

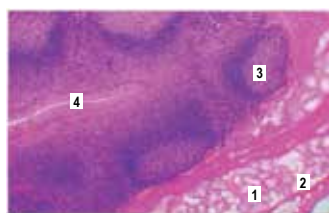
ISSN 1563-0625 (print)  
ISSN 2313-741X (online)

Том 21, № 5. С. 801-1008

**2019**

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

# МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



**Рисунок 1. Микрофотография задних язычных желез (их расположение) под язычной миндалиной женщины 45 лет. Задняя треть языка (область его корня)**  
Примечание. 1 – начальный отдел железы; 2 – жировая ткань в строме железы; 3 – лимфоидные узелки с центрами размножения; 4 – крипта язычной миндалины. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 60×.

Figure 1. Micrograph of posterior lingual glands (location) under the lingual gland in a woman, 45 years old. Posterior third of the tongue (root area)

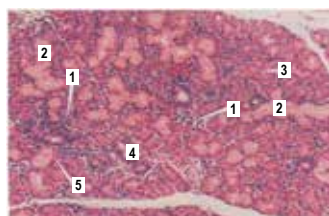
Note. 1, initial compartment of the gland; 2, fat tissue in the glandular stroma; 3, lymphoid nodules with proliferation centres; 4, crypt of a lingual gland. H&E staining, 60× magnification.



**Рисунок 2. Жировая ткань возле начальных частей и выводных протоков задней язычной железы женщины 67 лет. Задняя треть языка**  
Примечание. 1 – жировая ткань; 2 – начальная часть; 3 – выводной проток (с секреторными массами); 4 – строма железы. Окраска пикрофуксином по ван Гизону. Ув. 250×.

Figure 2. Fat tissue close to the first part and deferent ducts of posterior lingual gland in a woman, 67 years old. Posterior third of the tongue

Note. 1, fat tissue; 2, initial part; 3, ductus deferens (with secretory masses); 4, glandular stroma. Picro fuchsin staining by van Gieson. 250× magnification.

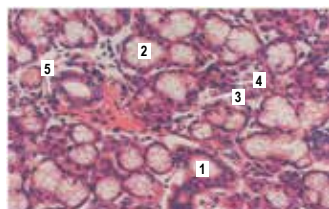


**Рисунок 3. Клетки лимфоидного ряда в строме передней язычной железы женщины 26 лет. Передняя треть языка**

Примечание. 1 – скопление клеток лимфоидного ряда; 2 – трубчатая начальная часть слизистого типа секреции; 3 – белковая начальная часть; 4 – исчерченный выводной проток; 5 – белковое полулуние (Джануцци). Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 60×.

Figure 3. Lymphoid cells in the stroma of anterior lingual gland in a woman, 26 years old. Anterior third of tongue

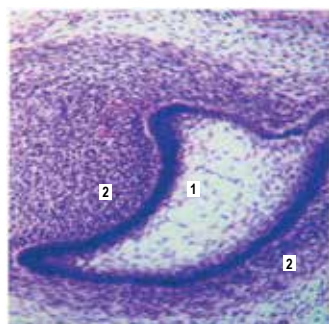
Note. 1, lymphoid cell aggregation; 2, tubular initial part with mucous secretion type; 3, proteinous initial part; 4, striated deferent duct; 5, proteinous demilune (Gianuzzi). H&E staining. 60× magnification.



**Рисунок 4. Клетки лимфоидного ряда вокруг исчерченного выводного протока в строме передней язычной железы женщины 34 лет. Передняя треть языка**  
Примечание. 1 – исчерченный выводной проток; 2 – слизистая начальная часть; 3 – белковое полулуние (Джануцци); 4 – белковая начальная часть; 5 – клетки лимфоидного ряда. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 250×.

Figure 4. Lymphoid lineage cells around the striated deferent duct in stroma of the anterior lingual gland in a woman, 34 years old. Anterior part of the tongue

Note. 1, striated deferent duct; 2, mucous initial part; 3, proteinous demilune (Gianuzzi); 4, proteinous initial part; 5, lymphoid lineage cells. H&E staining. 250× magnification.



**Рисунок 5. Многочисленные клетки лимфоидного ряда возле общего выводного протока средней язычной железы мужчины 35 лет. Средняя треть языка (область желобоватых сосочков)**

Примечание. 1 – общий выводной проток (ампулообразное расширение); 2 – клетки лимфоидного ряда. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 320×.

Figure 5. Numerous lymphoid lineage cells near *ductus deferens communis* of the medial lingual gland in a man, 35 years old. Middle third of the tongue (the *papillae vallatae* area)

Note. 1, common deferent duct (ampullary opening); 2, lymphoid lineage cells. H&E staining. 320× magnification.



**Рисунок 6. Почти полное отсутствие клеток лимфоидного ряда возле задних желез языка женщины 70 лет. Задняя треть языка**

Примечание. 1 – начальный отдел железы; 2 – рыхлая волокнистая неоформленная соединительная ткань. Окраска пикрофуксином по ван Гизону. Ув. 250×.

Figure 6. Nearly full absence of lymphoid cells around posterior lingual glands in a woman, 70 years old. Posterior third of the tongue

Note. 1, initial compartment of the gland; 2, loose fibrillar non-structured connective tissue. Staining with picro fuchsin (van Gieson). 250× magnification.

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

# МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

сентябрь-октябрь

**2019, том 21**

**№ 5**

---

Основан в марте 1999 года

## Главный редактор

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

## Заместитель главного редактора

**Тотолян Арег Артемович** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии и 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 02.10.2019 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 26. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 986

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

199178, Санкт-Петербург, 8-я линия В.О., 83, корп. 1, Литер А

Тел.: (812) 950-10-99.

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

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

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

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

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

## Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

**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.**

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,  
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH  

---

(SPb RAACI)

# **MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA**

September-October

**2019, volume 21**

**No. 5**

---

Published since March 1999

## Editor-in-Chief

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

## Deputy Editor-in-Chief

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

## Editorial Board

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

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

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

**Vladimir 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; Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, 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 02.10.2019. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 26. Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> 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

Башкина О.А., Самотруева М.А., Ажигова А.К., Пахнова Л.Р.

НЕЙРОИММУНОЭНДОКРИННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В КОЖЕ.....807

### Оригинальные статьи

Деген А.С., Коваль Г.Д., Сухомлинова И.Е., Морозова О.В., Камышный А.М.

АНАЛИЗ ЦИТОАРХИТЕКТоники TLR2\* и TLR4\* ЛИМФОЦИТОВ И ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ Grp2, Spi-B, NF-κB1, c-REL, TNFα и TNFβ В КАЛТ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЙ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА .....821

Курочкина Ю.Д., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Сизиков А.Э., Сулутьян А.Э., Чумасова О.А., Останин А.А., Черных Е.Р.

ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОН-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ С IFNα, НА ФУНКЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ .....835

Романюк Д.С., Хмелевская А.А., Постовская А.М., Малько Д.Б., Кузьмина Е.П., Хамаганова Е.Г., Ефимов Г.А.

КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ МИНОРНЫЕ АНТИГЕНЫ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ДЛЯ РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАЮЩИХ ТРАНСПЛАНТАЦИЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРОВИ .....847

Лыков А.П., Суровцева М.А., Повещенко О.В., Бондаренко Н.А., Ким И.И., Чернявский А.М., Фомичев А.В.

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ .....861

Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Мун С.А., Гордеева Л.А., Луценко В.А., Вафин И.А., Вержбицкая Н.Е., Колпинский Г.И., Костяно М.В.

ИММУНОРЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЭСТРАДИОЛА И ПРОГЕСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ .....869

Шмитко А.Д., Костинов М.П., Полищук В.Б., Сависко А.А., Васильева Г.В.

РОЛЬ ФАКТОРОВ АНГИОГЕНЕЗА В ТРАНСПЛАЦЕНТАРНОЙ ПЕРЕДАЧЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ КОРИ .....877

Митропанова М.Н., Чудилова Г.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В.

ДИСФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ РАСЩЕЛИНАМИ ГУБЫ И НЕБА .....885

Зайнетдинова Л.Ф., Телешева Л.Ф., Коряушкина А.В., Квятковская С.В., Мезенцева Е.А., Никушкина К.В.

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНОГО ИММУНИТЕТА У ЖЕНЩИН С ЭНДОМЕТРИОЗОМ И ГЕНИТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ .....895

Старшинова А.А., Малкова А.М., Зинченко Ю.С., Басанцова Н.Ю., Павлова М.В., Беляева Е.Н., Лапин С.В., Мазинг А.В., Суркова Е.А., Яблонский П.К.

ХАРАКТЕРИСТИКА АУТОИММУННОГО ВОСПАЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ .....911

Козлова Я.И., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Аак О.В., Богомолова Т.С., Борзова Ю.В., Махмутова В.Р., Степаненко Т.А., Кузнецов В.Д., Васильева Н.В., Шульгина М.В., Климко Н.Н.

ТЕСТ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МИКОГЕННОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ .....919

Шафигуллина З.А., Данилова И.Г., Медведева С.Ю., Черешнев В.А., Абидов М.Т.

СИНУСОИДАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ И ЦИТОКИНОВЫЙ ОТВЕТ ПРИ ТЕТРАХЛОРЕТАН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ И СПОСОБ ЕЕ КОРРЕКЦИИ .....929

Ковязина Н.А., Алхутлова Н.А., Жижина О.Л.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ АСПЕКТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE-АНТИТЕЛ К КОРОВЬЕМУ МОЛОКУ И ЕГО КОМПОНЕНТАМ .....937

### Краткие сообщения

Боголюбова А.В., Мишина Е.Е., Богомолов П.О., Мацевич М.В., Кокина К.Ю., Майоров А.Ю., Белоусов П.В.

ЭКСПРЕССИЯ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ TLR2, TLR3, TLR4 И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ TNF И IL-6 В БИОПТАТАХ ПАЦИЕНТОВ С НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНИ .....945

Паскова Е.В., Маркелова Е.В., Шахгельдян К.И., Гельцер Б.И., Кригер А.Б.

РОЛЬ ЦИТОКИН-ОПОСРЕДОВАННЫХ МЕХАНИЗМОВ В РАЗВИТИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ .....953

Каневский Л.М., Гречихина М.В., Кузьмина Е.Г., Мушкарина Т.Ю., Спелков А.А., Стрельцова М.А., Коваленко Е.И.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ MICA В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ .....959

Рамильева И.Р., Буркитбаев Ж.К., Абдрахманова С.А., Турганбекова А.А., Баймукашева Д.К., Жибурт Е.Б.

ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТЕЙ HLA У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ .....965

Герцев А.В., Ищук В.Н., Закревский Ю.Н.

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ТЯЖЕСТИ ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВ НА СОСТОЯНИЕ НЕЙРОПЕПТИДНО-ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА .....973

Олсуфьева А.В., Бодрова И.В., Васянина К.А., Олсуфьев С.С.

ЖЕЛЕЗИСТО-ЛИМФОИДНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В ТОЛЩЕ ЯЗЫКА И В СТЕНКАХ ГЛОТКИ У ЧЕЛОВЕКА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ .....981

Олсуфьева А.В., Бодрова И.В., Васянина К.А., Олсуфьев С.С.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ .....981

### Иммунологические методы

Трофимов А.В., Ищенко А.М., Рак А.А., Сергеева В.Е., Симбирцев А.С., Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Станкова Н.В., Ульянова Л.И., Климова Т.А.

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ МЫШИ, РАСПОЗНАЮЩИХ ПЕРВИЧНЫЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА КРОЛИКА К ПРОИЗВОДНЫМ МОРФИНА .....987

Зуева Е.В., Хамитова И.В., Мелечкина А.М., Лазаренко Л.Л., Баканина Л.А., Тотолян Арег А.

ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИИ IN VITRO: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА Е К ИНГАЛЯЦИОННЫМ АЛЛЕРГЕНАМ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМ IMMULITE И RHADIA .....997

Правила для авторов ..... 1005

Авторский указатель ..... 1008

Предметный указатель ..... 1008

# CONTENTS

## Reviews

Bashkina O.A., Samotruva M.A., Azhikova A.K., Paknnova L.R.

|                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------|-----|
| NEUROIMMUNOENDOCRINE REGULATION OF THE SKIN FUNCTIONING ..... | 807 |
|---------------------------------------------------------------|-----|

## Original articles

Degen A.S., Koval G.D., Sukhomlinova I.E., Morozova O.V., Kamyshnyi A.M.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ANALYSIS OF CYTOARCHITECTONICS OF TLR2 <sup>+</sup> AND TLR4 <sup>+</sup> LYMPHOCYTES AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF THE GENES <i>Gp2</i> , <i>Spi-B</i> , <i>NF-κB1</i> , <i>c-REL</i> , <i>TNFα</i> AND <i>TNFr</i> IN GALT OF RATS IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS AND AFTER PENTOXIFYLLINE ADMINISTRATION..... | 821 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Kurochkina Yu.D., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Sizikov A.E., Sulutian A.E., Chumasova O.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

|                                                                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| INFLUENCE OF DEXAMETHASONE-MODIFIED DENDRITIC CELLS GENERATED WITH IFNα UPON AUTOLOGOUS T LYMPHOCYTE FUNCTIONS IN THE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS ..... | 835 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Romaniuk D.S., Khmelevskaya A.A., Postovskaya A.M., Malko D.B., Kuzminova E.P., Khamaganova E.G., Efimov G.A.

|                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CLINICALLY RELEVANT MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS FOR RUSSIAN PATIENTS UNDERGOING HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION ..... | 847 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Lykov A.P., Survtseva M.A., Poveshchenko O.V., Bondarenko N.A., Kim I.I., Chernyavsky A.M., Fomichev A.V.

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON CYTOKINE PRODUCTION BY STEM CELLS ..... | 861 |
|---------------------------------------------------------------------|-----|

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

|                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IMMUNOREGULATION OF BLOOD SERUM ESTRADIOL AND PROGESTERONE LEVELS IN POSTMENOPAUSAL WOMEN ..... | 869 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Shmitko A.D., Kostinov M.P., Polishchuk V.B., Savisko A.A., Vasilyeva G.V.

|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ROLE OF ANGIOGENIC FACTORS FOR TRANSPLACENTAL TRANSFER OF THE MEASLES ANTIBODIES ..... | 877 |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Mitropanova M.N., Chudilova G.A., Nesterova I.V., Kovaleva S.V.

|                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| DYSFUNCTIONS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CHILDREN WITH CONGENITAL CLEFT LIP AND PALATE ..... | 885 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Zaynetdinova L.F., Telesheva L.F., Koryaushkina A.V., Kvyatkovskaya S.V., Mezentseva E.A., Nikushkina K.V.

|                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FEATURES OF SYSTEM IMMUNITY IN WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS AND GENITAL INFECTION..... | 895 |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Starshinova A.A., Malkova A.M., Zinchenko Yu.S., Basantsova N.Yu., Pavlova M.V., Belyaeva E.N., Lapin S.V., Masing A.V.,

|                              |  |
|------------------------------|--|
| Surkova E.A., Yablonsky P.K. |  |
|------------------------------|--|

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CHARACTERISTICS OF AUTOIMMUNE INFLAMMATION IN THE PATIENTS WITH LUNG TUBERCULOSIS ..... | 911 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Kozlova Ya.I., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Aak O.V., Bogomolova T.S., Borzova Yu.V., Makhmutova V.R., Stepanenko T.A.,

|                                                            |  |
|------------------------------------------------------------|--|
| Kuznetsov V.D., Vasilyeva N.V., Shulgina M.V., Klimko N.N. |  |
|------------------------------------------------------------|--|

|                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| BASOPHILE ACTIVATION TEST FOR THE DIAGNOSTICS OF FUNGAL SENSITIZATION IN THE PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS ..... | 919 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Shafgullina Z.A., Danilova I.G., Medvedeva S.Yu., Chereshnev V.A., Abidov M.T.

|                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| SINUSOIDAL CELLS AND CYTOKINE RESPONSE IN THE TETRACHLOROMETHANE-INDUCED HEPATOTOXICITY AND AN APPROACH TO ITS CORRECTION ..... | 929 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Kovyazina N.A., Alkhutova N.A., Zhizhina O.L.

|                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CLINICAL AND LABORATORY ASPECTS OF DETECTING SPECIFIC IgE ANTIBODIES TO COW'S MILK AND ITS COMPONENTS..... | 937 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## Short communications

Bogolyubova A.V., Mishina E.E., Bogomolov P.O., Matsievich M.V., Kokina K.Yu., Mayorov A.Yu., Belousov P.V.

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| EXPRESSION OF TLR2, TLR3, TLR4 AND PROINFLAMMATORY TNF AND IL-6 CYTOKINES IN LIVER BIOPSIES OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE PATIENTS..... | 945 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Paskova E.V., Markelova E.V., Shakhgeldyan K.I., Geltser B.I., Kriger A.B.

|                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ROLE OF CYTOKINE-MEDIATED MECHANISMS IN DEVELOPMENT OF POST-TRAUMATIC MANDIBULAR OSTEOMYELITIS..... | 953 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Kanevskiy L.M., Grechikhina M.V., Kuzmina E.G., Mushkarina T.Yu., Spelkov A.A., Streltsova M.A., Kovalenko E.I.

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| DISTRIBUTION OF <i>MICA</i> ALLELES IN THE RUSSIAN POPULATION ..... | 959 |
|---------------------------------------------------------------------|-----|

Ramiliyeva I.R., Burkitbaev Zh.K., Abdurakhmanova S.A., Turganbekova A.A., Baimukasheva D.K., Zhiburt E.B.

|                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| DISTRIBUTION PATTERN FOR HLA SPECIFICITIES IN THE PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA..... | 965 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Gertsev A.V., Ischuk V.N., Zakrevsky Yu.N.

|                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IMPACT OF ANXIETY AND DEPRESSIVE DISORDERS ON THE NEUROPEPTIDE-CYTOKINE STATUS OF IMMUNE SYSTEM IN VARIOUS VARIANTS OF THE CLINICAL COURSE OF CHRONIC ISCHEMIC HEART DISEASE ..... | 973 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Olsufieva A.V., Bodrova I.V., Vasanina K.A., Olsufiev S.S.

|                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RELATIONSHIPS BETWEEN GLANDULAR AND LYMPHOID TISSUES IN HUMAN TONGUE AND PHARYNGEAL WALLS IN POSTNATAL ONTOGENESIS ..... | 981 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## Immunological methods

Trofimov A.V., Ischenko A.M., Rak A.Ya., Sergeeva V.E., Simbirtsev A.S., Gamaleya N.B., Berzina A.G., Stankova N.V., Ulyanova L.I., Klimova T.A.

|                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| PREPARATION AND PROPERTIES OF MURINE ANTIIDIOTYPIC MONOCLONAL ANTIBODIES RECOGNIZING PRIMARY RABBIT POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST MORPHINE DERIVATIVES ..... | 987 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

Zueva E.V., Khamitova I.V., Melichkina A.M., Lazarenko L.L., Bakanina L.A., Totolian Areg A.

|                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IN VITRO ALLERGY DIAGNOSIS: A COMPARATIVE ANALYSIS OF IgE SPECIFIC TO THE INHALANT ALLERGENS, OBTAINED BY IMMULITE AND PHADIA ASSAY SYSTEMS ..... | 997 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| Instructions to Authors ..... | 1005 |
|-------------------------------|------|

|                    |      |
|--------------------|------|
| Author index ..... | 1008 |
|--------------------|------|

|                     |      |
|---------------------|------|
| Subject index ..... | 1008 |
|---------------------|------|



## НЕЙРОИММУНОЭНДОКРИННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В КОЖЕ

Башкина О.А., Самотруева М.А., Ажикова А.К., Пахнова Л.Р.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Астрахань, Россия

**Резюме.** В работе рассматриваются современные представления о нейроиммуноэндокринной регуляции физиологических и патофизиологических процессов в коже. Приводятся сведения, указывающие на сложные механизмы межклеточных взаимодействий комплексных регулирующих систем (нервной, иммунной, эндокринной) на уровне кожи в норме и в посттравматический период. Описываются механизмы участия эндокринной и нервной систем в иммуноиндуцированном воспалении кожи. В подтверждение излагается информация о локализации на клеточных мембранах иммунокомпетентных клеток и лейкоцитов адренергических рецепторов, о регулирующем влиянии гипоталамуса на иммунитет, о разнонаправленном действии на воспаление симпатической и парасимпатической нервной системы и т.д.

Приводятся достаточно доказательств того, что клетки иммунной системы и физиологически активные вещества, экспрессируемые ими, способствуют активации процессов восстановления при многих патофизиологических изменениях в коже. Характер течения и восстановление ран кожи зависят от типа повреждения, степени и фазы раневого процесса. Зачастую посттравматический репаративный потенциал кожи ограничивается инфекционным процессом, инициированным микрофлорой раны, продуктами распада клеток и некротическими тканями. Причинно-следственную связь доказывает развитие воспаления, реализующегося посредством включения реакций иммунной защиты. Увеличенная зона некроза и нагноения в ране свидетельствует об ингибировании системы фагоцитирующих макрофагов. Однако при активации системы фагоцитирующих макрофагов происходит формирование в ранние сроки соединительнотканной капсулы вокруг очага воспаления.

Затрагивается проблема репаративной регенерации кожи, которая имеет большое медико-социальное значение в связи со значительной распространенностью травматизма и его тяжелых последствий, сопровождающихся выраженными косметическими дефектами. Формирование на их фоне нейрокогнитивных нарушений приводит к снижению качества жизни больного, к развитию социальной дезадаптации и дальнейшей изоляции. Раскрывается роль нервной системы и психоэмоциональных расстройств в генезе кожных проявлений, что обосновывает необходимость дальнейшего развития современного научного направления — психодерматологии.

