А.	737	Косыкова Н.И.	789	Пашкова И.А.	749	Храмцов П.В.	603
Ванушко В.Э.	781	Криволапова И.М.	725	Пашнина И.А.	725	Черемных Е.Г.	773
Вараксин Н.А.	737	Крюк Ю.Я.	755	Попов С.В.	587	Черешнев В.А.	725
Васильева Е.В.	617	Кудрявцев И.В.	689	Порханов В.А.	749	Черных Е.Р.	653
Воробьев Н.В.	587	Кувда Е.В.	749	Прилуцкая И.А.	755	Чикина Е.Ю.	773
Вязьмина Л.П.	669	Куликова И.Г.	765	Прохоренко И.Р.	789	Шанин С.Н.	661
Голованова А.В.	737	Купраш Д.В.	781	Раев М.Б.	603	Шварц А.М.	781
Груздева О.В.	633	Ланшаков К.В.	781	Саакян С.В.	765	Шебзухов Ю.В.	781
Губарева Е.А.	749	Лахтин В.М.	595	Савлевич Е.Л.	715		
Джалилова Д.Ш.	643	Лахтин М.В.	595	Савченко А.А.	689		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адипокины	633	лимфоциты	716	системный иммунитет	716
альбумин	704	липополисахариды	790	стандартная консервативная	
антивирусные стратегии	595	ЛПС	644	терапия	716
атеросклероз	633	менингит	661	стимуляция <i>in vitro</i>	725
аутизм	774	микровезикулы	670	стресс	661
аутоантитела	782	множественная миелома	704	субпопуляция лимфоцитов	
бета-2-микроглобулин	704	моноцитарный хемотаксический		периферической крови	765
биомаркер	749	протеин	744	Т-клетки	653
бронхиальная астма	790	моноциты	690	Т-хелперы	644
воспаление	725	мукозальный иммунитет	595	тимус	644
врожденный иммунитет	595, 790	нативный гликоделин А	604	травма	661
гены	704	неинвазивные фолликулярные		трансплантационный иммунитет	749
гепатит С	618	опухоли щитовидной железы		трансплантация почки	749
гипертония	633	с ядрами папиллярного типа	782	тромбоз	755
гликоконъюгаты	595	однонуклеотидный полиморфизм	704	туберкулез	618
гранзим В	670	отторжение аллотрансплантата	749	увеальная меланома	765
дендритные клетки	690	периваскулярная жировая ткань	633	устойчивость к гипоксии	644
дети	725	перфорин	670	фактор некроза опухолей α	755
диагностическая ценность	744	подсчет клеток	774	фенотип	690
дисбиозы	595	полипозный риносинусит	716	хемокины	618, 749
желудочный эпителий	744	популяции киллерных клеток	595	цитокины	587, 595, 633, 670, 704, 725, 738, 755
иммунная дисфункция	774	презентация антигена	690	цитотоксичность	670
иммунная система	604	пробиотические лектины	595	щитовидная железа	782
иммунная толерантность при		продукция цитокинов	790	экспрессия	738
беременности	604	пролиферация лимфоцитов	661	ювенильные артриты	725
иммуномодуляция	604	противоопухолевые стратегии	595	CD-маркеры	716
иммуносупрессия	653	проточная цитометрия	716	CD127	587
иммуноферментный анализ	738	раково-сетчаточный антиген	782	CTLA-4	587
интерлейкин	704, 744	рак почки	690	CXCR3	618
интерферон	744	рак простаты	587	FoxP3	587
инфузии <i>Tetrahymena pyriformis</i>	774	рак щитовидной железы	782	<i>Helicobacter pylori</i>	744
ишемический инсульт	755	ревматоидный артрит	618	IFN γ -зависимые лиганды	618
кишечная метаплазия	744	регуляторные Т-лимфоциты	644	IL-1	661
клеточная культура	738	рековерин	782	NK-клетки	670
коагуляция	774	рекомбинантный гликоделин А	604	PIGF	653
комплемент	774	рецепторные лектины	595	Treg	587
костимулирующие молекулы	690	самки	644	VEGF-R1	653
культуры клеток	725	сердечно-сосудистые заболевания	633	VEGF	653
лейкоциты крови человека	790	системный воспалительный ответ	644		