Понимание молекулярных механизмов нейроиммунокутаных взаимодействий открывает новые перспективы в лечении ряда кожных заболеваний и управляемой активации восстановительных процессов поврежденной кожи. Опираясь на представленный научный обзор, можно сделать вывод об

---

### Адрес для переписки:

Ажикова Альфия Кадыровна  
ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
414000, Россия, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121.  
Тел.: 8 (909) 372-17-66.  
E-mail: alfia-imacheva@mail.ru

### Address for correspondence:

Azhikova Alfiya K.  
Astrakhan State Medical University  
414000, Russian Federation, Astrakhan, Bakinskaya str., 121.  
Phone: 7 (909) 372-17-66.  
E-mail: alfia-imacheva@mail.ru

---

### Образец цитирования:

О.А. Башкина, М.А. Самотруева, А.К. Ажикова, Л.Р. Пахнова «Нейроиммуноэндокринная регуляция физиологических и патофизиологических процессов в коже» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5. С. 807-820. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-807-820  
© Башкина О.А. и соавт., 2019

### For citation:

O.A. Bashkina, M.A. Samotruueva, A.K. Azhikova, L.R. Paknnova "Neuroimmunoendocrine regulation of the skin functioning", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 807-820. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-807-820  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-807-820

актуальности дальнейшего исследования репаративных возможностей кожи в условиях взаимодействия регуляторных систем гомеостаза.

*Ключевые слова:* нейроиммунокутанные взаимодействия, патологический процесс, репаративная регенерация, регуляция регенерации, нейроиммуноэндокринные взаимодействия

## NEUROIMMUNOENDOCRINE REGULATION OF THE SKIN FUNCTIONING

**Bashkina O.A., Samotrueva M.A., Azhikova A.K., Paknnova L.R.**

*Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation*

**Abstract.** The review deals with modern ideas of neuroimmunoendocrine regulation of physiological and pathophysiological processes in skin. The present data are provided which indicate to composite mechanisms of intercellular interactions in complex regulating systems (nervous, immune, endocrine) acting at the level of skin in normal conditions, as well during the posttraumatic period. We describe different modes for participation of endocrine and nervous systems in immunologically induced skin inflammation. The data are provided confirming localization of adrenergic receptors on membranes of immunocompetent cells and leukocytes, on regulatory effects of hypothalamus upon immune functions, about multidirectional actions upon inflammation of sympathetic and parasympathetic nervous system etc.

There are sufficient data on promotion of pathophysiological changes and reconstitution processes in the skin due to effects of local immune cells and bioactive substances expressed by them. The course of skin wound regeneration depend on the type of damage, degree and a phase of healing process. Posttraumatic reparative potential of skin is often limited by the infectious processes initiated by local microflora, products of cell disintegration and necrotic tissues. The cause-effect relationship is proven by arising inflammation which is implemented by inclusion of immune protection responses. The increased necrotic area and suppuration of the wound occurs due to inhibition of system of the phagocytizing macrophages. However, activation of this system brings about formation of the connective tissue capsule around the inflammation focus within early terms.

We also discuss the issues of reparative skin regeneration which of great medico-social value, in connection with considerable prevalence of traumatic events and their social consequences, followed by expressed cosmetic defects. Evolving neurocognitive problems lead to decreased quality of the patient's life, development of social disadaptation and further deprivation. The role of nervous system and psychological frustration in genesis of skin manifestations requires future development of the modern scientific direction, i.e., psychodermatology.

Understanding of molecular mechanisms regulating the neuroimmunocutaneous interactions offers new prospectives in treatment of some skin diseases, as well as activation of the damaged skin recovery. According to the data presented in the review article, one may conclude on relevance of further studies on reparative potential of skin under interactions of homeostatic regulatory systems.

*Keywords:* neuroimmunological interactions, skin, pathological process, reparative regeneration

## Введение

Нарушение морфофункционального состояния кожи, ее репаративных возможностей лежит в основе развития кожных заболеваний инфекционно-воспалительного, аутоиммунного и аллергического генеза [31]. Определение механизмов воспаления, особенностей регенерации при повреждениях кожи и поиск путей коррекции остаются актуальными задачами медико-биологической науки, дерматологии и косметологии.

Неизбежным следствием любого травматического воздействия на кожу является образование раны, повреждение слоев кожи. В условиях ране-

вого процесса происходит не только разрушение клеток и нарушение морфологической архитектуры слоев кожи, но и дисбаланс регуляторных систем организма [17]. При поражении поверхностных слоев кожи регенерация осуществляется за счет кератиноцитов волосяных фолликулов и потовых желез, расположенных в глубоких слоях дермы. При более глубоких повреждениях кожи восстановление происходит за счет миграции и размножения кератиноцитов соседних участков эпидермиса. Сложность течения травматических ран, структурные преобразования поврежденной кожи, ее функциональный и репаративный по-

тенциал обусловлены изменениями кутанного гомеостаза, характером физиологической регуляции организма.

#### **Механизмы нейроиммуноэндокриннокутанных взаимодействий**

В последние годы в исследовании патогенеза заболеваний кожи и ее восстановительного потенциала особое внимание отводится изучению регуляции этих процессов со стороны нейроиммуноэндокринной системы [45, 47]. Функциональная активность данной системы осуществляется только в условиях равновесия всех ее многокомпонентных звеньев [15, 68]. Многочисленные исследования указывают на определенные механизмы, посредством которых реализуются межсистемные связи между иммунной и нейроэндокринной системами при патологических изменениях кожи [71, 74, 78, 94, 97].

Учитывая тесную взаимосвязь между кожей, иммунной, нервной и эндокринной системами, вызывает интерес роль нарушений функций нейроэндокринной и иммунной систем организма в патогенезе воспалительных заболеваний и травматических повреждений кожи. Подтверждением участия этих систем в репаративных процессах кожи служит тот факт, что иммунокомпетентные клетки и нейроны секретируют в кровь или кожу нейромедиаторы и факторы роста, которые участвуют в механизмах нейрогенного и иммунологически индуцированного воспаления кожи [27, 52]. Специфические морфологические, иммунофизиологические и нейроэндокринные изменения на уровне кожи в условиях воспаления указывают на дисрегуляторные нарушения функций нервной, иммунной и эндокринной систем и лежат в основе концепции нейро-эндокринно-иммунно-кожной системы (НЭИКС), предложенной L. Misery [86]. Согласно данной концепции, основными процессами, определяющими сохранение гомеостатических параметров любой ткани, и в частности кожи, являются клеточное обновление, дифференцировка и клеточная гибель. Адекватный физиологическим потребностям организма баланс данных процессов является результатом комплекса стимулирующих и тормозящих сигналов, изменяющих экспрессию генов, инициирующих их реаранжировку и переключение биосинтеза одних сигнальных молекул на другие. Концепция L. Misery также подтверждает важную роль нарушений нейроиммуноэндокринных взаимодействий на уровне кожи в патогенезе кожных заболеваний.

Механизм нейроиммуноэндокринных взаимодействий на уровне кожи можно представить следующим образом: клетками локальной нерв-

ной и эндокринной системы секретируются интерлейкины, интерфероны и другие медиаторы иммуномодуляции, а также гуморальные факторы (норадреналин, ацетилхолин, серотонин, вещество Р, кортикотропин, соматотропин, окситоцин, вазопрессин и др.). Нейроактивные и гуморальные вещества, экспрессируемые в кожу, изменяют химическое окружение иммунокомпетентных дермальных клеток [17, 86]. При этом рецепторы на мембранах лимфоцитов, воспринимающая модификация химического состава нейромедиаторов, нейропептидов и других активных молекул, делают чувствительными сами лимфоциты. Клетки начинают реагировать, приспосабливаясь, синтезируя различные биологически активные факторы. В свою очередь, иммунная система посылает молекулярные сигналы (лейкотриены, простагландины, цитокины), активируя или ингибируя аксональный транспорт, в зависимости от химической природы воздействующего фактора [17].

Активными звеньями нейроиммуноэндокринной системы кожи являются кератиноциты эпидермиса, тучные и эндотелиальные клетки дермы, тогда как секретируемые и экспрессируемые ими вещества (серотонин, мелатонин, хромогранин А, эндотелиальная синтаза оксида азота, антигены клеток Лангерганса CD 1a, антигены главного комплекса гистосовместимости II класса HLA-DR) выступают в качестве сигнальных молекул для координации межклеточных взаимодействий. На этот факт указывают тесные разнонаправленные корреляционные связи между показателями экспрессии нейроэндокринных, иммунных молекул и внутриклеточных молекул, контролирующими процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток кожи.

#### **Нервная регуляция процессов в коже**

В регуляции физиологических процессов в коже ведущая роль отводится нервной системе. Наиболее иннервирована подкожная клетчатка, представленная миелиновыми афферентными волокнами, образующими все виды сенсорных рецепторов во всех слоях кожи. В эпидермисе и сосочковом слое дермы присутствуют свободные нервные окончания, ответственные за тактильную, температурную и болевую чувствительность. В нормальной коже дендриты афферентных и эфферентных нервных волокон и специфических нервных образований — инкапсулированных телец — формируют рецепторный внутриэпидермальный аппарат кожи и участвуют в образовании несвободных инкапсулированных и неинкапсулированных нервных окончаний. Кожная иннервация представляет собой важный

модулятор нормального восстановления поврежденной кожи [55].

В условиях повреждения кожного покрова, нарушения барьерной функции кожи ее клетки становятся уязвимыми для действия нейроактивных веществ, которые усугубляют процессы воспаления, тем самым замедляя регенерацию кожного дефекта. Например, у больных atopическим дерматитом иннервация в зоне поражений кожи претерпевает ряд изменений: свободные нервные окончания активизируются, нервные волокна уплотняются и гипертрофируются [7]. После активации периферийные нейроны освобождают нейромедиаторы и нейропептиды, которые непосредственно действуют на клетки иммунной системы. Показано, что они также модулируют функциональную активность сенсорных нейронов периферической нервной системы, обуславливая зуд при аллергическом дерматите [43]. Соматосенсорные и висцеральные афферентные нейроны высвобождают определенные нейропептиды, ответственные за аллергическое воспаление (пептид, связанный с геном кальцитонина, вещество Р и вазоактивный интестинальный пептид) [4]. Кроме того, вегетативные нейроны продуцируют нейротрансмиттеры, например, ацетилхолин и норадреналин, которые сигнализируют иммунным клеткам, ответственным за иммуногенное воспаление в коже [62].

Имеются данные о важной роли нейрорегуляторных медиаторов в процессе заживления раны кожи на разных этапах эмбрионального и постнатального онтогенеза [5, 12, 44, 49]. Установлено, что нейромедиаторы и специфические рецепторы, локализованные между окончаниями сенсорного и вегетативного пучка нервных волокон, непосредственно участвуют в разных фазах репарации поврежденной кожи [18].

Понимание механизмов, с помощью которых кожная иннервация модулирует заживление ран на разных уровнях онтогенеза [25], определяет возможность управления регуляторными процессами и способствует скорейшему заживлению ран.

Важность нервной регуляции при повреждениях кожи обусловлена ее трофической и индуктивной стимуляцией репаративных процессов в коже. Оба вида активируют восстановление кожи благодаря «инерции морфогенеза», даже при прекращении нейротканевых взаимодействий в условиях травмы, в связи со способностью синтезировать функционально активные молекулы. Такие «нейротропные» субстанции ответственны за передачу сигналов от тканей к нервам, идущих

по чувствительным нервным волокнам от проприорецепторов.

Трофическое влияние медиаторов нервной системы особенно необходимо на первых этапах регенеративного процесса в коже. Экспериментально доказана регулирующая роль нервной системы в индуктивной стимуляции регенерации кожи в условиях ожоговой раны [54]. Показано в эксперименте, что после спонтанного термического ожога кожи наблюдается экспрессия вещества Р, нейрокинина А, пептида, связанного с геном кальцитонина, вазоактивного интестинального пептида и нейропептида Y. В зависимости от особенностей трофики к 7 месяцам эксперимента показано разное количество нервных волокон по сравнению с интактной кожей: повышенное — в «нормотрофических» рубцах, пониженное — в гипертрофических рубцах. Наряду с этим, выявлено равное содержание в таких рубцах нервных волокон, экспрессирующих нейропептиды [59].

За регуляцию процессов репарации в поврежденной коже ответственны такие структуры головного мозга, как кора больших полушарий, переднее и заднее гипоталамические поля, гиппокамп, ядра шва, ретикулярная формация, лимбическая система [45]. Выделяют несколько путей трансляции сигналов от мозга к коже: через эффекторные нейроны рефлекторной дуги, нейромедиаторные системы, через вовлечение нейропептидных молекул, корригирующих интенсивность восстановительных процессов и модулирующих иммунный ответ в коже [36, 47]. Доказана роль центральных нейромедиаторных (серотонинергической, ГАМК-ергической, допаминергической) систем в регуляции функционирования иммунного комплекса [37], в том числе и на уровне кожи. Причем это возможно лишь при реализации гипоталамо-гипофизарных взаимодействий. В частности, доказано, что при atopическом дерматите наблюдается «блокада» гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (НРА). По-видимому, это связано с дефектами НРА-оси и неэффективной иммунорегуляцией, ведущими к aberrантным иммунным реакциям и последующему хроническому обострению заболевания [33].

Работами последних лет доказана важная роль периферической нервной системы в развитии воспалительного ответа в тканях, в том числе и в коже, путем регуляции активности локальной иммунной системы [87]. Двухнаправленная связь между нейронными клеточными популяциями и главными эффекторными клетками кожи определяет сложный механизм нейроиммунных взаи-

модействий между эозинофилами и сенсорными нервными волокнами. Так, например, при аллергическом дерматите патологические процессы обусловлены дисфункциями иммунной системы кожи и периферической нервной системы [35]. У больных дерматологическими заболеваниями изменяется уровень нейротрофинов, нейропептидов и нейропептид-положительных нервных волокон, модулирующих функциональную активность сенсорных нейронов и иммунцитов [90]. Подтверждением этому служит тот факт, что нейропептиды, экспрессируемые рецепторами кожи, имеют высокое сродство к эпидермальным клеткам и способны модифицировать функциональную активность кератиноцитов, клеток Лангерганса, тучных клеток, дермальных капиллярных эндотелиальных клеток и иммунцитов кожи [37, 76, 96].

Подтверждением нейрокутаных взаимодействий при различных патологических изменениях кожи является развитие такого направления, как психодерматология [41]. Многочисленные исследования подтверждают негативное влияние стресса и психоневрологических нарушений на развитие кожных высыпаний и появление зуда [30, 33, 35, 41, 43, 45, 46]. Известны факты обострения крапивницы при дисрегуляционной патологии высших отделов нервной системы [30, 75]. Доказано, что стресс является наиболее частым триггерным фактором в развитии и прогрессировании псориаза [33, 40]. Установлен факт исчезновения симптомов псориаза по мере улучшения психического состояния больного, а также в процессе терапии психомодулирующими средствами [40]. В развитии атопического дерматита также ведущую роль играют когнитивные расстройства и психоэмоциональная нагрузка [58, 98].

Учитывая дисрегуляционные особенности течения кожных заболеваний, многие ученые склоняются к нейрогенной теории развития дерматозов, обусловленных нейрогенным воспалением [82]. Следовательно, у больных с психоэмоциональными и поведенческими расстройствами имеет место нейрогенный патогенетический механизм развития кожной патологии. Наряду с этим, установлено, что такие хронически рецидивирующие дерматозы, как атопический дерматит, псориаз, истинная экзема, могут сами по себе провоцировать психические расстройства, что подтверждает концепцию межсистемного взаимодействия при различных повреждениях кожи [65, 66].

На характер воспалительной реакции в коже влияет взаимообусловленность нейрогенных

и иммунных звеньев. Нейропептиды и нейротрансмиттеры, выделяемые иннервирующими кожу нервами, в ответ на активацию симпатической нервной системы, изменяют репаративные возможности клеток Лангерганса, тучных клеток и иммунцитов кожи. К примеру, при атопическом дерматите главная роль в обеспечении внутриклеточных взаимодействий трех регуляторных систем отводится кожным нейропептидам, продуцируемым С-вегетативными нервными волокнами так называемой нехолинергической-неадренергической иннервации [66].

#### **Гуморальная регуляция функций кожи**

Исследованиями последних лет показано, что клетки кожи сами способны синтезировать биологически активные вещества в виде гормонов, нейропептидов и нейротрансмиттеров [56, 63, 89]. Они осуществляют регуляцию в течение длительного времени и обеспечивают адаптивную перестройку обменных процессов во многих клетках. Данный факт позволяет рассматривать кожу как единый нейроэндокринный орган.

Нейрогуморальные влияния на кожу осуществляются также опиоидными нейропептидами ( $\alpha$ ,  $\beta$ -эндорфины, мет-энкефалины), тахикининами (субстанция Р, нейротензин) и иммунопептидами (тетины) [50, 51, 77, 84, 89].

Опиоидные нейропептиды ( $\alpha$ ,  $\beta$ -эндорфины, мет-энкефалины) обладают широким спектром биологической активности, главная роль связана с нейроопосредованными физиологическими процессами: поведение, модуляция болевой чувствительности, стрессорные адаптивные процессы. Кроме того, доказано их участие в регуляции нейродегенеративных процессов при травматических повреждениях. Экспериментально обоснована роль  $\alpha$ ,  $\beta$ -эндорфинов в поведенческих и ноцицептивных реакциях при стрессе и в регуляции циркадных ритмов [73]. Метионин-энкефалин обладает эффектами локальной регуляции соматических функций, контроля поведенческих реакций. Доказана его иммуномодулирующая и противоопухолевая активность [83].

Среди неопиоидных нейропептидов большой интерес вызывают тахикинины (субстанция Р, нейротензин), которые характеризуются широким спектром физиологической активности, регулируя артериальное давление, капиллярную проницаемость и сокращение гладкой мускулатуры. Так, вещество Р является базовым иммунореактивным нейротрансмиттером нехолинергических нервных рецепторов, локализованных в эпидермисе вокруг кровеносных сосудов. Главной функцией субстанции Р является передача нервных импульсов между нейронами, иммуно-

цитами, кератиноцитами и клетками Лангерганса. Вещество Р стимулирует тучные клетки, которые в результате могут выделять вазоактивный интестинальный пептид и фактор роста нервов. Экспрессия данного нейропептида из периферических сенсорных нервных окончаний кожи приводит к увеличению секреции, развитию отечности, вазодилатации в коже, к высвобождению гистамина из тучных клеток кожи. Наряду с кининами, простагландинами, серотонином, гистамином, оно определяет миграцию лейкоцитов, изменение тонуса микрососудов, увеличение их проницаемости, развитие болевой реакции и появление зуда [56, 62]. Так, например, у больных атопическим дерматитом наблюдается повышенное содержание вещества Р [64]. Установлено участие субстанции Р в воспалительных процессах при крапивнице, что обосновывается анатомической связью между клетками Лангерганса, кровеносными сосудами и окончаниями нервных волокон [63]. Данный факт позволяет считать субстанцию Р первичным медиатором боли и нейрогенного воспаления кожи.

В последние годы в понимании регуляторных механизмов регенерации все чаще встает вопрос о локальных нейроиммуокутанных взаимодействиях, где важную роль играют тетины — особые иммунные биорегуляторы, синтезируемые непосредственно в очаге воспаления. Благодаря данным пептидам клетки иммунной системы в процессах кооперации передают сигналы непосредственно друг другу. Образуются тетины в результате ферментативного протеолиза пептидно-белковых предшественников иммуноглобулинов и других белков плазмы, а также гормонов. Селективность действия тетинов обеспечивается строгой локализацией их образования. На уровне кожи свое действие проявляют тетины — тафтсин и ригин. Так, тафтсин проявляет иммуномодулирующую активность, стимулируя фагоцитарную активность гранулоцитов и моноцитов/макрофагов. Биологическое действие тафтсина обусловлено активацией образования макрофагами супероксидных и нитроксидных радикалов, что сопровождается усилением их переваривающей способности [64]. Кроме того, доказано, что данный агент не только стимулирует фагоцитоз, но способен оказывать эффект и на другие стадии иммунного ответа, продлевая жизнь экспериментальным животным со злокачественными новообразованиями. Имеются работы, доказывающие, что тафтсин способен при некоторых условиях подавлять иммунологические реакции; при этом иммуносупрессивные эффекты тафтсина

реализуются через потенцирование процесса образования макрофагов-супрессоров [64, 69]. Биологический эффект ригина заключается в стимуляции фагоцитоза и антителообразования за счет стимуляции синтеза антител и неспецифических факторов иммунитета (лизоцима и т. д.) [80].

#### **Иммунологическая регуляция функций кожи**

Наряду с нейрогуморальной регуляцией, физиологические и патофизиологические процессы в коже управляются и сложным комплексом иммунных реакций. В коже наблюдаются все типы иммунопатологических процессов, что находит проявление при фотодерматозах, контактной гиперчувствительности, лимфопролиферации [88]. Иммунологическая регуляция процессов повреждения кожи заключается в ингибировании патологических процессов за счет иммунного «воспаления», в способности к изоляции, пресингу, презентации антигенов и развитию локального иммунного ответа [20].

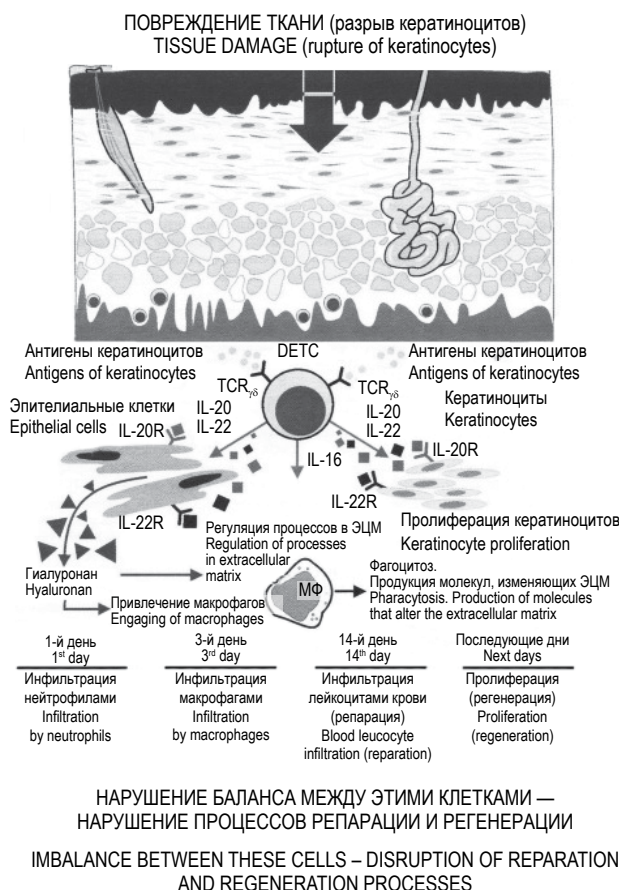
Впервые о коже как генераторе локальных иммунных реакций и месте развития гиперчувствительности замедленного типа упоминается в трудах М.В. Sulzbergera еще в 1942 году [23]. Позднее, в 80-х годах 20 века, исследователем J.W. Streinlein впервые была сформулирована концепция о лимфоидной ткани кожи SALT — skin-associated lymphoid tissue — ткани, ассоциированной с кожей, но тесно связанной с другими звеньями иммунитета [69]. С позиций данной концепции, кожу рассматривают как лимфоэпителиальный орган, обеспечивающий лимфоцитам микроокружение и условия для реализации иммунного ответа. По убеждению J.W. Streinlein, к этой ткани относятся антигенпрезентирующие клетки, кератиноциты, Т-лимфоциты, лимфатические узлы, а также тучные клетки, макрофаги, гранулоциты, эндотелий лимфатических и кровеносных сосудов. Нарушения функциональной активности таких клеток лежат в основе патогенеза ряда заболеваний: псориаза, Т-клеточной лимфомы, атопического дерматита и др. [38, 67, 72].

Клетки кожи обладают способностью инициировать как локальный, так и системный ответ на антигены [61]. Первыми в ответ на эти воздействия выступают эпидермальные клетки, элиминируя путем частичного отшелушивания поверхностного рогового слоя либо путем фагоцитоза [75]. К основным участникам иммунных реакций в коже относятся макрофаги, клетки Лангерганса, тканевые базофилы, гистиоциты, тучные клетки, кератиноциты, лимфоциты и гранулоциты крови, модулирующие иммунный от-

вет [69]. Регенерация кожи при ее повреждениях характеризуется активацией кератиноцитов, фибробластов, эндотелиальных клеток, макрофагов и тромбоцитов [56, 60, 99]. Механизм участия этих клеток в репарации кожной раны можно представить следующим образом (рис. 1 [39]).

Травматическое повреждение кожи, сопровождающееся проникновением внутрь чужеродного материала, индуцирует продукцию цитокинов кератиноцитами и клетками Лангерганса, а вслед за этим — макрофагов и эндотелиальных клеток [80]. Привлеченные макрофаги регулируют процессы экстрацеллюлярного матрикса и фагоцитируют остатки кератиноцитов после травмы [22, 100]. В условиях микробной контаминации антигенпрезентирующие клетки представляют антиген, трансформируются в дендритные клетки и перемещаются по дерме в лимфатические узлы [24, 70]. При этом клетки Лангерганса приобретают способность взаимодействовать с Т-хелперами, которые затем активируют В-клетки и частично дифференцируются в эффекторные лимфоциты и клетки памяти. Указанная последовательность событий зависит от количественного баланса клеток на различных этапах регенерации, так как его изменение сопровождается нарушением восстановительных процессов [85]. Эффективный исход репарации раневого дефекта возможен лишь при нормальном течении процессов миграции, пролиферации клеток, структурных преобразований экстрацеллюлярного матрикса, ремоделирования новообразованных тканей.

Поскольку иммунокомпетентные клетки играют важную роль в воспалительном процессе, репаративная регенерация кожи напрямую зависит от морфофункционального состояния иммунной системы [86]. Имеется достаточно доказательств того, что утрата восстановительного потенциала ткани (органа) напрямую связана с иммунокомпетентностью данной ткани или целого организма [31, 86]. К примеру, у больных с тяжелой ожоговой травмой наблюдаются «истощение» адаптивных способностей иммунной системы и нарушение формирования адекватного ответа на возможные бактериально-вирусные агрессии вследствие гиперергической реакции симпато-адреналовой системы [72]. Установлено, что нейромедиаторы и пептидные факторы роста, экспрессируемые в коже, проявляют иммунорегуляторные свойства. Выдвинуто предположение, что благодаря этому усиливается митогенетический потенциал клеток кожи в период восстановления раны [53].



**Рисунок 1. Механизм репарации и регенерации кожи после травматического повреждения [39]**

Figure 1. Mechanism of skin repair and regeneration after traumatic injury [39]

В литературе имеются сведения о том, что иммунокомпетентные клетки участвуют в регуляции репаративной регенерации тканей, активируя морфогенез [34]. Установлено, что благоприятное «безрубцовое» закрытие кожной раны зависит от количественных соотношений, качественных взаимодействий и функциональных возможностей фагоцитов и антигенпрезентирующих клеток. Доказано их стимулирующее иммунное влияние на течение сменяющихся стадий заживления кожных ран [34]. В соответствии с вовлеченностью различных клеток кожи в реализацию репаративных процессов ученые выделяют 4 стадии заживления: гемостаз (остановка кровотечения), воспаление, пролиферация (зарастание), матурация (созревание). Так, на этапе гемостаза в центральной и периферической части раны в большом количестве обнаруживаются клетки Лангерганса (CD68), эффекторные макрофаги (CD163), выполняющие функцию антигенпредставления погибших клеток макрофагам. На этапе воспаления преобладают эффек-

торные макрофаги (CD163), фагоцитирующие поврежденные ткани и бактериальную флору, а также секретирующие цитокины для репаративных процессов и миграции иммунцитов в зону воспаления. Этапу пролиферации соответствует наивысшая активность гена Ki67, приводящая к разрастанию кератиноцитов из эпидермиса по краям ожоговой раны и находящихся на дне волосяных фолликулов и в потовых железах гиподермы. Для этапа матурации характерно снижение количества макрофагов и клеток Лангерганса в зоне ожоговой раны. Уменьшение макрофагов и увеличение количества фибробластов способствуют выработке фактора роста эндотелия. Последний стимулирует рост кровеносных сосудов в соединительной ткани, прилежащей к эпидермису, что приводит к образованию грубых келоидных рубцов и неблагоприятному закрытию

ожоговой раны. Вышеизложенное подтверждает вовлеченность иммунофагоцитов и антиген-презентирующих клеток в регенераторный процесс [42].

## Заключение

Таким образом, репаративный потенциал кожи определяет характер ее морфофункциональных преобразований, косметический результат раневых процессов [57, 79]. Концептуальный подход к пониманию молекулярных механизмов нейроиммуноэндокринной регуляции физиологических и патофизиологических процессов в коже [81, 85, 91, 92, 93, 95] позволит расширить возможности управляемой регенерации в случае повреждения кожи, объективного контроля за течением репаративных процессов в ней.

## Список литературы / References

1. Балаболкин И.И. Крапивница у детей: клинико-патогенетические варианты, диагностика и лечение // Российский педиатрический журнал, 2017. Т. 20, № 2. С. 122-128. [Balabolkin I.I. Urticaria in children: clinical and pathogenetic variants, diagnosis and treatment. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal = Russian Pediatric Journal*, 2017, Vol. 20, no. 2, pp. 122-128. (In Russ.)]
2. Боровик Т.Э., Макарова С.Г., Дарчия С.Н., Гамалеева А.В., Грибакин С.Г. Кожа как орган иммунной системы // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2010. Т. 89, № 2. С. 132-136. [Borovik T.E., Makarova S.G., Darchiya S.N., Gamaleeva A.V., Gribakin S.G. Skin it is organ of the immune system. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. Speransky Journal*, 2010, Vol. 89, no. 2, pp. 132-136. (In Russ.)]
3. Валиуллина А.Р., Нурмухаметова И.Ф. К вопросу о патогенезе псориаза: психологический аспект // Научные исследования: от теории к практике, 2015. Т. 5, № 6. С. 157-159. [Valiullina A.R., Nurmukhametova I.F. To a question of a psoriasis pathogenesis: psychological aspect. *Nauchnye issledovaniya: ot teorii k praktike = Scientific Research: from the Theory to Practice*, 2015, Vol. 5, no. 6, pp. 157-159. (In Russ.)]
4. Варламов Е.Е., Пампура А.Н. Взаимосвязь аллергических и неаллергических заболеваний // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2018. Т. 97, № 2. С. 171-176. [Varlamov E.E., Pampura A.N. Interrelation of allergic and not allergic diseases. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. Speransky Journal*, 2018, Vol. 97, no. 2, pp. 171-176. (In Russ.)]
5. Горланов И.А., Леина Л.М., Милявская И.Р. Кожа новорожденных: дифференциальная диагностика патологических состояний, особенности ухода // Медицинский совет, 2013. Т. 2, № 3. С. 41-49. [Gorlanov I.A., Leina L.M., Milyavskaya I.R. Skin of newborns: differential diagnostics of pathological states, features of leaving. *Meditsinskiy sovet = Medical Advice*, 2013, Vol. 2, no. 3, pp. 41-49. (In Russ.)]
6. Григорьева И., Сергеев А., Манина И., Кудрявцева Е. Иммунопатология и биохимические основы терапии atopических состояний // Врач, 2012. № 4. С. 86-91. [Grigorieva I., Sergeyev A., Manina I., Kudryavtseva E. Immunopathology and biochemical bases of therapy of atopical states. *Vrach = Doctor*, 2012, no. 4, pp. 86-91. (In Russ.)]
7. Гребенченко Е.И., Гущин И.С., Феденко Е.С. Механизм кожного зуда при atopическом дерматите // Российский аллергологический журнал, 2009. № 3. С. 3-11. [Grebchenko E.I., Gushchin I.S., Fedenko E.S. The mechanism of a skin itch at an atopical dermatitis. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2009, no. 3, pp. 3-11. (In Russ.)]
8. Довгилева О.М., Хомулло Г.В., Петрова М.Б. Основные особенности репаративной регенерации кожи в условиях применения хитозана // Верхневолжский медицинский журнал, 2011. Т. 9, Вып. 3, № 11. С. 30-37. [Dovgileva O.M., Khomullo G.V., Petrova M.B. The main features of reparative regeneration of skin in the conditions of application of chitosan. *Verkhnevolzhskiy meditsinskiy zhurnal = Upper Volga Medical Journal*, 2011, Vol. 9, Iss. 3, no. 11, pp. 30-37. (In Russ.)]
9. Дороженко И.Ю., Романов Д.В., Матюшенко Е.Н. Опыт применения Кетилепта (кветиапина) при терапии зуда в дерматологической практике // Психические расстройства в общей медицине, 2010. № 1.



C. 39-44. [Dorozhenok I.Yu., Romanov D.V., Matyushenko E.N. Experience of application of Ketilept (kvetiapin) at therapy of an itch in dermatologic practice. *Psikhicheskie rasstroystva v obshchey meditsine = Mental Disorders in General Medicine*, 2010, no. 1, pp. 39-44. (In Russ.)]

10. Дороженок И.Ю., Матюшенко Е.Н., Олисова О.Ю. Дистморфобия у дерматологических больных с фациальной локализацией процесса // Российский журнал кожных и венерических болезней, 2014. Т. 17, № 1. С. 42-47. [Dorozhenok I.Yu., Matyushenko E.N., Olisova O.Yu. Dismorphophobia at dermatologic patients with facial localization of process. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney = Russian Journal of Skin and Venereal Diseases*, 2014, Vol. 17, no. 1, pp. 42-47. (In Russ.)]

11. Дороженок И.Ю. Клинико-терапевтические аспекты психических расстройств, коморбидных хроническим дерматозам // Доктор.Ру, 2010. № 4 (55). С. 64-67. [Dorozhenok I.Yu. Clinical and therapeutic aspects of psychic disorders comorbid to chronic dermatosis. *Doktor.Ru*, 2010, no. 4 (55), pp. 64-67. (In Russ.)]

12. Зорин В.Л., Зорина А.И., Черкасов В.Р., Копнин Б.Л., Деев Р.В., Неробеев А.И., Аликова А.В., Шеин А.В., Донецкая С. Применение аутогенных дермальных фибробластов для коррекции возрастных и других изменений кожи // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2010. Т. 5, № 3. С. 30. [Zorin V.L., Zorina A.I., Cherkasov V.R., Kopnin B.L., Deyev R.V., Nerobeyev A.I., Alikova A.V., Shein A.V., Donetskaya S. Application of autogenic thermal fibroblasts for correction of age and other changes of skin. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya = Cellular Transplantology and Fabric Engineering*, 2010, Vol. 5, no. 3, p. 30. (In Russ.)]

13. Каленова Л.Ф., Бажин А.С., Новикова М.А. Влияние метаболитов бактерий *Bacillus sp.* из вечной мерзлоты на скорость репарации кожной раны // Вестник новых медицинских технологий, 2014. Т. 21, № 4. С. 53-61. [Kalenova L.F., Bazhin A.S., Novikova M.A. Effects of metabolites of bacteria *Bacillus sp.* from permafrost on speed repair of skin wound. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*, 2014, Vol. 21, no. 4, pp. 53-61. (In Russ.)]

14. Корецкая Е.Ю. Иммунный статус у больных угревой болезнью, сочетанной с малассеозиозом кожи // Патология, 2013. № 3 (29). С. 90-93. [Koretskaya E.Yu. Immune status of patients with acne and concomitant skin malasseziosis. *Patologiya = Pathology*, 2013, no. 3 (29), pp. 90-93. (In Russ.)]

15. Корнева Е.А., Шанин С.Н., Новикова Н.С., Пугач В.А. Клеточно-молекулярные основы нейроиммунного взаимодействия при стрессе // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2017. Т. 103, № 3. С. 217-229. [Korneva E.A., Shanin S.N., Novikova N.S., Pugach V.A. Cellular and molecular bases of neuroimmune interaction at a stress. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*, 2017, Vol. 103, no. 3, pp. 217-229. (In Russ.)]

16. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В. Патофизиология нейроиммунных взаимодействий // Патогенез, 2010. Т. 8, № 1. С. 4-9. [Kryzhanovsky G.N., Magaeva S.V. Pathophysiology of neuroimmune interactions. *Patogenez = Pathogenesis*, 2010, Vol. 8, no. 1, pp. 4-9. (In Russ.)]

17. Лобеева Н.В., Цветикова Л.Н., Атякшин Д.А. Адаптация функциональных систем при действии на организм экзогенных физических и химических факторов: нейроиммуноэндокринологические аспекты // Прикладные информационные аспекты медицины, 2016. Т. 19, № 3. С. 124-133. [Lobeeva N.V., Tsvetikova L.N., Atyakshin D.A. Adaptation of functional systems with actson the body of exogenous physical and chemical factors: neyroimmunoendocrinological aspects. *Prikladnye informatsionnye aspekty meditsiny = Applied Information Aspects of Medicine*, 2016, Vol. 19, no. 3, pp. 124-133. (In Russ.)]

18. Максимова Н.В., Люндуп А., Любимов Р.О., Галина А., Николенко В.Н. Патофизиологические аспекты заживления ран в норме и при синдроме диабетической стопы // Вестник Российской академии медицинских наук, 2014. Т. 69, № 11-12. С. 110-117. [Maksimova N.V., Lyundup A.V., Lubimov R.O., Galina A., Nikolenko V.N. Pathophysiological aspects of wound healing in normal and diabetic foot. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2014, Vol. 69, no. 11-12, pp. 110-117. (In Russ.)]

19. Манжуло И.В., Дюйзен И.В. Нейрохимические изменения в ростральном вентромедиальном ядре продолговатого мозга крысы при развитии нейропатического болевого синдрома // Нейрохимия, 2015. Т. 32, № 3. С. 259-264. [Manzhulo I.V., Dyuzhen I.V. Neurochemical changes in the rostral ventromedial nucleus of the medulla oblongata in rats with developing neuropathic pain. *Neyrokhimiya = Neurochemical Journal*, 2015, Vol. 32, no. 3, pp. 259-264. (In Russ.)]

20. Маркелова Е.В., Юцковская Я.А., Бирко О.Н., Байбарина Е.В., Чепурнова Н.С. Иммунная система кожи: возрастные особенности // Клиническая дерматология и венерология, 2016. Т. 15, № 6. С. 4-10. [Markelova E.V., Yutskovskaya Ya.A., Birko O.N., Baibarina E.V., Chepurnova N.S. The immune system of the skin: the age peculiarities. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya = Clinical Dermatology and Venereology*, 2016, Vol. 15, no. 6, pp. 4-10. (In Russ.)]

21. Масляков В.В., Дралина О.И., Власенко Ю.Б. Особенности иммунной системы у пациентов с меланомой кожи // Вестник Калужского университета, 2017. № 2 (35). С. 91-95. [Maslyakov V.V., Dralina O.I., Vlasenko Yu.B. Features of the immune system at patients with a skin melanoma. *Vestnik Kaluzhskogo universiteta = Bulletin of Kaluga University*, 2017, no. 2 (35), pp. 91-95. (In Russ.)]

22. Масляков В.В., Федотова Е.В., Дралина О.И., Захаров Г.В. Особенности иммунной системы у пациентов с плоскоклеточным раком кожи в процессе оперативного лечения // Вестник Авиценны, 2014. № 1. С. 43-46. [Maslyakov V.V., Fedotova E.V., Dralina O.I., Zakharov G.V. Features of immune system in patients with skin squamous cell carcinoma during the surgical treatment. *Vestnik Avitsenny = Bulletin of Avicenna*, 2014, no. 1, pp. 43-46. (In Russ.)]
23. Махнева Н.В. Клеточные и гуморальные компоненты иммунной системы кожи // Российский журнал кожных и венерических болезней, 2016. Т. 19, № 1. С. 12-17. [Makhneva N.V. Cellular and humoral components of the immune system of the skin. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney = Russian Bulletin of Skin and Venereal Diseases*, 2016, Vol. 19, no. 1, pp. 12-17. (In Russ.)]
24. Мельников М.А. Татуировка: особенности удаления и физиология кожи. В кн.: Инновационное развитие науки и образования / под общ. ред. Г.Ю. Гуляева. Пенза: МЦНС «Наука и просвещение», 2017. С. 220-226. [Melnikov M.A. Tattoo: features of removal and physiology of skin. In the book: *Innovative development of science and education*. Gen. ed. G.Yu. Gulyaev]. Penza: Science and Education, 2017, pp. 220-226.
25. Мосейкин И.А., Левашова А.И., Мягкова М.А. Нейроиммунные механизмы развития болевого синдрома // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2017. № 1. С. 6-15. [Moseikin I.A., Levashova A.I., Myagkova M.A. Neuroimmune mechanisms of development of pain syndrome. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infektology*, 2017, no. 1, pp. 6-15. (In Russ.)]
26. Назаров Р.Н. Коррекция психонейроиммунных нарушений у больных atopическим дерматитом в процессе комплексного лечения // Вестник психотерапии, 2009. № 29. С. 47-51. [Nazarov R.N. Correction of psychoneuroimmunity disturbances in patients with atopic dermatitis during comprehensive treatment. *Vestnik psikhoterapii = Bulletin of Psychotherapy*, 2009, no. 29, pp. 47-51. (In Russ.)]
27. Орлова Е.А., Молотилев Б.А. Нейропептиды и «нейрогенное воспаление» в патогенезе крапивницы // Практическая медицина, 2011. Т. 3, № 51. С. 98-103. [Orlova E.A., Molotilov B.A. Neuropeptides and "neurogenetic inflammation" in an urticaria pathogenesis. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2011, Vol. 3, no. 51, pp. 98-103. (In Russ.)]
28. Пашкина Е.А., Гришина Л.В., Любимов Г.Ю., Козлов В.А. Влияние комплекса Тафтсина с кукурбит (7) урилом на гуморальный и клеточный иммунный ответ *in vivo* // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 367-369. [Pashkina E.A., Grishina L.V., Lubimov G.Yu., Kozlov V.A. Effect of peptide Tuftsin complex with Cucurbit [7] uril on the humoral and cellular immune responses *in vivo*. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 3, pp. 367-369. (In Russ.)]
29. Петрова Н.Н., Рукавишников Г.В. К вопросу о механизмах формирования психических расстройств при кожных заболеваниях различной локализации // Психическое здоровье, 2016. Т. 14, № 11 (126). С. 58-64. [Petrova N.N., Rukavishnikov G.V. The evaluation of the pathologic mechanisms of mental disorders comorbid with dermatoses of different localizations. *Psikhicheskoe zdorovye = Mental Health*, 2016, Vol. 14, no. 11 (126), pp. 58-64. (In Russ.)]
30. Прибытков А.А., Орлова Е.А. Психогенная крапивница: вопросы диагностики и оптимизации терапии // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика, 2014. № 3. С. 21-26. [Pribytkov A.A., Orlova E.A. Psychogenic urticaria: the issues of diagnosis and optimization of therapy. *Nevrologiya, neyropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatic Medicine*, 2014, no. 3, pp. 21-26. (In Russ.)]
31. Пэйнелиус Я., Мери С. Взгляд на дерматологические болезни через систему комплемента // Косметика и медицина, 2015. № 3. С. 46-59. [Peynelius Ya., Mary S. Vision on dermatologic diseases through the system of a complement. *Kosmetika i meditsina = Cosmetics and Medicine*, 2015, no. 3, pp. 46-59. (In Russ.)]
32. Разнатовский К.И. Нейрогуморальные и иммунные нарушения при хронических дерматозах и методы их комплексной терапии // Эффективная фармакотерапия, 2014. № 48. С. 6-9. [Raznatovsky K.I. Neurohumoral and immune violations at chronic dermatoses and methods of their complex therapy. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2014, no. 48, pp. 6-9. (In Russ.)]
33. Разумная Ф.Г., Зарудий Ф.С., Капулер О.М. Психоземotionalные факторы в этиологии и патогенезе псориаза // Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития, 2016. № 7. С. 9. [Razumnaya F.G., Zarudiy F.S., Kapuler O.M. Psychoemotional factors of the etiology and pathogenesis of psoriasis. *Meditsina: aktualnye voprosy i tendentsii razvitiya = Medicine: Topical Issues and Trends of Development*, 2016, no. 7, p. 9. (In Russ.)]
34. Рева И.В., Рева Г.В., Ямамото Т., Ямамото Т., Новиков А.С., Маломан Н.Ю., Гиря О.Ю., Лемешко Т.Н., Терехов С.М., Даниленко М.В., Недобылская Ю.П., Усов В.В., Митряшов К.В., Мартыненко Е.Е. Взаимодействие иммуноцитов в репаративной регенерации кожи // Фундаментальные исследования, 2013. № 9, ч. 3. С. 453-459. [Reva I.V., Reva G.V., Yamamoto T., Yamamoto T., Novikov A.S., Malomang N.Yu., Weight O.Yu., Lemeshko T.N., Terekhov S.M., Danilenko M.V., Nedobylskaya Yu.P., Whiskers V.V., Mitryashov K.V., Martynenko E.E. Interaction of immunocytes in reparative regeneration of skin. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2013, no. 9, Pt 3, pp. 453-459. (In Russ.)]

35. Рукавишников Г.В., Леденцова С.С., Петрова Н.Н., Смирнова И.О. Психическое состояние и качество жизни пациенток с акне в динамике терапии наружными ретиноидными препаратами // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина, 2013. № 3. С. 85-90. [Rukavishnikov G.V., Ledentsova S.S., Petrova N.N., Smirnova I.O. Psychiatric state and quality of life in patients with acne in dynamics of topical retinoid therapy. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Meditsina = Bulletin of St. Petersburg University. Medicine*, 2013, no. 3, pp. 85-90. (In Russ.)]
36. Смотровуева М.А., Теплый Д.Л., Тюренок И.В. Пути реализации нейро-иммуно-эндокринных взаимодействий // Естественные науки, 2009. № 4 (29). С. 112-130. [Samotrueva M.A., Teplyy D.L., Tyurenkov I.N. Ways of neuro-immuno-endocrine interactions realization. *Estestvennye nauki = Natural Sciences*, 2009, no. 4 (29), pp. 112-130. (In Russ.)]
37. Смотровуева М.А., Ясенявская А.Л., Цибизова А.А., Башкина О.А., Галимзянов Х.М., Тюренок И.Н. Нейроиммуноэндокринология: современные представления о молекулярных механизмах // Иммунология, 2017. Т. 38, № 1. С. 49-59. [Samotrueva M.A., Yaseniyavskaya A.L., Tsibizova A.A., Bashkina O.A., Galimzyanov H.M., Tyurenkov I.N. Neuroimmunoendocrinology: modern concepts of molecular mechanisms. *Immunologiya = Immunology*, 2017, Vol. 38, no. 1, pp. 49-59. (In Russ.)]
38. Самцов А.В., Лучина Е.Н. Роль иммунной системы в развитии рубцовых изменений кожи // Глобальный научный потенциал, 2012. № 11 (20). С. 26-29. [Samtsov A.V., Luchina E.N. The role of immune system in the development of skin scarring. *Globalnyy nauchnyy potentsial = Global Scientific Potential*, 2012, no. 11 (20), pp. 26-29. (In Russ.)]
39. Сепиашвили Р.И., Бережная Н.М. Система иммунитета как регулятор тканевого гомеостаза (регенерация, репарация, ремоделирование) // Аллергология и иммунология, 2015. Т. 16, № 1. С. 127-137. [Sepiashvili R.I., Berezhnaya N.M. Immune system as regulator of tissue homeostasis (regeneration, reparation, remodeling). *Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology*, 2015, Vol. 16, no. 1, pp. 127-137. (In Russ.)]
40. Силина Л.В., Харахордина Ю.Е., Ушаков Н.А., Карпова А.В., Ноздрин В.И. Изучение кожных проявлений и психосоматического статуса у больных псориазом при включении в комплексную терапию препаратов Уродерм и Нафтадерм® // Вестник последипломного медицинского образования, 2016. № 3. С. 15-24. [Silina L.V., Kharakhordina Yu.E., Ushakov N.A., Karpova A.V., Nozdrin V.I. Study of cutaneous manifestations and psychosomatic status in patients with psoriasis inclusion in the complex therapy of drugs Uroderm and Naphtaderm®. *Vestnik poslediplomnogo meditsinskogo obrazovaniya = Bulletin of Postdegree Medical Education*, 2016, no. 3, pp. 15-24. (In Russ.)]
41. Соболев В.В., Третьяков А.В., Рудько О.И., Соболева А.Г., Данилин И.Е., Корсунская И.М., Климов Е.А. Психодерматология: молекулярная общность псориаза и тревожного расстройства // Эффективная фармакотерапия, 2017. № 15. С. 10-15. [Sobolev V.V., Tretyakov A.V., Rudko O.I., Soboleva A.G., Danilin I.E., Korsunskaya I.M., Klimov E.A. Psychodermatology: molecular similarity of psoriasis and anxiety disorder. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2017, no. 15, pp. 10-15. (In Russ.)]
42. Судаков К.В., Иванова Е.А., Коплик Е.В., Котов А.В., Кравцов А.Н., Мещеряков А.Ф., Перцов С.С., Сотников С.В., Толпыго С.М., Умрюхин А.Е., Умрюхин П.Е. Иммунные звенья системной организации поведения // Успехи физиологических наук, 2011. Т. 42, № 3. С. 81-96. [Sudakov K.V., Ivanov E.A., Koplik E.V., Kotov A.V., Kravtsov A.N., Meshcheryakov A.F., Pertsov S.S., Sotnikov S.V., Tolpygo S.M., Umryukhin A.E., Umryukhin P.E. Immune links of the system organization of behavior. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk = Achievements of Physiological Sciences*, 2011, Vol. 42, no. 3, pp. 81-96. (In Russ.)]
43. Тамразова О.Б., Касьянова А.Н., Заплатникова А.Л. Особенности ухода за кожей при дерматозах у детей раннего возраста // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение, 2018. № 1 (2). С. 80-84. [Tamrazova O.B., Kasyanova A.N., Zaplatnikova A.L. Features of care of skin at dermatoses at children of an early age. *Russkiy meditsinskiy zhurnal. Meditsinskoe obozrenie = Russian Medical Journal. Medical Review*, 2018, no. 1 (2), pp. 80-84. (In Russ.)]
44. Турдалиева Б.Т. Острые аллергические заболевания кожи у детей (острая крапивница, отек Квинке) (обзор литературы) // Наука, новые технологии и инновации, 2017. № 9. С. 47-49. [Turdaliev B.T. Acute allergic skin disease in children (Acute urticaria, angioedema) (Literature review). *Nauka, novye tekhnologii i innovatsii = Science, New Technologies and Innovations*, 2017, no. 9, pp. 47-49. (In Russ.)]
45. Файзуллина Е.В., Давыдов Ю.В., Кузнецова Р.Г. Кожа и нервная система: зуд и боль // Практическая медицина, 2014. Т. 1, № 4 (80). С. 141-146. [Fayzullina E.V., Davydov Yu.V., Kuznetsova R.G. Skin and nervous system: itching and pain. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2014, Vol. 1, no. 4 (80), pp. 141-146. (In Russ.)]
46. Цепколенко А.В. Иммунная система и репаративный потенциал кожи // Дерматология та венерология, 2017. № 3 (77). С. 27-37. [Tsepkoenko A.V. Immune system and reparative skin potential. *Dermatologiya ta venerologiya = Dermatology and Venerology*, 2017, no. 3 (77), pp. 27-37. (In Russ.)]
47. Чикин В.В., Знаменская Л.Ф., Катунина О.Р., Львов А.Н., Фриго Н.В., Иноятова Л.А. Современные методологические подходы к изучению роли нейромедиаторов в патогенезе хронических воспалительных заболеваний кожи, сопровождающихся зудом // Вестник дерматологии и венерологии, 2012. № 5. С. 30-36.

[Chikin V.V., Znamenskaya L.F., Katunina O.R., Lvov A.N., Frigo N.V., Inoyatova L.A. The modern methods and approaches to studying of role of neurotransmitters in a pathogenesis of chronic inflammatory skin diseases accompanied with itching. *Vestnik dermatologii i venerologii = Bulletin of Dermatology and Venereology*, 2012, no. 5, pp. 30-36. (In Russ.)]

48. Шандра А.А., Шухтин В.В. Атопический дерматит и взаимодействие нервной, эндокринной и иммунной систем // Дерматология та венерология, 2015. № 2 (68). С. 30-41. [Shandra A.A., Shuhtin V.V. Atopic dermatitis and interaction of the nervous, endocrine and immune systems. *Dermatologiya ta venerologiya = Dermatology and Venereology*, 2015, no. 2 (68), pp. 30-41. (In Russ.)]

49. Шапошникова К.В., Башкина О.А., Логунов О.В., Кокуев А.В. Клинико-диагностическое значение компонентов комплемента при крапивнице и атопическом дерматите у детей // Астраханский медицинский журнал, 2013. Т. 8, № 2. С. 88-93. [Shaposhnikova K.V., Bashkina O.A., Logunov O.V., Kokuev A.V. Clinico-diagnostic significance of components of a complement in urticaria and atopic dermatitis in children. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal = Astrakhan Medical Journal*, 2013, Vol. 8, no. 2, pp. 88-93. (In Russ.)]

50. Шарова А.А. Кожа и тиреоидные гормоны // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология, 2013. № 3. С. 24-31. [Sharova A.A. The skin and thyroid hormones. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya dermatokosmetologiya = Experimental and Clinical Dermatocosmetology*, 2013, no. 3, pp. 24-31. (In Russ.)]

51. Шарова А.А. Роль системы гормон роста-инсулиноподобные факторы роста в физиологии кожи и патогенезе псориаза // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология, 2011. № 3. С. 38-42. [Sharova A.A. Role of growth hormone-insulin-like growth factor system in the physiology of the skin and in the pathogenesis of psoriasis. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya dermatokosmetologiya = Experimental and Clinical Dermatocosmetology*, 2011, no. 3, pp. 38-42. (In Russ.)]

52. Эбанойдзе Т., Беридзе Л., Твалишвили Г., Китуашвили Т. Нейроанатомические и нейрофизиологические аспекты зуда в лечении атопического дерматита // Аллергология и иммунология, 2010. Т. 11, № 2. С. 92-93. [Ebanoidze T., Beridze L., Tvaliashvili G., Kituashvili T. Neuroanatomic and neurophysiological aspects of itch in treatment of atopic dermatitis. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2010, Vol. 11, no. 2, pp. 92-93. (In Russ.)]

53. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Цомартова Д.А., Иванова М.Ю., Карташкина Н.Л., Черешнева Е.В. Органогенез кожи и дисморфогенетические основы патогенеза ее заболеваний (обзор) // Современные технологии в медицине, 2018. Т. 10, № 4. С. 195-202. [Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Tsomartova D.A., Ivanova M.Yu., Kartashkina N.L., Cheresheva E.V. Skin organogenesis and dysmorphogenetic factors in skin diseases (review). *Sovremennye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2018, Vol. 10, no. 4, pp. 195-202. (In Russ.)]

54. Altun V., Hakvoort T.E., van Zuijlen P.P., van der Kwast T.H., Prens E.P. Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodeling of human burn wound scars. A 7-month follow-up study of 22 patients. *Burns*, 2001, Vol. 27, no. 7, pp. 717-722.

55. Ashrafi M., Baguneid M., Bayat A. The role of neuromediators and innervation in cutaneous wound healing. *Acta Derm. Venereol.*, 2016, Vol. 96, no. 5, pp. 587-594.

56. Badarinath K., Dutta A., Hegde A., Pincha N., Gund R., Jamora C. Interactions between epidermal keratinocytes, dendritic epidermal T-cells, and hair follicle stem cells. *Methods Mol. Biol.*, 2019, Vol. 1879, pp. 285-297.

57. Belokhvostova D., Berzanskyte I., Cujba A.M., Jowett G., Marshall L., Prueller J., Watt F.M. Homeostasis, regeneration and tumour formation in the mammalian epidermis. *Int. J. Dev. Biol.*, 2018, Vol. 62, no. 6-7-8, pp. 571-582.

58. Blume-Peytavi U., Hauser M., Lünemann L., Stamatas G.N., Kottner J., Garcia Bartels N. Prevention of diaper dermatitis in infants – a literature review. *Pediatr. Dermatol.*, 2014, Vol. 31, no. 4, pp. 413-429.

59. Boyce S.T., Lalley A.L. Tissue engineering of skin and regenerative medicine for wound care. *Burns Trauma*, 2018, Vol. 6, p. 4.

60. Brancato S.K., Albina J.E. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am. J. Pathol.* 2011, Vol. 178, no. 1, pp. 19-25.

61. Cardamone C., Parente R., Feo G.D., Triggiani M. Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. *Immunol. Lett.*, 2016, no. 178, pp. 10-14.

62. Chéret J., Lebonvallet N., Carré J.L., Misery L., le Gall-Ianotto C. Role of neuropeptides, neurotrophins, and neurohormones in skin wound healing. *Wound Repair Regen.*, 2013, Vol. 21, no. 6, pp. 772-788.

63. Choi J.E., di Nardo A. Skin neurogenic inflammation. *Semin. Immunopathol.*, 2018, Vol. 40, no. 3, pp. 249-259.

64. Choi H., Kim D.J., Nam S., Lim S., Hwang J.S., Park K.S., Hong H.S., Won Y., Shin M.K., Chung E., Son Y. Substance P restores normal skin architecture and reduces epidermal infiltration of sensory nerve fiber in TNCB-induced atopic dermatitis-like lesions in NC/Nga mice. *J. Dermatol. Sci.*, 2018, Vol. 89, no. 3, pp. 248-257.

65. Chong M., Fonacier L. Treatment of eczema: corticosteroids and beyond. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2016, Vol. 51, no. 3, pp. 249-262.

66. Czarnowicki T., Krueger J.G., Guttman-Yassky E. Novel concepts of prevention and treatment of atopic dermatitis through barrier and immune manipulations with implications for the atopic march. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 139, no. 6, pp. 1723-1734.

67. Czarnowicki T., Krueger J.G., Guttman-Yassky E. Skin barrier and immune dysregulation in atopic dermatitis: an evolving story with important clinical implications. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2014, Vol. 2, no. 4, pp. 371-379.
68. Debroas G., Hoeffel G., Reynders A., Ugolini S. Neuroimmune interactions in the skin: a link between pain and immunity. *Med. Sci. (Paris)*, 2018, Vol. 34, no. 5, pp. 432-438.
69. Delavary B.M., van der Veer W.M., van Egmond M., Niessen F.B., Beelen R.H.J. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, 2011, Vol. 216, no. 7, pp. 753-762.
70. Dréno B., Araviiskaia E., Berardesca E., Gontijo G., Sanchez Viera M., Xiang L.F., Martin R., Bieber T. Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2016, Vol. 30, no. 12, pp. 2038-2047.
71. El-Serafi A.T., El-Serafi I.T., Elmasry M., Steinvall I., Sjöberg F. Skin regeneration in three dimensions, current status, challenges and opportunities. *Differentiation*, 2017, no. 96, pp. 26-29.
72. Farinas A.F., Bamba R., Pollins A.C., Cardwell N.L., Nanney L.B., Thayer W.P. Burn wounds in the young versus the aged patient display differential immunological responses. *Burns*, 2018, Vol. 44, no. 6, pp. 1475-1481.
73. Fell G.L., Robinson K.C., Mao J., Woolf C.J., Fisher D.E. Skin  $\beta$ -endorphin mediates addiction to UV light. *Cell*, 2014, Vol. 157, no. 7, pp. 1527-1534.
74. Haslam I.S., Roubos E.W., Mangoni M.L., Yoshizato K., Vaudry H., Kloepper J.E., Pattwell D.M., Maderson P.F., Paus R. From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skin biology. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 2014, Vol. 89, no. 3, pp. 618-655.
75. Kaplan A., Ledford D., Ashby M., Canvin J., Zazzali J.L., Conner E., Veith J., Kamath N., Staubach P., Jakob T., Stirling R.G., Kuna P., Berger W., Maurer M., Rosén K. Omalizumab in patients with symptomatic chronic idiopathic/spontaneous urticaria despite standard combination therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, no. 1, pp. 101-109.
76. Karlsson P., Nyengaard J.R., Polydefkis M., Jensen T.S. Structural and functional assessment of skin nerve fibres in small-fibre pathology. *Eur. J. Pain*, 2015, Vol. 19, no. 8, pp. 1059-1070.
77. Kiritsi D., Nyström A. The role of TGF $\beta$  in wound healing pathologies. *Mech. Ageing Dev.*, 2018, no. 172, pp. 51-58.
78. Larouche J., Sheoran S., Maruyama K., Martino M.M. Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, 2018, Vol. 7, no. 7, pp. 209-231.
79. Lovász M., Mattii M., Eyerich K., Gácsi A., Csányi E., Kovács D., Rühl R., Szegedi A., Kemény L., Stähle M., Zouboulis C.C., Eyerich S., Töröcsik D. Sebum lipids influence macrophage polarization and activation. *Br. J. Dermatol.*, 2017, Vol. 177, no. 6, pp. 1671-1682.
80. Lucas T., Waisman A., Ranjan R., Roes J., Krieg T., Mtiller W., Roers A., Eming S.A. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 7, pp. 3964-3977.
81. Lugović-Mihić L., Ljubesić L., Mihić J., Vuković-Cvetković V., Troskot N., Situm M. Psychoneuroimmunologic aspects of skin diseases. *Acta Clin. Croat.*, 2013, Vol. 52, no. 3, pp. 337-345.
82. Mellgren S.I., Nolano M., Sommer C. The cutaneous nerve biopsy: technical aspects, indications, and contribution. *Handb. Clin. Neurol.*, 2013, no. 115, pp. 171-188.
83. Meng Y., Gao X., Chen W., Plotnikoff N.P., Griffin N., Zhang G., Shan F. Methionine enkephalin (MENK) mounts antitumor effect via regulating dendritic cells (DCs). *Int. Immunopharmacol.*, 2017, no. 44, pp. 61-71.
84. Meyer N.H., Gibbs B., Schmelz M., Homey B., Raap U. Neurophysiology of atopic pruritus. *Hautarzt*, 2018, Vol. 69, no. 3, pp. 204-209.
85. Miniati A., Weng Z., Zhang B., Stratigos A.J., Nicolaidou E., Theoharides T.C. Neuro-immuno-endocrine processes in vitiligo pathogenesis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2012, Vol. 25, no. 1, pp. 1-7.
86. Misery L. Atopic dermatitis and the nervous system. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2011, Vol. 41, no. 3, pp. 259-266.
87. Mousa S.A., Shaqura M., Brendl U., Al. Khrasani M., Fürst S., Schäfer M. Involvement of the peripheral sensory and sympathetic nervous system in the vascular endothelial expression of ICAM-1 and the recruitment of opioid-containing immune cells to inhibit inflammatory pain. *Brain Behav. Immun.*, 2010, Vol. 24, no. 8, pp. 1310-1323.
88. Naik S., Bouladoux N., Wilhelm C., Molloy M.J., Salcedo R., Kastenmuller W., Deming C., Quinones M., Koo L., Conlan S., Spencer S., Hall J.A., Dzutsev A., Kong H., Campbell D.J., Trinchieri G., Segre J.A., Belkaid Y. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science*, 2012, no. 337, pp. 1115-1119.
89. Ohanyan T., Schoepke N., Eirefelt S., Hoey G., Koopmann W., Hawro T., Maurer M., Metz M. Role of substance p and its receptor neurokinin 1 in chronic prurigo: a randomized, proof-of-concept, controlled trial with topical aprepitant. *Acta Derm. Venereol.*, 2018, Vol. 98, no. 1, pp. 26-31.
90. Peters E.M., Liezmann C., Klapp B.F., Kruse J. The neuroimmune connection interferes with tissue regeneration and chronic inflammatory disease in the skin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2012, no. 1262, pp. 118-126.

91. Plikus M.V., van Spyk E.N., Pham K., Geyfman M., Kumar V., Takahashi J.S., Andersen B. The circadian clock in skin: implications for adult stem cells, tissue regeneration, cancer, aging, and immunity. *J. Biol. Rhythms*, 2015, Vol. 30, no. 3, pp. 163-182.
92. Polat A.İ., Yiş U., Ayanoglu M., Hız A.S., Güleriyüz H., Öztürk Atasoy T., Boerkoel C.F. Importance of neurologic and cutaneous signs in the diagnosis of Schimke immuno-osseous dysplasia. *Turk. J. Pediatr.*, 2015, Vol. 57, no. 5, pp. 509-513.
93. Syzon O.O., Dashko M.O., Fedorova U.V. Modern specific features and therapy of psoriasis and arthropathic psoriasis courses. *Wiad. Lek.*, 2018, Vol. 71, no. 2, Pt 1, pp. 322-325.
94. Theoharides T.C., Stewart J.M., Taracanova A., Conti P., Zouboulis C.C. Neuroendocrinology of the skin. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2016, Vol. 17, no. 3, pp. 287-294.
95. Tobin D.J. Introduction to skin aging. *J. Tissue Viability*, 2017, Vol. 26, no. 1, pp. 37-46.
96. Üçeyler N., Vollert J., Broll B., Riediger N., Langjahr M., Saffer N., Schubert A.L., Siedler G., Sommer C. Sensory profiles and skin innervation of patients with painful and painless neuropathies. *Pain*, 2018, Vol. 159, no. 9, pp. 1867-1876.
97. Voisin T., Bouvier A., Chiu I.M. Neuro-immune interactions in allergic diseases: novel targets for therapeutics. *Int. Immunol.*, 2017, Vol. 29, no. 6, pp. 247-261.
98. Weidinger S., Beck L.A., Bieber T., Kabashima K., Irvine A.D. Atopic dermatitis. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2018, Vol. 4, no. 1, p. 1.
99. Wilgus T.A. Immune cells in the healing skin wound: influential players at each stage of repair. *Pharmacol. Res.*, 2008, Vol. 58, no. 2, pp. 112-116.
100. Wood F.M. Skin regeneration: the complexities of translation into clinical practise. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2014, no. 56, pp. 133-140.

---

**Авторы:**

**Башкина О.А.** — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой факультетской педиатрии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Астрахань, Россия

**Самотруева М.А.** — д.м.н., заведующая кафедрой фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Астрахань, Россия

**Ажикова А.К.** — к.б.н., доцент кафедры биологии и ботаники ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Астрахань, Россия

**Пахнова Л.Р.** — заочный аспирант кафедры факультетской педиатрии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Астрахань, Россия

---

**Authors:**

**Bashkina O.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Faculty Pediatrics, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

**Samotrueva M.A.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

**Azhikova A.K.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Biology and Botany, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

**Pakhnova L.R.**, Postgraduate Student, Department of Faculty Pediatrics, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

---

Поступила 04.12.2018  
Отправлена на доработку 07.12.2018  
Принята к печати 27.12.2018

---

Received 04.12.2018  
Revision received 07.12.2018  
Accepted 27.12.2018

## АНАЛИЗ ЦИТОАРХИТЕКТониКИ TLR2<sup>+</sup> И TLR4<sup>+</sup> ЛИМФОЦИТОВ И ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ *Gp2*, *Spi-B*, *Nf-κB1*, *c-REL*, *TNFα* И *TNFr* В КАЛТ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЙ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА

Деген А.С.<sup>1</sup>, Коваль Г.Д.<sup>2</sup>, Сухомлинова И.Е.<sup>1</sup>, Морозова О.В.<sup>1</sup>, Камышный А.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

<sup>2</sup> Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы, Украина

**Резюме.** Критически важными в развитии СД 1 типа являются изменения состояния кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) и состава микробиома кишечника как в условиях экспериментального STZ-индуцированного диабета, так и при развитии СД 1 типа у людей и хронического воспаления за счет стимуляции врожденного звена иммунитета. Одним из наиболее важных посредников во взаимодействии между кишечным микробиомом и КАЛТ являются специализированные М-клетки фолликул-ассоциированного эпителия, обеспечивающие транцитотическую доставку антигенов подлежащим лимфоидным структурам. Вспомогательную роль в образовании М-клеток играет и TNFα-сигнализация. Поэтому целью нашей работы было изучение особенностей экспрессии TLRs и транскрипционной активности генов *Gp2*, *Spi-B*, *Nf-κB1*, *c-Rel*, *TNFα* и *TNFr* в КАЛТ при экспериментальном сахарном диабете (ЭСД) и после введения пентоксифиллина. Для идентификации TLR2<sup>+</sup> клеток и TLR4<sup>+</sup> клеток применяли иммунофлюоресцентный метод с использованием моноклональных антител к соответствующим паттерн-распознающим рецепторам. Для изучения транскрипционной активности генов использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР). В ходе развития экспериментальной патологии длительностью 2 и 4 недели наблюдалось снижение суммарной плотности TLR2<sup>+</sup> и TLR4<sup>+</sup> лимфоцитов в СПСОВ и ИЛФ подвздошной кишки крыс. При этом плотность TLR2 на мембране иммунопозитивных клеток увеличивалась у малых, а TLR4 – у средних и малых лимфоцитов. Введение пентоксифиллина диабетическим крысам приводило к снижению суммарной плотности TLR2<sup>+</sup> клеток на 2-й неделе развития патологии и к увеличению данного показателя на 4-й неделе. Суммарная плотность TLR4<sup>+</sup> клеток демонстрировала динамику к росту только в СПСОВ на 2-й неделе развития ЭСД на фоне введения пентоксифиллина. Изменения плотности TLR2 и TLR4 на поверхности лимфоцитов носили разнонаправленный характер. Развитие диабета нашло свое отражение и в транскрипционной индукции генов ключевых транскрипционных факторов NF-κB1 и c-Rel в клетках КАЛТ как на 2-й, так и на 4-й неделе развития ЭСД. Тогда как введение пентоксифиллина достоверно снижало уровень нормализованной экспрессии мРНК NF-κB1 в течение всего срока наблюдений и увеличивало данный показатель для мРНК c-Rel на 2-й неделе. Отмечен рост нормализованной

### Адрес для переписки:

Деген Анна Сергеевна

Запорожский государственный медицинский университет  
69035, Украина, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26.  
Тел.: +38 (067) 935-45-83, (099) 069-52-28.  
E-mail: annadegenjena@gmail.com

### Address for correspondence:

Degen Anna S.

Zaporozhye State Medical University  
69035, Ukraine, Zaporozhye, Mayakovsky ave., 26.  
Phone: +38 (067) 935-45-83, (099) 069-52-28.  
E-mail: annadegenjena@gmail.com

### Образец цитирования:

А.С. Деген, Г.Д. Коваль, И.Е. Сухомлинова, О.В. Морозова, А.М. Камышный «Анализ цитоархитектоники TLR2<sup>+</sup> и TLR4<sup>+</sup> лимфоцитов и транскрипционной активности генов *Gp2*, *Spi-B*, *Nf-κB1*, *c-Rel*, *TNFα* и *TNFr* в КАЛТ крыс при экспериментальном сахарном диабете и после введения пентоксифиллина» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5. С. 821-834. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-821-834

© Деген А.С. и соавт., 2019

### For citation:

A.S. Degen, G.D. Koval, I.E. Sukhomlinova, O.V. Morozova, A.M. Kamyshnyi "Analysis of cytoarchitectonics of TLR2<sup>+</sup> and TLR4<sup>+</sup> lymphocytes and transcriptional activity of the genes *Gp2*, *Spi-B*, *Nf-κB1*, *c-Rel*, *TNFα* and *TNFr* in GALT of rats in experimental diabetes mellitus and after pentoxifylline administration", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 821-834. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-821-834

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-821-834

экспрессии маркеров М-клеток Gp2 и Spi-B как на 2-й, так и на 4-й неделе развития экспериментальной патологии. Введение пентоксифиллина диабетическим животным в большей степени нашло свое отражение в изменении интенсивности экспрессии мРНК маркера зрелых М-клеток Gp2 — данный показатель увеличивался на 2-й неделе развития патологии, а на 4-й демонстрировал динамику к снижению. Развитие ЭСД приводило к достоверному повышению уровня нормализованной экспрессии провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  и его рецептора TNFr и демонстрировало динамику к снижению на фоне введения пентоксифиллина диабетическим животным.

**Ключевые слова:** экспериментальный сахарный диабет, кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань, TLR2, TLR4, М-клетки, пентоксифиллин

## ANALYSIS OF CYTOARCHITECTONICS OF TLR2<sup>+</sup> AND TLR4<sup>+</sup> LYMPHOCYTES AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF THE GENES *Gp2*, *Spi-B*, *Nf- $\kappa$ B1*, *c-REL*, *TNF $\alpha$* AND *TNFr* IN GALT OF RATS IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS AND AFTER PENTOXIFYLLINE ADMINISTRATION

Degen A.S.<sup>a</sup>, Koval G.D.<sup>b</sup>, Sukhomlinova I.E.<sup>a</sup>, Morozova O.V.<sup>a</sup>, Kamyshnyi A.M.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

<sup>b</sup> Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

**Abstract.** Changes in the state of gut-associated lymphoid tissue (GALT) and the composition of the intestinal microbiome, both in experimental STZ-induced diabetes and in development of type 1 diabetes in humans as well as chronic inflammation due to stimulation of innate immunity are crucially important in the development of type 1 diabetes mellitus. One of the most important mediators for interactions between the intestinal microbiome and GALT are specialized M cells of the follicle-associated epithelium, providing transcytotic delivery of antigens to the underlying lymphoid structures. TNF $\alpha$ -signaling also plays a supporting role in the formation of M cells. Therefore, the aim of our work was to study some features of TLRs expression and transcriptional activity of the *Gp2*, *Spi-B*, *Nf- $\kappa$ B1*, *c-Rel*, *TNF $\alpha$*  and *TNFr* genes in GALT in experimental diabetes mellitus (EDM), and after pentoxifylline administration. To identify TLR2<sup>+</sup> cells and TLR4<sup>+</sup> cells, an immunofluorescence method was used with monoclonal antibodies to corresponding pattern-recognizing receptors. To study the transcriptional activity of genes, the method of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used. In the course of developing experimental pathology, at the terms of 2 and 4 weeks, a decrease in the total density of TLR2<sup>+</sup> and TLR4<sup>+</sup> lymphocytes was observed in lamina propria of villus (villus) and subepithelial zone isolated lymphoid follicles (ILF) of rat ileum. At the same time, the density of TLR2 on the membrane of immunopositive cells was increased for small lymphocytes, and TLR4 density has become higher in medium and small lymphocytes. The pentoxifylline administration to diabetic rats resulted in a decrease in the total density of TLR2<sup>+</sup> cells at the 2<sup>nd</sup> week of development of the pathology, and an increase in this index at the 4<sup>th</sup> week. The total density of TLR4<sup>+</sup> cells showed changing growth rates only in villus at the 2<sup>nd</sup> week of EDM development in the presence of pentoxifylline. Changes in the density of TLR2 and TLR4 on the surface of lymphocytes were multidirectional. The development of diabetes is also reflected in the transcriptional induction of genes of the key transcription factors NF- $\kappa$ B1 and c-Rel in GALT cells at both the 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> week of the development of EDM. Meanwhile, administration of pentoxifylline resulted in a significantly reduced level of normalized expression of NF- $\kappa$ B1 mRNA during the entire observation period and increased this indicator for c-Rel mRNA at the 2<sup>nd</sup> week. The growth of normalized expression of markers of M cells Gp2 and Spi-B was observed both on the 2<sup>nd</sup> and on the 4<sup>th</sup> week of the development of experimental pathology. Administration of pentoxifylline to diabetic animals was largely reflected in the change in the intensity of mRNA expression of the mature M cell Gp2 marker. This parameter was increased during the 2<sup>nd</sup> week of developing pathology, and on the 4<sup>th</sup> week, a downward trend was shown. The development of EDM led to a significantly increased level of near-normalized expression of proinflammatory TNF $\alpha$  cytokine and its receptor TNFr, and demonstrated a trend towards their decrease following pentoxifylline administration in diabetic animals.

**Keywords:** experimental diabetes mellitus, gut-associated lymphoid tissue, TLR2, TLR4, M cells, pentoxifylline



## Введение

Помимо генетической предрасположенности, триггерами развития СД 1 типа являются изменения состояния кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) и состава микробиома кишечника как индуктора развития феномена «подтекания» (“leaky gut”) слизистой ЖКТ и хронического воспаления за счет стимуляции врожденного звена иммунитета [4]. Ряд исследователей указывает на изменения состава кишечного микробиома как в условиях экспериментального STZ-индуцированного диабета, так и при развитии СД 1 типа у людей [20, 22, 27], что приводит к закономерному изменению уровня микроб-ассоциированных молекулярных паттернов (ММП) для рецепторов врожденного иммунитета (РВИ).

Ранее мы показали изменения экспрессии NOD-подобных рецепторов (NLR), являющихся сенсорами структурных компонентов бактериального пептидогликана — мурамилдипептидов [1], а также сенсоров вирусной РНК RIG-I-рецепторов в КАЛТ крыс при экспериментальном сахарном диабете (ЭСД) [5]. Кроме того, еще одним критическим триггером старта и прогрессии СД 1 типа является изменение интенсивности экспрессии мембранных Toll-подобных рецепторов (TLRs). В последние годы описана конститутивная экспрессия TLR-клетками адаптивного звена иммунного ответа, а именно Т-лимфоцитами [9]. При этом TLR2 и TLR4, распознающие лиганды практически всего микробного мира, передают активационный сигнал через адапторные молекулы MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM, что приводит к формированию активных димеров ядерного фактора NF-κB — RelA (p65), c-Rel, RelB и белков-предшественников NF-κB1 (p105) и NF-κB2 (p100). Димеры NF-κB далее транспортируются в ядро и индуцируют транскрипцию генов провоспалительных цитокинов и хемокинов (TNFα, IL-1β, IL-18, IL-12, IL-6, CXCL8), костимулирующих молекул (CD40, CD80 и CD86) [10].

Среди таких NF-κB-индуцируемых цитокинов важную роль в старте и прогрессии СД 1 типа играет TNFα, основным источником которого являются макрофаги и активированные Т-лимфоциты КАЛТ [23]. У NOD-мышей, дефицитных по TNFR1, наблюдается устойчивость к старту СД 1 типа, а инсулит протекает в более легкой форме. Вместе с тем у данных животных отмечалось увеличение количества Treg и усиление их супрессорной активности. Возможно, что блокада TNF-сигналинга — это один из механизмов активизации функций Treg и супрессии СД 1 типа [8]. Одним из неселективных блокаторов TNFα является пентоксифиллин.

Критически важным посредником во взаимодействии между кишечным микробиомом и КАЛТ являются специализированные М-клетки фолликул-ассоциированного эпителия [19], способные фагоцитировать макромолекулы и микроорганизмы, доставляя их подлежащим лимфоидным структурам для индукции иммунных реакций. На апикальной мембране М-клеток экспрессируется гликопротеин Grp2 [21], а их дифференцировку регулирует транскрипционный фактор Spi-B [25]. Важную вспомогательную роль в образовании М-клеток играет и TNFα-сигнализация [29]. Поэтому **целью нашей работы** было изучение особенностей экспрессии TLRs и транскрипционной активности генов *Grp2*, *Spi-B*, *Nf-κB1*, *c-Rel*, *TNFα* и *TNFR* в КАЛТ при экспериментальном сахарном диабете (ЭСД) и после введения пентоксифиллина.

## Материалы и методы

Исследования были проведены на 80 самцах крыс линии Wistar. Животные были получены из питомника ООО «Биомодельсервис» (Киев). Экспериментальные животные были разделены на 5 экспериментальных групп: контрольные крысы, которым однократно внутривентрально вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (pH = 4,5) (группа 1); крысы с 14-дневным ЭСД (группа 2); крысы с 28-дневным ЭСД (группа 3); крысы с 14-дневным (группа 4) и с 28-дневным ЭСД (группа 5), которым перорально ежедневно в течение, соответственно, 2 и 4 недель вводили пентоксифиллин в дозе 9 мг/кг, начиная с 1 дня индукции диабета. Стрептозотоцин (STZ) (SIGMA Chemical, США) вводили крысам внутривентрально в дозе 50 мг/кг, разведенным в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (pH 4,5) перед моментом введения. Определение концентрации глюкозы в крови, которую брали из хвостовой вены, проводили глюкозооксидазным методом с использованием прибора BIONIME Rightest GM 110 (Швейцария) через 12 часов и на 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 и 28 суток после инъекции STZ. Измерение уровня гликемии проводили через 6 часов с момента последнего приема пищи. На 3 сутки после введения стрептозотоцина для дальнейших исследований отбирали животных с уровнем гликемии натощак > 8,0 ммоль/л.

Структуру популяции TLR2- и TLR4-клеток изучали на основе анализа серийных гистологических срезов и данных их морфометрических и денситометрических характеристик. Для проведения данного исследования на ротационном микротоме MICROM HR-360 (Microm, Германия) делали 5-микронные серийные срезы подвздошной кишки, которые потом депарафинировали в ксилоле, проводили регидратацию

в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%), отмывали в 0,1 М фосфатном буфере (pH = 7,4) и инкубировали с первичными кроличьими моноклональными антителами (МКАТ) к TLR2- и TLR4-рецепторам крысы, конъюгированными с FITC (Santa Cruz Biotechnology, США) в течение 18 часов во влажной камере при  $T = 4^{\circ}\text{C}$ . После инкубации срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером и заключали в смесь глицерина и фосфатного буфера (9:1) для дальнейшего изучения при помощи люминесцентной микроскопии. Обработанные гистологические срезы изучали при помощи компьютерной программы ImageJ (NIH, США). Изображение, полученное на микроскопе PrimoStar (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) при помощи высокочувствительной камеры AxioCam 5c (ZEISS, Германия) и пакета программ для получения, архивации и подготовки изображений к публикации AxioVision 4.7.2 (ZEISS Германия), немедленно вводилось в компьютер. При этом в автоматическом режиме определялись зоны со статистически значимой флуоресценцией, характерной для клеток, экспрессирующих TLR2 и TLR4. Определялись морфометрические и денситометрические характеристики иммунопозитивных клеток, абсолютная (количество клеток на 1 мм<sup>2</sup> площади среза) и относительная (%) плотность распределения TLR2- и TLR4-лимфоцитов. Плотность TLR2- и TLR4-рецепторов на мембране лимфоцитов определяли, учитывая интенсивность флуоресценции идентифицированных клеток и неспецифическую флуоресценцию препарата (так называемый фон). На основании этих показателей вычислялась скорректированная клеточная флуоресценция (в условных единицах интенсивности флуоресценции УЕИФ): Integrated Density (интегрированная плотность) – (площадь выделенных клеток  $\times$  среднюю флуоресценцию фона). При окрашивании МКАТ определяли TLR2- и TLR4-клетки, расположенные в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок (СПСОВ) и в субэпителиальной зоне изолированных лимфоидных фолликулов (ИЛФ), которые являются, соответственно, эффекторными и индуктивными зонами иммунного ответа в КАЛТ.

Для анализа экспрессии генов использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР). В ходе этого исследования кусочки ткани, залитые в парафин, нарезами на микротоме (толщина среза 15 мкм) и помещали в пробирки Эппендорфа (Eppendorf AG, Германия) депарафинировали путем инкубации последовательно, дважды в ксилоле, по 5 минут каждый, затем последовательно, дважды в 100% этаноле, в течение 5 минут каждый.

Выделение тотальной РНК из тканей крыс проводили согласно протоколу с использованием набора Trizol RNA Prep 100 («ИЗОГЕН», РФ), который содержит следующие реагенты: Trizol reagent и ExtraGene E. Концентрацию и качество выделенной тотальной РНК определяли на спектрофотометре Libra S32PC (Biochrom Ltd., Великобритания). Для последующей процедуры обратной транскрипции отбирали образцы РНК со следующими показателями (по соотношениям оптической плотности A260 / A280): 260 нм/280 нм = 2, 260 нм/230 нм = 1,8–2,2.

Для обратной транскрипции (синтез кДНК) использовали «Набор реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ)» («СИНТОЛ», РФ). RT-PCR проводили на конечном объеме 25 мкл, содержащем 10 мкл готовой реакционной смеси 2,5X, 11 мкл деионизированной H<sub>2</sub>O, 1 мкл праймеров Random-6, 1 мкл обратной транскриптазы и 2 мкг РНК. Обратную транскрипцию проводили при 45 °C в течение 45 минут с последующим нагреванием в течение 5 мин при 92 °C. Амплификацию проводили на приборе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с мастер-миксом Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). Финальная реакционная смесь для амплификации включала краситель SYBR Green, ДНК-полимеразу Maxima HotStartTaq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого и обратного специфических праймеров, 1 мкл матрицы (кДНК). Реакционную смесь доводили до общего объема 25 мкл добавлением деионизированной H<sub>2</sub>O. Специфические пары праймеров (5'-3') для анализа исследованных и референсного генов были подобраны с помощью программного обеспечения PrimerBlast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) и изготовлены фирмой Metabion (Германия) (см. табл. 1).

После начальной денатурации в течение 10 мин при 95 °C амплификация состояла из 45 циклов и проводилась при таких условиях: денатурация – 95 °C, 15 с, отжиг – 59–61 °C, 30–60 с, элонгация – 72 °C, 30 с. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследованных генов был использован ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH). Относительное нормализованное количество кДНК целевых генов определяли по методу Ct. Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, США). В эксперимент были включены негативные контроли: без добавления кДНК-матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК-матрицы в синтезе кДНК, без добавления фермента в син-

ТАБЛИЦА 1. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

TABLE 1. SPECIFIC PRIMERS WHICH WERE USED IN REAL-TIME RT-PCR

| Ген<br>Gen                         | Нуклеотидная последовательность<br>праймера<br>Nucleotide sequence of the primer | $T_{m1}$ , °C<br>$T_{m2}$ , °C | Длина<br>продукта<br>ПЦР, п. н.<br>PCR product<br>length, n. p. | Экзон-экзонный<br>стык<br>Exon-exon joint |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <i>Gp2</i>                         | F = ACTCCCCGAAGTACAGGGTT<br>R = AGACAGGCAGGAAGAACGTG                             | 60<br>60                       | 55                                                              | 1633/1634                                 |
| <i>SpiB</i>                        | F = GAACCACCATGCTTGCTCTG<br>R = TCTGGGTACTGCAAACAGCTT                            | 59<br>60                       | 70                                                              | 59/60                                     |
| <i>Nfkb1</i>                       | F = ATATGCACCGTGACAGCAGG<br>R = GTTTGCAAAGCCAACCACCA                             | 60<br>60                       | 51                                                              | 752/753                                   |
| <i>cRel</i>                        | F = GTCAAGGGAAGGAGCTGTCTG<br>R = GGATTATATCCGCCGAGCCC                            | 60<br>60                       | 41                                                              | 64/65                                     |
| <i>Tnf</i><br>( <i>TNFA</i> )      | F = CTCGAGTGACAAGCCCGTAG<br>R = GCTTGGTGGTTTGCTACGAC                             | 60<br>60                       | 45                                                              | 433/434                                   |
| <i>Tnfrsf1a</i><br>( <i>TNFR</i> ) | F = AACGGCTTGACACTGCAGAC<br>R = CACAGCATACAGCATCGCAG                             | 61<br>60                       | 41                                                              | 1315/1316                                 |
| <i>GAPDH</i><br>(NM_017008.4)      | F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG<br>R = GCCTGCTTCACCACCTTCT                              | 61<br>60                       | 52                                                              | 825/826                                   |

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер;  $T_m$  – температура плавления.

Note. F, direct primer; R, reverse primer;  $T_m$ , melting point.

тезе кДНК. Все реакции амплификации проводили на индивидуальных образцах в трех повторах.

Все полученные экспериментальные данные обрабатывались на персональном компьютере пакетом прикладных и статистических программ Excel из пакета MS Office 2010 (Microsoft Corp., США), Statistica 13 (TIBCO Software Inc., 2018). Для всех показателей рассчитывали значения средней арифметической выборки ( $M$ ), ее дисперсии и ошибки средней ( $m$ ). Для определения достоверности отличий результатов исследования в экспериментальных и контрольных группах животных определяли коэффициент Стьюдента ( $t$ ), потом определяли вероятность разницы выборок ( $p$ ) и доверительный интервал средней. Критичный уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

## Результаты

Введение экспериментальным животным STZ приводило к развитию ЭСД. Таким образом, на второй неделе развития патологического процесса концентрация глюкозы в крови у крыс линии Wistar увеличивалась в 3,1 раза ( $9,78 \pm 0,71$  ммоль/л,  $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем ( $3,13 \pm 0,12$  ммоль/л), на 28-й день увеличивалась в 2,1 раза ( $6,48 \pm 0,84$  ммоль/л,  $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем ( $3,13 \pm 0,12$  ммоль/л). А также появлялись все основные симптомы, характерные для сахарного диабета 1 типа (полидипсия, гиперфагия и полиурия). Изучение

серийных срезов подвздошной кишки контрольных крыс линии Wistar, предварительно инкубированных с МКАТ к TLR2 рецепторам крысы показало, что суммарная плотность TLR2<sup>+</sup> клеток в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок (СПСОВ) составляла  $70 \pm 1$  на 1 мм<sup>2</sup>, что приблизительно совпадает с их количеством и в субэпителиальной зоне изолированных лимфоидных фолликулов (ИЛФ) (рис. 1А).

Развитие диабета сопровождалось снижением суммарной плотности TLR2<sup>+</sup> клеток в СПСОВ на 37% ( $p < 0,05$ ) на 14-й день и в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) на 28-й день экспериментального сахарного диабета, а в ИЛФ на 26% ( $p < 0,05$ ) на 14-й день и в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) на 28-й день экспериментального сахарного диабета по сравнению с контролем (рис. 1А).

Введение диабетическим животным пентоксифиллина сопровождалось достоверным снижением суммарной плотности популяции TLR2<sup>+</sup> клеток в СПСОВ на 41% ( $p < 0,05$ ) на 14-й и увеличением этого показателя на 81% ( $p < 0,05$ ) на 28-й день развития ЭСД (рис. 1Б). На фоне введения пентоксифиллина наблюдались изменения и в субэпителиальной зоне ИЛФ. Так, суммарная плотность популяции TLR2<sup>+</sup> клеток на 2-й неделе развития патологии снижалась на 14% ( $p < 0,05$ ), но уже на 4 неделе возрастала на 84% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группами диабетических животных, которым препарат не вводили (рис. 1Б).

Измерение интенсивности флюоресценции TLR2<sup>+</sup> клеток, что отображает плотность TLR2 на мембране иммунопозитивных клеток, показало достоверное снижение данного параметра в ходе развития диабета у TLR2<sup>+</sup> лимфобластов в СПСОВ (на 11-12%,  $p < 0,05$ ) на 2-й и на 4-й неделе (рис. 2А) и у TLR2<sup>+</sup> средних лимфоцитов (на 4%,  $p < 0,05$ ) на 4-й неделе развития ЭСД (рис. 2Б) по сравнению с контролем, а у TLR2<sup>+</sup> малых лимфоцитов этот показатель увеличивался на 4% ( $p < 0,05$ ) на 14-й день развития экспериментальной патологии (рис. 2В). Введение диабетическим животным пентоксифиллина нашло отображение в незначительном увеличении интенсивности флюоресценции TLR2<sup>+</sup> средних лимфоцитов на 2-3% ( $p < 0,05$ ) на 2-й и 4-й неделе развития патологии по сравнению с диабетическими интактными животными (рис. 2Б).

В субэпителиальной зоне ИЛФ наблюдались схожие изменения при развитии экспериментальной патологии по сравнению с контролем: снижалась интенсивность флюоресценции у TLR2<sup>+</sup> лимфобластов и TLR2<sup>+</sup> средних лимфоцитов на 28-й день развития ЭСД (на 10% и 4%,  $p < 0,05$  соответственно) (рис. 2А, Б), однако этот показатель увеличивался у TLR2<sup>+</sup> малых лимфоцитов на 2% ( $p < 0,05$ ) на 14-й день развития ЭСД (рис. 2В). Введение диабетическим животным пентоксифиллина приводило к разнонаправленным изменениям интенсивности флюоресценции TLR2<sup>+</sup> клеток: снижалась у TLR2<sup>+</sup> лимфобластов на 4% ( $p < 0,05$ ) на 14-й день развития ЭСД (рис. 2А), увеличивалась у TLR2<sup>+</sup> средних лимфоцитов (на 2-6%,  $p < 0,05$ ) на 2-й и 4-й неде-

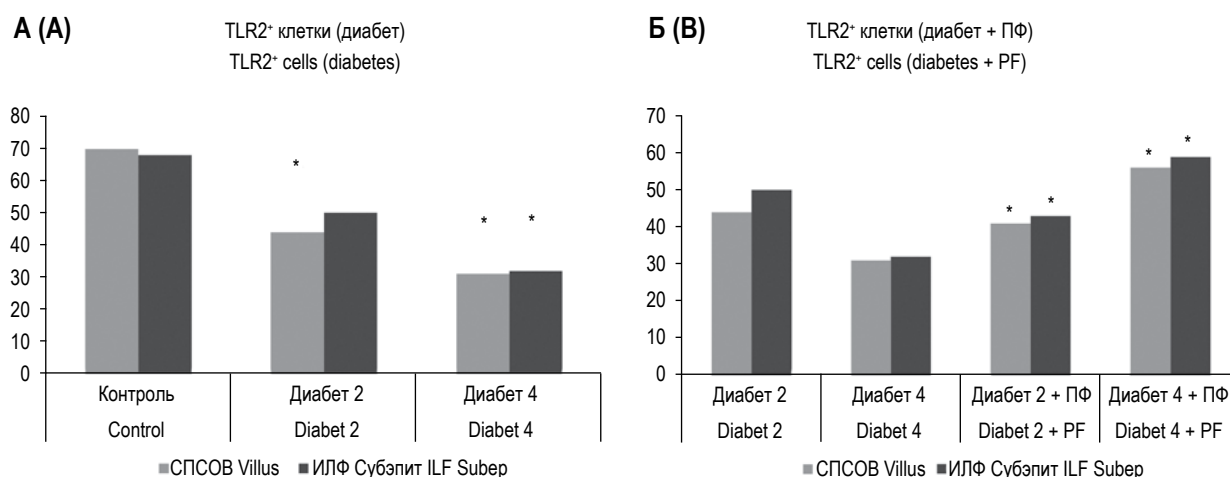
ле (рис. 2Б) и у TLR2<sup>+</sup> малых лимфоцитов (на 6%,  $p < 0,05$ ) на 4-й неделе (рис. 2В) развития патологии по сравнению с аналогичными показателями у интактных диабетических животных.

Изучение серийных срезов подвздошной кишки контрольных крыс линии Wistar, предварительно инкубированных с МКАТ к рецептору TLR4, показало, что суммарная плотность TLR4<sup>+</sup> клеток в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок (СПСОВ) составляла  $60 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , что приблизительно совпадает с их количеством и в субэпителиальной зоне изолированных лимфоидных фолликулов (ИЛФ) —  $54 \pm 3$  на  $1 \text{ мм}^2$  (рис. 3А).

Развитие диабета сопровождается снижением суммарной плотности TLR4<sup>+</sup> клеток в СПСОВ на 27% ( $p < 0,05$ ) на 14-й день и на 25% ( $p < 0,05$ ) на 28-й день экспериментального сахарного диабета, а в ИЛФ на 24% ( $p < 0,05$ ) на 28-й день экспериментального сахарного диабета по сравнению с контролем (рис. 3А).

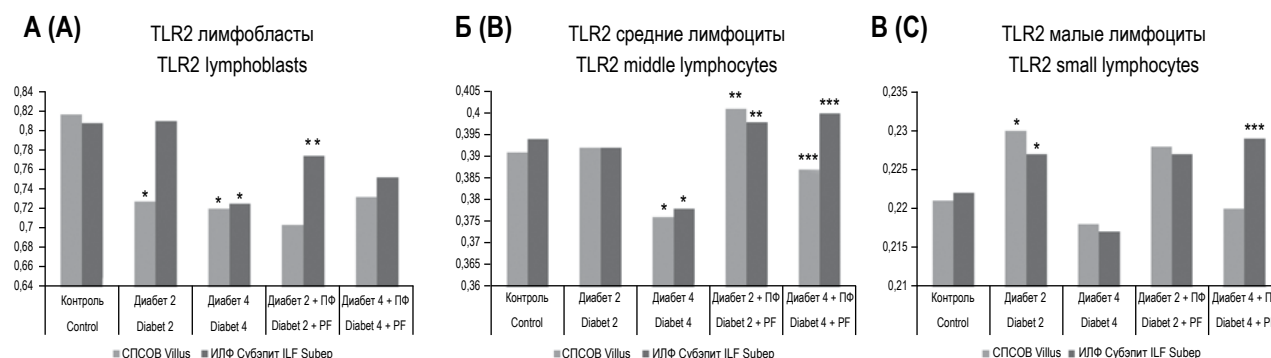
Введение диабетическим крысам линии Wistar пентоксифиллина сопровождалось достоверным увеличением плотности популяции TLR4<sup>+</sup> клеток в СПСОВ на 14-й день развития ЭСД на 30% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактными диабетическими животными (рис. 3Б).

Измерение интенсивности флюоресценции TLR4<sup>+</sup> клеток, что отражает плотность TLR4 на мембране иммунопозитивных клеток, показало следующие изменения. В СПСОВ достоверно увеличивался этот показатель у TLR4<sup>+</sup> средних лимфоцитов на 1,4% ( $p < 0,05$ ) и на 4% ( $p < 0,05$ ) на 14-й и 28-й день развития ЭСД соответственно



**Рисунок 1. Суммарная плотность (на  $1 \text{ мм}^2$ ) TLR2<sup>+</sup> клеток в СПСОВ (villus) и субэпителиальной зоне ИЛФ (ILF Subep) при развитии диабета (2 и 4 недели) и введения пентоксифиллина (PF) диабетическим животным**  
Примечание. \* –  $p < 0,05$ .

Figure 1. Total density (per  $1 \text{ мм}^2$ ) of TLR2<sup>+</sup> cells in lamina propria of villus mucous layer (Villus) and in subepithelial zone of the ILF (ILF Subep) during the development of diabetes (2 and 4 weeks) and the administration of pentoxifylline (PF) to diabetic animals  
Note. \*,  $p < 0.05$ .

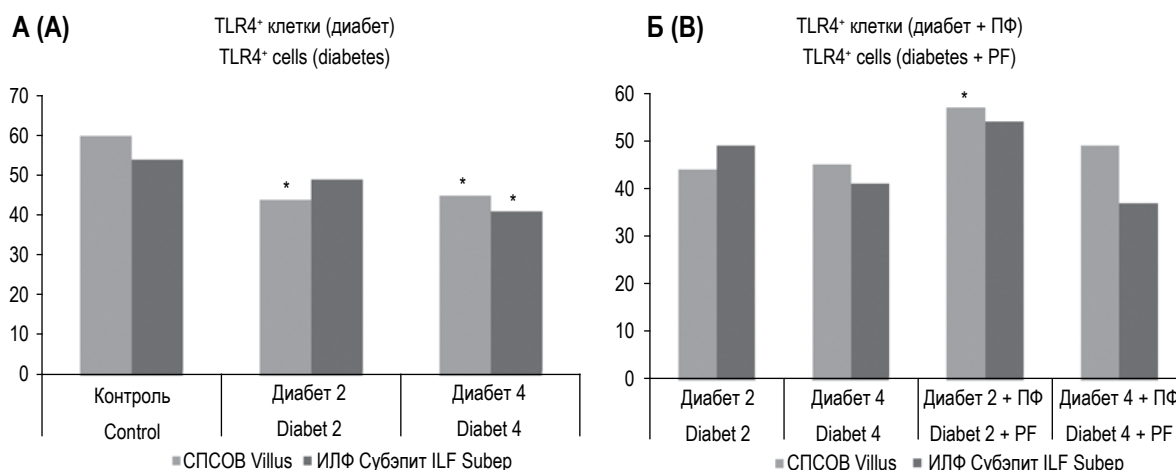


**Рисунок 2. Плотность TLR2 на мембране иммунопозитивных клеток ( $E_{\text{иф}}$ )**

**Примечание.** \* –  $p < 0,05$  по отношению к контролю; \*\* –  $p < 0,05$  по отношению к диабету 2; \*\*\* –  $p < 0,05$  по отношению к диабету 4.

Figure 2. Density of TLR2 on the membrane of immunopositive cells (fluorescence intensity in arbitrary units, AU)

Note. \*,  $p < 0.05$  relative to the control; \*\*,  $p < 0.05$  relative to the diabetes 2; \*\*\*,  $p < 0.05$  relative to the diabetes 4.



**Рисунок 3. Суммарная плотность (на 1 мм²) TLR4+ клеток в СПСОВ (Villus) и субэпителиальной зоне ИЛФ (ILF Subep) при развитии диабета (2 и 4 недели) и введения пентоксифиллина (PF) диабетическим животным**

**Примечание.** \* –  $p < 0,05$ .

Figure 3. Total density (per 1 mm²) of TLR4+ cells in lamina propria of villus mucous layer (Villus) and in subepithelial zone of the ILF (ILF Subep) during the development of diabetes (2 and 4 weeks) and the administration of pentoxifylline (PF) to diabetic animals

Note. \*,  $p < 0.05$ .

(рис. 4Б), а у TLR4+ малых лимфоцитов на 4,2% ( $p < 0,05$ ) и на 5,2% ( $p < 0,05$ ) в этих же группах экспериментальных животных (рис. 4В). Аналогичные изменения наблюдались и в ИЛФ: на 4-й неделе развития экспериментального СД увеличивалась интенсивность флюоресценции TLR4+ средних лимфоцитов и TLR4+ малых лимфоцитов на 4% ( $p < 0,05$ ) (рис. 4Б, В). Введение диабетическим животным пентоксифиллина приводило к достоверным изменениям интенсивности флюоресценции только у TLR4+ средних лимфоцитов в СПСОВ (рис. 4Б). Этот показатель увеличивался на 2,6% ( $p < 0,05$ ) на 14-й день и снижался на 2,5% ( $p < 0,05$ ) на 28-й день развития патологии по сравнению с диабетическими животными, которые препарат не получали.

Изучение транскрипционной активности гена *Gr2* в клетках подвздошной кишки крыс на 2-й неделе развития диабета показало увеличение концентрации mRNA в 3,2 раза, а на 4-й неделе — в 2,2 раза по сравнению с контрольной группой животных (рис. 5А). Уровень нормализованной экспрессии mRNA *Spi-B* также демонстрировал динамику к увеличению на фоне развития экспериментального диабета у животных. Так, на 14-й день развития патологии этот показатель увеличивался в 2,1 раза, а на 28-й день — в 2 раза по сравнению с контрольной группой крыс (рис. 5Г).

Введение экспериментальным животным пентоксифиллина приводило к росту уровня экспрессии *Gr2* в 6,8 раза на 2-й неделе развития ЭСД по сравнению с диабетическими интактными

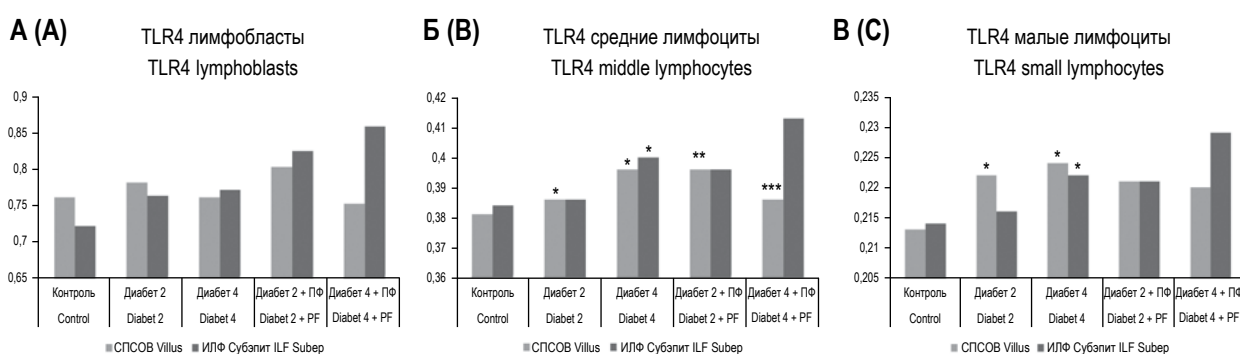


Рисунок 4. Плотность TLR4 на мембране иммунопозитивных клеток ( $E_{\text{иф}}$ )

Примечание. \* –  $p < 0,05$  по отношению к контролю; \*\* –  $p < 0,05$  по отношению к диабету 2; \*\*\* –  $p < 0,05$  по отношению к диабету 4.

Figure 4. Density of TLR4 on the membrane of immunopositive cells (fluorescence intensity in arbitrary units, AU)

Note. \*,  $p < 0.05$  relative to the control; \*\*,  $p < 0.05$  relative to the diabetes 2; \*\*\*,  $p < 0.05$  relative to the diabetes 4.

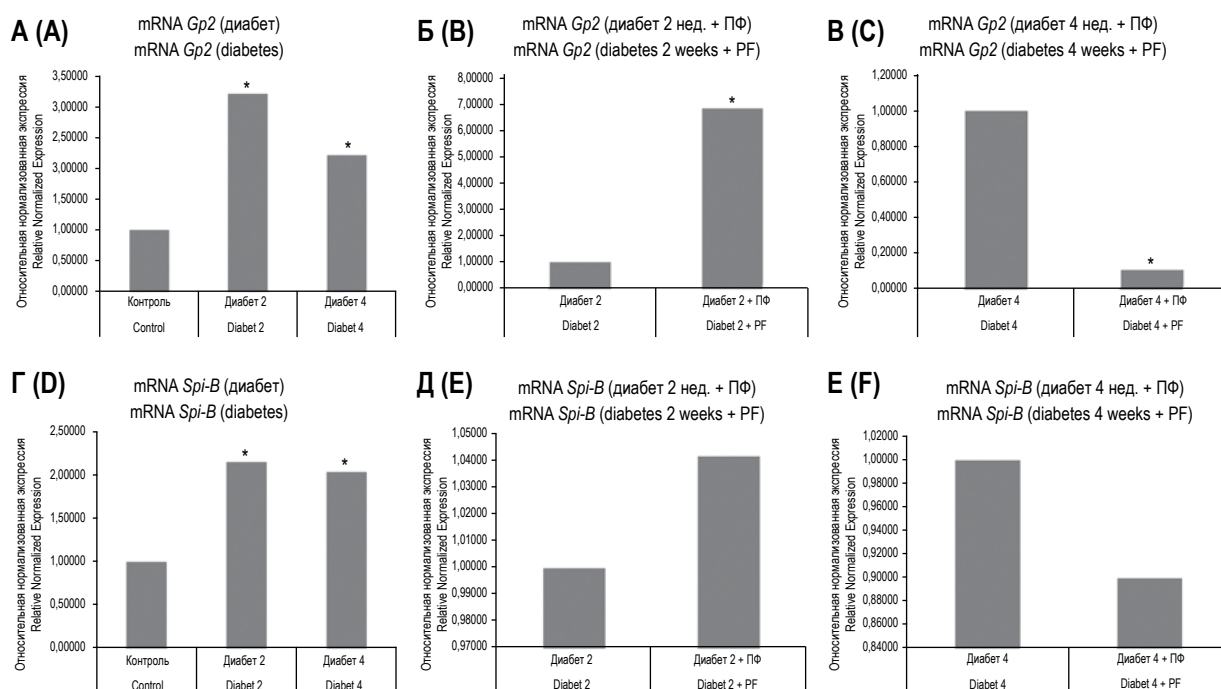


Рисунок 5. Относительное нормализованное количество мРНК генов Grp2 и Spi-B в клетках подвздошной кишки крыс

Примечание. Нормализация по методу  $\Delta\Delta Ct$  с референс-геном GAPDH. Диабет 2, диабет 4 – 2- и 4-недельный ЭСД соответственно; диабет 2 + ПФ, диабет 4 + ПФ – после введения пентоксифиллина диабетическим животным.

Figure 5. Relative normalized expression of mRNA of Grp2 and Spi-B genes in rat ileum cells

Note. Normalization by the  $\Delta\Delta Ct$  method with the GAPDH reference gene. Diabetes 2, diabetes 4 – 2 and 4 week experimental diabetes mellitus, respectively; diabetes 2 + PF, diabetes 4 + PF – after the administration of pentoxifylline to a diabetic animal.

ми животными (продолжительность ЭСД 2 недели) (рис. 5Б) и достоверному снижению уровня mRNA Grp2 в 10 раз на 4-й неделе развития патологии по сравнению с диабетическими интактными животными (продолжительность ЭСД 4 недели) (рис. 5В).

Введение экспериментальным животным пентоксифиллина не показало достоверного

влияния на уровень экспрессии mRNA Spi-B (рис. 5Д, Е).

Изучение относительной нормализованной экспрессии гена *Nf-κB1* в клетках подвздошной кишки крыс на 2-й неделе развития диабета показало увеличение концентрации mRNA в 10,7 раза, а на 4-й неделе – в 5,2 раза по сравнению с контрольной группой животных (рис. 6А).



Транскрипционная активность гена *c-Rel* также демонстрировала тенденцию к росту на фоне развития ЭСД. Так, на 14-й день развития диабета этот показатель увеличивался в 3,6 раза, а на 28-й день — в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой экспериментальных животных (рис. 6Г).

Введение экспериментальным животным пентоксифиллина приводило к снижению уровня экспрессии NF-κB1 в 3,2 раза на 2-й неделе развития ЭСД по сравнению с диабетическими интактными животными (длительность ЭСД 2 недели) (рис. 6Б), а также к достоверному снижению уровня mRNA NF-κB1 в 5 раз на 4-й неделе развития патологии по сравнению с диабетическими интактными животными (длительность ЭСД 4 недели) (рис. 6В).

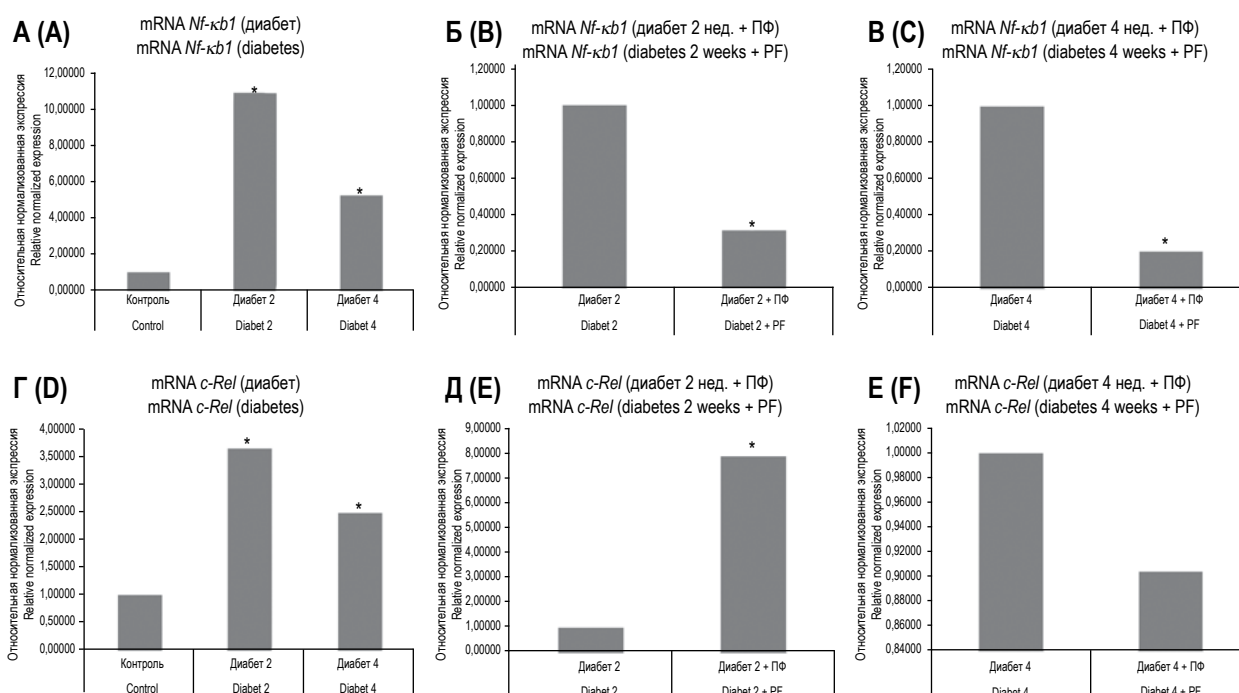
Уровень нормализованной экспрессии *c-Rel* на фоне введения диабетическим животным пентоксифиллина показал достоверные изменения только на 14-й день развития патологического процесса — показатель увеличивался в 7,8 раза по сравнению с диабетическими интактными животными (длительность ЭСД 2 недели) (рис. 6Д).

Уровень относительной нормализованной экспрессии mRNA TNFα в клетках подвздошной

кишки крыс на фоне развития ЭСД по сравнению с контрольной группой демонстрировал тенденцию к росту — в 31 раз на 2-й неделе развития патологического процесса и в 13,7 раза на 4-й неделе (рис. 7А). Уровень экспрессии mRNA TNFα, в свою очередь, показал достоверные изменения лишь на 14-й день развития экспериментальной патологии. Этот показатель увеличивался в 2,9 раза по сравнению с контрольными животными (рис. 7Г).

Введение диабетическим животным пентоксифиллина приводило к снижению транскрипционной активности гена *TNFα* в 9 раз на 2-й неделе развития ЭСД по сравнению с диабетическими интактными крысами (длительность ЭСД 2 недели) (рис. 7Б), а также к достоверному снижению уровня mRNA TNFα в 3,8 раза на 4-й неделе развития патологии по сравнению с диабетическими интактными животными (длительность ЭСД 4 недели) (рис. 7В).

Транскрипционная активность гена *TNFr* на фоне введения диабетическим животным пентоксифиллина показала достоверные изменения на 14-й день развития патологического процесса — снижение в 2,9 раза по сравнению с диабетическими

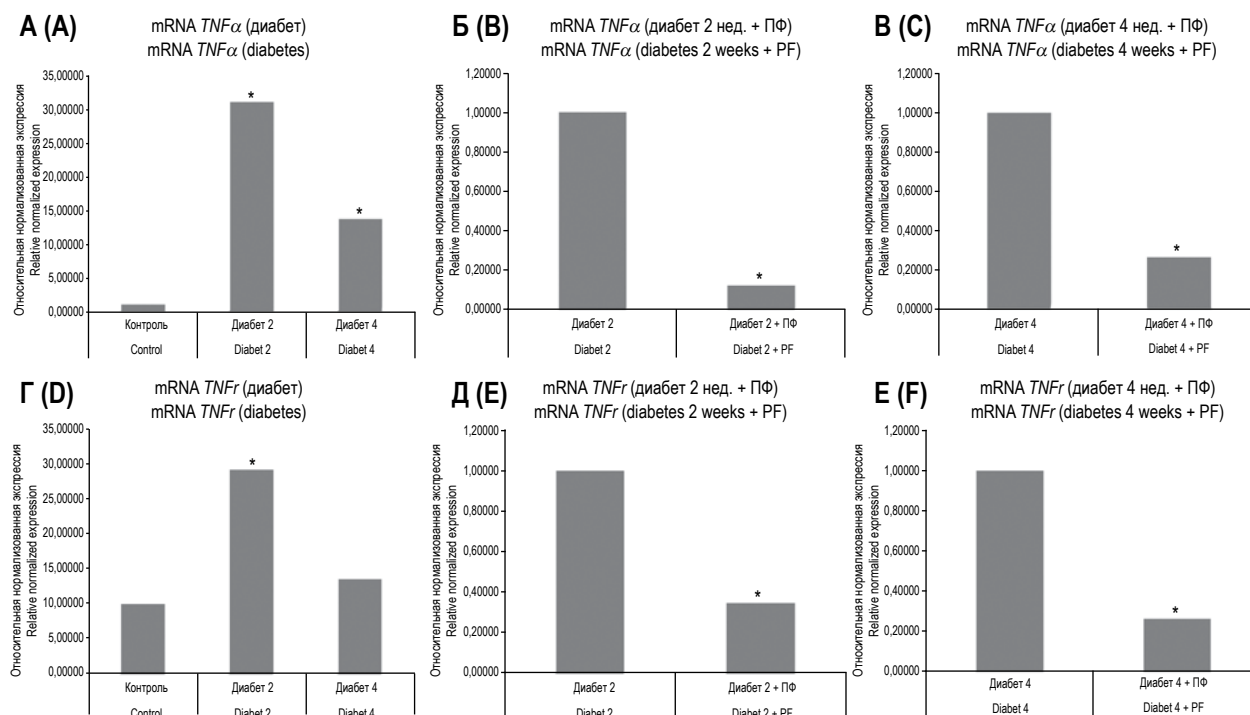


**Рисунок 6.** Относительное нормализованное количество мРНК генов *Nf-κB1* и *c-Rel* в клетках ИЛФ подвздошной кишки крыс

**Примечание.** Нормализация по методу  $\Delta\Delta Ct$  с референс-геном *GAPDH*. Диабет 2, диабет 4 – 2- и 4-недельный ЭСД соответственно; диабет 2 + ПФ, диабет 4 + ПФ – после введения пентоксифиллина диабетическим животным.

Figure 6. Relative normalized expression of mRNA of *Nf-κB1* and *c-Rel* genes in rat ileum ILF cells

Note. Normalization by the  $\Delta\Delta Ct$  method with the *GAPDH* reference gene. Diabetes 2, diabetes 4 – 2 and 4 week experimental diabetes mellitus, respectively; diabetes 2 + PF, diabetes 4 + PF – after the administration of pentoxifylline to a diabetic animal.



**Рисунок 7. Относительное нормализованное количество мРНК генов *TNFα* и *TNFβ* в клетках ИЛФ подвздошной кишки крыс**

**Примечание.** Нормализация по методу  $\Delta\Delta Ct$  с референс-геном *GAPDH*. Диабет 2, диабет 4 – 2- и 4-недельный ЭСД соответственно; диабет 2 + ПФ, диабет 4 + ПФ – после введения пентоксифиллина диабетическим животным.

Figure 7. Relative normalized expression of mRNA of *TNFα* and *TNFβ* genes in rat ileum ILF cells

Note. Normalization by the  $\Delta\Delta Ct$  method with the *GAPDH* reference gene. Diabetes 2, diabetes 4 – 2 and 4 week experimental diabetes mellitus, respectively; diabetes 2 + PF, diabetes 4 + PF – after the administration of pentoxifylline to a diabetic animal.

ческими интактными животными (длительность ЭСД 2 недели) (рис. 7Д), с сохранением аналогичной динамики и на 28-й день – снижение в 3,8 раза по сравнению с диабетическими интактными животными (длительность ЭСД 4 недели) (рис. 7Е).

## Обсуждение

Роль TLRs в развитии СД 1 типа активно дискутируется в целом ряде работ. Так, введение новорожденным NOD-мышам бактериальных экстрактов способно предотвратить развитие СД 1 типа и это напрямую зависит от TLR2- и TLR4-зависимой продукции TGF- $\beta$  [2]. Экспрессия TLR2 и TLR4 в моноцитах у пациентов с СД1 усилена по сравнению со здоровыми [13], а Devraj S. и соавт. показали, что продукция моноцитами TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  также коррелирует с экспрессией TLR2 и TLR4 [6]. У человека наивные CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$ Т-клетки экспрессируют TLR2 и TLR4 мРНК, однако поверхностная экспрессия данных рецепторов в достаточной степени представлена только у активированных лимфоцитов. Усиление экспрессии TLR2 в CD4 $^{+}$ Т-клетках

может способствовать их поляризации в направлении Th1-фенотипа и активировать продукцию IFN $\gamma$ . Следует отметить, что данный эффект в наибольшей степени выражен при сочетанной активации TLR2 и TCR [12], однако, если дифференцированные Th1-клетки рестимулировать агонистами TLR2, то для продукции IFN $\gamma$  и пролиферации не будет необходимости в активации TCR, но эффект может быть усилен добавлением IL-2. Также TLR2 оказывают влияние и на Th17, принимая непосредственное участие в их дифференцировке. Было показано, что CD4 $^{+}$ Т-клетки, лишенные TLR2, не способны к индукции экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE) [7]. В то же время активированные CD4 $^{+}$ Т-клетки через рестимуляцию TLR2 способны к усилению продукции IL-17 [3]. Кроме того, гиперактивация TLR2 способна привести к поляризации Treg в сторону клеток с фенотипом Th17 и потере супрессорной активности. Таким образом, активация TLR2 представляет собой новый путь в регуляции провоспалительных функций Th17-клеток.



Усиление сигнализации через TLR4 также может контролировать функцию CD4<sup>+</sup>Т-клеток. Так, у TLR4-дефицитных животных, после введения ЛПС снижается способность к продукции CD4<sup>+</sup>Т-клетками IFN $\gamma$ , но активируется продукция IL-17 [12]. Zanin-Zhogov A. и соавт. показали, что активация TLR4 у человека способна усилить миграцию CD4<sup>+</sup>Т-клеток за счет повышения связывания фибронектина [30]. *In vivo* нокаут TLR4 в CD4<sup>+</sup>Т-клетках приводит к снижению продукции IFN $\gamma$  и IL-17 только в месте локализации воспаления, но не на периферии. Известны и противоположные данные, демонстрирующие, что делеция гена *TLR4* в CD4<sup>+</sup>Т-клетках приводит к увеличению продукции IFN $\gamma$  и развитию воспаления. Такие различия в описанных данных можно объяснить наличием различных лигандов TLR в кишечнике по сравнению со стерильным микроокружением в ЦНС. То есть в кишечнике Т-клетки и TLR, несомненно, имеют непосредственный контакт с микробиотой и стимулирующими сигналами от нее, тогда как в ЦНС, вероятно, они будут в большей степени реагировать на сигналы от DAMP (Damage-associated molecular pattern molecules).

Обнаруженная нами индукция транскрипционной активности генов *Gp2* и *Spi-B* может свидетельствовать о важной роли М-клеток в прогрессии диабета. Гликопротеин Gp2, экспрессирующийся на апикальной мембране М-клеток (ранее считалось, что прерогатива экспрессии Gp2 принадлежит ацинарным панкреатическим клеткам), взаимодействует с FimH компонентом пилей 1 типа, присутствующем у представителей комменсальной и патогенной флоры (*E. coli*, *S. enterica* серовар Typhimurium). Антигены, транцитированные М-клетками, доставляются к незрелым дендритным клеткам, а растворимая форма Gp2 опсонизирует бактерии, несущие FimH, что в значительной степени облегчает процесс транцитоза [11]. Процесс дифференцировки М-клеток из стволовых клеток кишечника во многом зависит от иммунных клеток КАЛТ, продуцирующих рецептор активатора лиганда ядерного фактора  $\kappa$ B (RANKL), который является одним из членов семейства TNF [26]. Это подтверждается тем, что у RANKL-дефицитных мышей обнаруживается значительное снижение количества М-клеток, которое может быть восстановлено после введения экзогенного рекомбинантного RANKL [15]. Кроме того, важную роль в поддержании дифференцировки М-клеток играет транскрипционный фактор Spi-B, экспрессия которого усиливается на ранних стадиях дифференцировки М-клеток. Было установлено, что у Spi-B<sup>-/-</sup> мышей не происходила дифференцировка М-клеток [14], также

они были дефицитны по нескольким маркерам, таким как Gp2, CCL9, M-Sec и Sgen-1, что указывает на их более позднюю экспрессию. Еще одним эффектом, отмеченным для Spi-B<sup>-/-</sup> мышей, было значительное снижение уровня активации специфических Т-клеток. Megan B. Wood и соавт. обнаружили, что TNF $\alpha$  усиливает полноценную RANKL-зависимую экспрессию генов, участвующих в дифференцировке М-клеток, посредством канонического пути активации NF- $\kappa$ B, но не способен к самостоятельной индукции транскрипции Spi-B [29].

Обнаруженное в работе усиление транскрипционной активности генов *Nf- $\kappa$ B1* и *c-Rel* в клетках ИЛФ подвздошной кишки крыс способно оказывать непосредственное влияние на дифференцировку лимфоцитов. Так, в Т-лимфоцитах гены, кодирующие IL-2 и FoxP3, непосредственно связаны с c-Rel, а c-Rel-зависимая транскрипция IL-12 и IL-23 макрофагами и дендритными клетками критична для дифференцировки субпопуляций Т-клеток и осуществления их эффекторных функций. В последнее время появляются данные о том, что c-Rel играет одну из критичных ролей в развитии воспалительных заболеваний, таких как колит и экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ). Так, у c-Rel-дефицитных мышей, параллельно со снижением вероятности развития ЕАЕ, отмечены нарушения в пролиферации и дифференцировке Th1 и Th17 [31]. В то же время активация c-Rel в DC приводит к экспрессии IL-12 и IL-23, что положительно влияет на продукцию IL-17 активированными CD4<sup>+</sup>Т-клетками со сдвигом реакции в провоспалительную сторону [18]. Кроме того, выключение c-Rel приводит к резистентности к стрептозотоцин-индуцированному диабету. С другой стороны, c-Rel имеет решающее значение для развития FoxP3-позитивных Treg-клеток, которые подавляют активность аутореактивных Т-клеток [24].

Полученные нами данные подтверждают важную роль и TNF $\alpha$  и его рецепторов в прогрессии СД 1 типа. Koulmanda M. и соавт. показали [16], что введение NOD-мышам ингибиторов продукции TNF $\alpha$  в неонатальный период приводит к предупреждению старта СД 1 типа, однако системное применение нетоксичных доз TNF $\alpha$  самкам NOD-мышей до 24 дня жизни приводит к увеличению числа случаев СД 1 типа. Вместе с тем введение TNF $\alpha$  в более позднем возрасте способно привести к задержке старта и снижению заболеваемости СД 1 типа. Все это свидетельствует о том, что TNF $\alpha$ , наряду с другими факторами, способен осуществлять как положительную, так и отрицательную регуляцию толерантности периферических Т-лимфоцитов к аутоантиге-

нам, в том числе к антигенам  $\beta$ -клеток островков. Кроме описанного выше эффекта, anti-TNF $\alpha$ -терапия имеет дополнительный терапевтический эффект – восстановление чувствительности к инсулину. Liu С. и соавт. показали, что у пациентов с ревматоидным артритом на фоне назначения МКАТ к TNF $\alpha$  наблюдается снижение уровня Th1, Th17 IFN $\gamma$ -продуцирующих CD8<sup>+</sup>T-клеток, а уровень Treg-клеток возрастает, что может говорить о снижении количества провоспалительных Th17-клеток на фоне усиления продукции IFN $\gamma$  и увеличения количества Treg. Однако, несмотря на многочисленные положительные эффекты, использование МКАТ к TNF $\alpha$  может стать индуктором развития инфекционной патологии (туберкулез, пневмония и сепсис), реактивации латентной инфекции, а также нарушения нормального морфогенеза КАЛТ. Именно поэтому все более интересными становятся менее агрессивные блокаторы TNF $\alpha$ , например пентоксифиллин (PTX). PTX – это ингибитор фосфодиэстераз (ИФДЭ), который увеличивает уровень цАМФ, угнетает активацию NF- $\kappa$ B и транскрипцию гена TNF $\alpha$  [17]. Данные, полученные в ходе нашего эксперимента, совпадают с результатами других авторов, что IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ /NO-индуцированный апоптоз  $\beta$ -клеток значительно ослаблен на фоне введения PTX. Visser J. и соавт. показали, что эффект от введения PTX в значительной мере зависит от сроков использования препарата. Так, если DP-BB (Diabetes-prone Bio Breeding) крысам вводили PTX в течение 2 месяцев, то развития патологии практически не происходило, а у DR-BB (Diabetes-resistant) наблюда-

лась лишь задержка старта развития СД. В обеих линиях ВВ-крыс введение PTX результировалось в ингибировании продукции TNF $\alpha$  [28].

## Выводы

1. Развитие диабета сопровождалось снижением количества TLR2<sup>+</sup> и TLR4<sup>+</sup> лимфоцитов в СПСОВ и ИЛФ подвздошной кишки крыс, при этом плотность TLR2 на мембране иммунопозитивных клеток увеличивалась у малых, а TLR4 – у средних и малых лимфоцитов.

2. Введение ПФ диабетическим крысам приводило к снижению числа TLR2<sup>+</sup> клеток на 2-й неделе и увеличению данного показателя на 4-й неделе развития патологии, суммарная плотность TLR4<sup>+</sup> клеток демонстрировала динамику к росту только в СПСОВ. Изменения плотности TLR2 и TLR4 на поверхности лимфоцитов носили разнонаправленный характер.

3. Диабет вызывал транскрипционную индукцию генов *Nf- $\kappa$ B1* и *c-Rel* в клетках КАЛТ, тогда как введение ПФ снижало уровень экспрессии мРНК *Nf- $\kappa$ B1* и увеличивало мРНК *c-Rel*.

4. Отмечен рост нормализованной экспрессии маркеров М-клеток Gp2 и Spi-B в ходе развития экспериментальной патологии. Введение ПФ приводило к разнонаправленным эффектам на интенсивность экспрессии мРНК Gp2 в зависимости от срока развития диабета и не влияло на уровень мРНК Spi-B.

5. Развитие ЭСД приводило к транскрипционной активации генов TNF $\alpha$  и TNF $\beta$  и демонстрировало динамику к снижению этого показателя на фоне введения ПФ диабетическим животным.

## Список литературы / References

1. Деген А.С., Камышный А.М. Экспрессия цитоплазматических NOD-2 и RIG-I рецепторов врожденного иммунитета в кишечнике крыс при экспериментальном сахарном диабете // Российский иммунологический журнал, 2014. № 3. С. 525-528. [Degen A.S., Kamyshnyi A.M. Expression of cytoplasmic nod-2 and rig-i receptors of innate immunity in intestine of rats in experimental diabetes mellitus. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, no. 3, pp. 525-528. (In Russ.)]
2. Alyanakian M.A., Grela F., Aumeunier A., Chiavaroli C., Gouarin C., Bardel E., Normier G., Chatenoud L., Thieblemont N., Bach J.F. Transforming growth factor-beta and natural killer T-cells are involved in the protective effect of a bacterial extract on type 1 diabetes. *Diabetes*, 2006, Vol. 55, no. 1, pp. 179-185.
3. Biswas A., Banerjee P., Biswas T. Porin of *Shigella dysenteriae* directly promotes toll-like receptor 2-mediated CD4<sup>+</sup> T cell survival and effector function. *Mol. Immunol.*, 2009, Vol. 46, no. 15, pp. 3076-3085.
4. d'Addio F., Fiorina P. Type 1 diabetes and dysfunctional intestinal homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2016, Vol. 27, no. 7, pp. 493-503.
5. Degen A., Kamyshny A. Distribution characteristics of RIG-I receptors of innate immunity in experimental diabetes mellitus and administration of nonspecific blockers of TNF- $\alpha$ . *J. Immunol. Clin. Microbiol.*, 2018, Vol. 3, no. 3, pp. 50-59.
6. Devaraj S., Dasu M.R., Rockwood J., Winter W., Griffen S.C., Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2008, no. 93, pp. 578-583.

7. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, no. 8, pp. 337-348.
8. Faustman D.L. TNF, TNF inducers, and TNFR2 agonists: A new path to type 1 diabetes treatment. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2018, Vol. 34, no. 1.
9. Flaherty S., Reynolds J.M. TLR function in murine CD4(+) T lymphocytes and their role in inflammation. *Methods Mol Biol.*, 2016, no. 1390, pp. 215-227.
10. Fulford T.S., Ellis D., Gerondakis S. Understanding the roles of the NF- $\kappa$ B pathway in regulatory T cell development, differentiation and function. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2015, no. 136, pp. 57-67.
11. Hase K., Kawano K., Nochi T., Pontes G.S., Fukuda S., Ebisawa M., Kadokura K., Tobe T., Fujimura Y., Kawano S., Yabashi A., Waguri S., Nakato G., Kimura S., Murakami T., Iimura M., Hamura K., Fukuoka S., Lowe A.W., Itoh K., Kiyono H., Ohno H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH1 bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*, 2009, Vol. 462, no. 7270, pp. 226-230.
12. Imanishi T., Hara H., Suzuki S., Suzuki N., Akira S., Saito T. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J. Immunol.*, 2007, no. 178, pp. 6715-6719.
13. Jialal I., Yun J.M., Bremer A., Devaraj S. Demonstration of increased TLR2 and TLR4 Expression in monocytes of type 1 diabetic patients with microvascular complications. *Metabolism*, 2011, Vol. 60, no. 2, pp. 256-259.
14. Kanaya T., Hase K., Takahashi D., Fukuda S., Hoshino K., Sasaki I., Hemmi H., Knoop K.A., Kumar N., Sato M., Katsuno T., Yokosuka O., Toyooka K., Nakai K., Sakamoto A., Kitahara Y., Jinnohara T., McSorley S.J., Kaisho T., Williams I.R., Ohno H. The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 8, pp. 729-736.
15. Knoop K.A., Kumar N., Butler B.R., Sakthivel S.K., Taylor R.T., Nochi T., Akiba H., Yagita H., Kiyono H., Williams I.R. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 9, pp. 5738-5747.
16. Koulmanda M., Bhasin M., Awdeh Z., Qipo A., Fan Z., Hanidziar D., Putheti P., Shi H., Csizuadia E., Libermann T.A., Strom T.B. The role of TNF- $\alpha$  in mice with type 1- and 2- diabetes. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 5, pp. 332-354.
17. Liang L., Beshay E., Prud'homme G.J. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 1998, Vol. 47, no. 4, pp. 570-575.
18. Maloy K.J., Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 2011, no. 474, pp. 298-306.
19. Nakamura Y., Kimura S., Hase K. M cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance. *Inflamm. Regen.*, 2018, no. 38, pp. 1-5.
20. Needell J.C., Zipris D. The Role of the intestinal microbiome in type 1 diabetes pathogenesis. *Curr. Diab. Rep.*, 2016, Vol. 16, no. 10, pp. 8-9.
21. Ohno H. Intestinal M cells. *J. Biochem.*, 2016, Vol. 159, no. 2, pp. 151-160.
22. Opazo M.C., Ortega-Rocha E.M., Coronado-Arrázola I., Bonifaz L.C., Boudin H., Neunlist M., Bueno S.M., Kalergis A.M., Riedel C.A.. Intestinal microbiota influences non-intestinal related autoimmune diseases. *Front. Microbiol.*, 2018, Vol. 9, 432. doi: 10.3389/fmicb.2018.00432.
23. Qiao Y.C., Chen Y.L., Pan Y.H., Tian F., Xu Y., Zhang X.X., Zhao H.L. The change of serum tumor necrosis factor alpha in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 4, e0176157. doi: 10.1371/journal.pone.0176157.
24. Ramakrishnan P., Yui M.A., Tomalka J.A., Majumdar D., Parameswaran R., Baltimore D. Deficiency of nuclear factor- $\kappa$ B c-Rel accelerates the development of autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 2016, Vol. 65, no. 8, pp. 2367-2379.
25. Sato S., Kaneto S., Shibata N., Takahashi Y., Okura H., Yuki Y., Kunisawa J., Kiyono H. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.*, 2013, Vol. 6, no. 4, pp. 838-846.
26. Taylor R.T., Patel S.R., Lin E., Butler B.R., Lake J.G., Newberry R.D., Williams I.R. Lymphotoxin-independent expression of TNF-related activation-induced cytokine by stromal cells in cryptopatches, isolated lymphoid follicles, and Peyer's patches. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 9, pp. 5659-5667.
27. Vaarala O. Human intestinal microbiota and type 1 diabetes. *Curr. Diab. Rep.*, 2013, Vol. 13, no. 5, pp. 601-607.
28. Visser J., Groen H., Klatter F., Rozing J. Timing of pentoxifylline treatment determines its protective effect on diabetes development in the Bio Breeding rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 2002, Vol. 445, no. 1-2, pp. 133-140.

29. Wood M.B., Rios D., Williams I.R. TNF- $\alpha$  augments RANKL-dependent intestinal M cell differentiation in enteroid cultures. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2016, Vol. 311, no. 3, pp. 498-507.
30. Zanin-Zhorov A., Tal-Lapidot G., Cahalon L., Cohen-Sfady M., Pevsner-Fischer M., Lider O., Cohen I.R. Cutting edge: T cells respond to lipopolysaccharide innately via TLR4 signaling. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 1, pp. 41-44.
31. Zhang H., Bi J., Yi H., Fan T., Ruan Q., Cai L., Chen Y.H., Wan X. Silencing c-Rel in macrophages dampens Th1 and Th17 immune responses and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Immunol. Cell Biol.*, 2017, Vol. 95, no. 7, pp. 593-600.

---

**Авторы:**

**Деген А.С.** — ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

**Коваль Г.Д.** — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и эндокринологии, Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы, Украина

**Сухомлинова И.Е.** — к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

**Морозова О.В.** — к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

**Камышный А.М.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

---

**Authors:**

**Degen A.S.**, Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

**Koval G.D.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Endocrinology, Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

**Sukhomlinova I.E.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Normal Physiology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

**Morozova O.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Normal Physiology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

**Kamyshnyi A.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

---

Поступила 22.11.2018  
Принята к печати 25.12.2018

---

Received 22.11.2018  
Accepted 25.12.2018

## **ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОН-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ С $IFN\alpha$ , НА ФУНКЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ**

**Куручкина Ю.Д., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А.,  
Сизиков А.Э., Сулутьян А.Э., Чумасова О.А., Останин А.А.,  
Черных Е.Р.**

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

**Резюме.** Дендритные клетки (ДК) играют ключевую роль в поддержании периферической толерантности лимфоцитов к аутоантигенам. Восстановление иммунологической толерантности при аутоиммунных заболеваниях, в частности при ревматоидном артрите (РА), рассматривается в качестве новой стратегии лечения. Целью настоящей работы являлось исследование влияния дексаметазон-модифицированных ДК, генерируемых у больных РА из моноцитов в присутствии  $IFN\alpha$  (ДК<sub>декс</sub>), на аутологичные Т-лимфоциты в смешанной культуре лейкоцитов (ауто-СКЛ) и изучение возможных механизмов толерогенного эффекта ДК<sub>декс</sub> на аутореактивные Т-клетки. Установлено, что ДК<sub>декс</sub> больных РА индуцируют состояние гипореактивности Т-лимфоцитов в ауто-СКЛ. Гипореактивность Т-клеток ассоциирована с блокированием клеточного цикла  $CD4^+$ Т-лимфоцитов и снижением продукции  $IFN\gamma$ , IL-17, IL-4 и IL-13, что свидетельствует об индукции анергии  $CD4^+$ Т-клеток. При этом ингибция Th1/Th17 была более выраженной, чем супрессия Th2-клеток, продуцирующих IL-4 и IL-13. Наряду с анергией Т-клеток, снижение пролиферативного ответа в ауто-СКЛ ассоциировано с усилением апоптоза  $CD3^+$ Т-лимфоцитов. Кроме того, ДК<sub>декс</sub> больных РА подавляют пролиферацию аутологичных Т-клеток, стимулированных контрольными ДК. Данный эффект сопряжен с возрастанием в ауто-СКЛ  $CD4^+$ Т-клеток, секретирующих IL-10, и свидетельствует о способности ДК<sub>декс</sub> индуцировать конверсию  $CD4^+$ Т-лимфоцитов в регуляторные Т-клетки (Tr1). Полученные данные характеризуют новый тип толерогенных ДК, генерированных из моноцитов крови больных РА в присутствии интерферона-альфа и модифицированных дексаметазоном (ДК<sub>декс</sub>), и раскрывают механизмы толерогенного действия ДК<sub>декс</sub> на Т-клетки, распознающие собственные антигены в ауто-СКЛ.

*Ключевые слова:* дендритные клетки, интерферон- $\alpha$ , дексаметазон, ауто-СКЛ, апоптоз, анергия, цитокины, Tr1, ревматоидный артрит

### **Адрес для переписки:**

Куручкина Юлия Дмитриевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 228-21-01.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: juli\_k@bk.ru; ct\_lab@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Kurochkina Yuliya D.  
Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630099, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadrintsevskaya str., 14.  
Phone: 7 (383) 228-21-01.  
Fax: 7 (383) 222-70-28.  
E-mail: juli\_k@bk.ru; ct\_lab@mail.ru

### **Образец цитирования:**

Ю.Д. Куручкина, Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина,  
М.А. Тихонова, А.Э. Сизиков, А.Э. Сулутьян,  
О.А. Чумасова, А.А. Останин, Е.Р. Черных «Влияние  
дексаметазон-модифицированных дендритных клеток,  
генерированных с  $IFN\alpha$ , на функции аутологичных  
Т-лимфоцитов у больных ревматоидным артритом»  
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5.  
С. 835-846. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-835-846  
© Куручкина Ю.Д. и соавт., 2019

### **For citation:**

Yu.D. Kurochkina, T.V. Tyrinova, Leplina O. Yu.,  
M.A. Tikhonova, A.E. Sizikov, A.E. Sulutian,  
O.A. Chumasova, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh "Influence  
of dexamethasone-modified dendritic cells generated with  
 $IFN\alpha$  upon autologous T lymphocyte functions in the  
patients with rheumatoid arthritis", Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5,  
pp. 835-846. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-835-846  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-835-846

# INFLUENCE OF DEXAMETHASONE-MODIFIED DENDRITIC CELLS GENERATED WITH IFN $\alpha$ UPON AUTOLOGOUS T LYMPHOCYTE FUNCTIONS IN THE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Kurochkina Yu.D., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Sizikov A.E., Sulutian A.E., Chumasova O.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

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

**Abstract.** Dendritic cells (DCs) play a key role in maintaining the peripheral tolerance of lymphocytes to autoantigens. Recovery of immunological tolerance in autoimmune diseases, particularly, in rheumatoid arthritis (RA) is considered a new therapeutic strategy. The aim of this work was to study the effect of dexamethasone-modified DCs generated from monocytes of RA patients in the presence of IFN $\alpha$  (DCs<sub>Dex</sub>), upon autologous T lymphocytes in mixed leukocyte culture (auto-MLC), and to investigate possible mechanisms of the DCs<sub>Dex</sub> tolerogenic effect upon autoreactive T cells. We have shown, that DCs<sub>Dex</sub> from RA patients induce T cell hyporeactivity in auto-MLC. Hyporeactivity of T cells is associated with cell cycle blockage in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes and decreased IFN $\gamma$ , IL-17, IL-4 and IL-13 production, which indicates the induction of CD4<sup>+</sup>T cell anergy. In this case, inhibition of Th1/Th17 has been more pronounced than the suppression of Th2 cells producing IL-4 and IL-13. Along with T cell anergy, the decrease of proliferative response in auto-MLC is associated with increased CD3<sup>+</sup>T lymphocyte apoptosis. In addition, the DCs<sub>Dex</sub> of RA patients suppresses the proliferation of autologous T cells stimulated by unmodified DCs. This effect is associated with enhancement of IL-10-producing CD4<sup>+</sup>T cells in the auto-MLC, thus being indicative for an ability of DCs<sub>Dex</sub> to induce conversion of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes into regulatory T cells (Tr1). The data obtained characterize a new type of tolerogenic DCs, generated from blood monocytes of RA patients in the presence of IFN $\alpha$  and modified by dexamethasone, thus revealing a mechanism for tolerogenic effect of DCs<sub>Dex</sub> upon T cells that recognize self-antigens in auto-MLC.

**Keywords:** dendritic cells, interferon- $\alpha$ , dexamethasone, auto-MLC, apoptosis, anergy, cytokines, Tr1, rheumatoid arthritis

## Введение

Дендритные клетки (ДК) играют ключевую роль как в запуске иммунного ответа, так и в поддержании периферической толерантности лимфоцитов к аутоантигенам. ДК с толерогенными свойствами характеризуются сниженной костимуляторной активностью, противовоспалительным профилем секретируемых цитокинов и способны индуцировать клональную деплецию и/или анергию аутореактивных Т-клеток, а также стимулировать дифференцировку и пролиферацию регуляторных Т-клеток (Treg) [10, 23].

Восстановление иммунологической толерантности рассматривается сегодня в качестве новой стратегии лечения аутоиммунных заболеваний, в том числе ревматоидного артрита (РА). РА представляет аутоиммунный воспалительный процесс, характеризующийся повреждением синовиальной и костной ткани суставов, развитие

которого связывают со срывом иммунологической толерантности, в частности с дефектом регуляторных Т-клеток и инфильтрацией синовиальной оболочки аутореактивными Т-лимфоцитами, продуцирующими IFN $\gamma$  и IL-17 [8]. Современное лечение РА сводится к продолжительной неспецифической иммуносупрессивной терапии, которая, хотя и подавляет воспалительный процесс, не обладает длительным эффектом и повышает риск развития серьезных побочных реакций в виде инфекционных осложнений и опухолевого роста [14]. С этой точки зрения использование толерогенных ДК (тДК) для подавления аутореактивных Т-клеток представляется более безопасным и целенаправленным воздействием. Экспериментальные исследования показали эффективность тДК в моделях артрита [16, 28] и послужили основанием для клинической апробации тДК [23, 27]. В этой связи вопросам фармакологической модуляции ДК и разработке оп-

тимальных протоколов получения тДК уделяется особое внимание.

В клинических исследованиях ДК традиционно получают путем культивирования моноцитов в присутствии GM-CSF и IL-4 (так называемые IL-4-ДК). При этом в качестве индукторов толерогенной активности ДК часто используют глюкокортикоиды, широко применяемые в лечении аутоиммунных заболеваний [15, 16]. В исследованиях *in vitro* показано, что дексаметазон ингибирует созревание ДК, обуславливая снижение экспрессии антигенпрезентирующих и ко-стимуляторных молекул и усиление экспрессии ко-ингибиторных молекул; подавляет продукцию ДК провоспалительных цитокинов и усиливает секрецию противовоспалительных медиаторов, а также усиливает экспрессию молекулы GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper), способствующей генерации  $CD25^{+}FoxP3^{+}$  и IL-10 продуцирующих Treg [5, 21].

Генерация ДК *in vitro* происходит также при замене IL-4 на интерферон-альфа ( $IFN\alpha$ ), являющийся мощным индуктором дифференцировки моноцитов в ДК. Полученные в присутствии  $IFN\alpha$  ДК ( $IFN$ -ДК) в отличие от IL-4-ДК обладают более высокой миграционной и проапоптогенной активностью и после активации сохраняют менее зрелый фенотип [13, 19], представляя интерес в качестве новой клеточной платформы для генерации тДК. Ранее нами было показано, что дексаметазон-модифицированные  $IFN$ -ДК ( $IFN$ -ДК<sub>декс</sub>) здоровых доноров обладают толерогенными свойствами, в частности характеризуются низкой аллостимуляторной активностью, что коррелирует с незрелым фенотипом и повышенной экспрессией TLR-2 на  $IFN$ -ДК<sub>декс</sub> [1].

Настоящая работа посвящена исследованию влияния  $IFN$ -ДК<sub>декс</sub> больных РА на аутологичные Т-лимфоциты, функции которых в условиях аутоиммунной патологии и проводимого лечения могут быть существенно изменены, и изучению возможных механизмов толерогенного эффекта  $IFN$ -ДК<sub>декс</sub> на аутореактивные Т-клетки.

## Материалы и методы

В исследование было включено 29 больных с РА, диагностированным в соответствии с критериями Американской коллегии ревматологов (ACR/EULAR, 2010 г.). Все пациенты имели давность заболевания более года, характеризовались умеренной или высокой степенью активности заболевания ( $DAS\ 28 > 3,1$ ) и получали терапию стандартными болезнью-модифицирующими препаратами (метотрексат, лефлуномид, сульфасалазин) в виде монотерапии или в комбинации.

Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия.

### Генерация ДК

Венозную кровь забирали в вакутейнерные пробирки с гепарином (Becton & Dickinson). Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли методом градиентного центрифугирования на фиколе-верографине и инкубировали в 6-луночных пластиковых планшетах (Nunclon, Дания) в течение 60 мин в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5% сыворотки плодов коровы (FCS, Биолот, Санкт-Петербург). Неприлипающую фракцию МНК далее удаляли, а фракцию адгезивных клеток ( $> 90\% CD14^{+}$  моноциты) культивировали в течение 5 сут. при 37 °С в  $CO_2$ -инкубаторе в полной культуральной среде в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и  $IFN\alpha$  (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария). Созревание ДК индуцировали LPS (LPS, 10 мкг/мл, LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich), который вносили на 4 сут. Для индукции толерогенной активности на 3 сут. в культуры ДК добавляли дексаметазон ( $10^{-6}$  М). Контролем служили ДК, генерируемые в отсутствие дексаметазона.

**Фенотипический анализ ДК** проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson, США) с использованием FITS-или PE-меченных моноклональных анти-CD14, -CD83, -CD86, -HLA-DR, -TLR-2, -B7H1 антител (BD PharMingen, США). Экспрессию поверхностных маркеров оценивали по относительному количеству позитивных клеток.

### Аутологичная смешанная культура лейкоцитов (ауто-СКЛ)

$IFN$ -ДК больных РА, генерированные в отсутствие ( $DK_k$ ) или присутствии дексаметазона ( $DK_{декс}$ ), культивировали с аутологичными МНК ( $0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640, дополненной 10% инактивированной сыворотки крови АВ (IV) группы при 37 °С в  $CO_2$ -инкубаторе в соотношении ДК:МНК = 1:10. В отдельной серии экспериментов оценивали способность  $DK_{декс}$  подавлять пролиферативный ответ аутологичных Т-клеток, индуцированный контрольными ДК. В этом случае в культуры МНК ( $0,1 \times 10^6$ /лунку) больных РА одновременно добавляли  $DK_k$  и  $DK_{декс}$  в соотношении ДК:МНК = 1:10 для каждого типа ДК.

**Пролиферативный ответ в ауто-СКЛ** оценивали на 5 сут. радиометрически по включению  $^3H$ -тимидина (1 мкКи/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования. Стимуляторную

активность ДК выражали в виде индекса влияния (ИВ), который рассчитывали как отношение пролиферативного ответа в ауто-СКЛ к уровню спонтанной пролиферации МНК.

**Клеточный цикл CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов** оценивали методом трехцветной проточной цитометрии. Для этого 25 мкл МНК ( $1,0 \times 10^6$ ) инкубировали в течение 45 мин при 4 °С в темноте с 5 мкл FITC-конъюгированных анти-CD3-антител и 5 мкл PE-конъюгированных анти-CD4 антител. После однократной отмывки клетки фиксировали 0,5% раствором параформальдегида, центрифугировали и метили 7-амино-актиномицином D (7-AAD, Calbiochem, Германия) в конечной концентрации 2 мкг/мл. Относительное содержание клеток с диплоидным (клетки в G0/G1-фазах клеточного цикла) и гипердиплоидным (клетки в S/G2/M-фазах клеточного цикла) набором ДНК определяли в гейте CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. Результаты выражали в виде процентного соотношения позитивных клеток к общему количеству CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов.

**Уровень апоптоза** оценивали с помощью окраски аннексином (An) и пропидиумом иодином (Pi), используя коммерческую тест-систему BD Pharmingen<sup>TM</sup>. Количество клеток в стадии раннего и позднего апоптоза определяли в гейте CD3<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, соответственно, по содержанию An<sup>+</sup>Pi<sup>-</sup> и An<sup>+</sup>Pi<sup>+</sup> клеток.

**Производство Th1 (IFN $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-13) и Th17 (IL-17) цитокинов** оценивали в 5-суточных супернатантах ауто-СКЛ методом мультиплексного протеомного анализа (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

**Регуляторные Т-клетки** оценивали по содержанию CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Т-клеток (Treg) и CD4<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> (Tr-1) клеток методом проточной цитометрии, используя анти-CD4 (PerCP или APC), анти-CD25 (FITC), анти-FoxP3 (PE), анти-IL-10 моноклональные антитела (BD Biosciences, США). Фиксацию и пермеабелизацию МНК для оценки внутриклеточной экспрессии FoxP3 и IL-10 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов; использовали коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабелизации Transcription Factor Buffer Set в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences, США).

**Статистическую обработку** полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианных значений (Me) и интерквартильного диапазона (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Для выявления значимых

различий сравниваемых показателей использовали непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни, парный W-критерий Вилкоксона, парный критерий знаков.

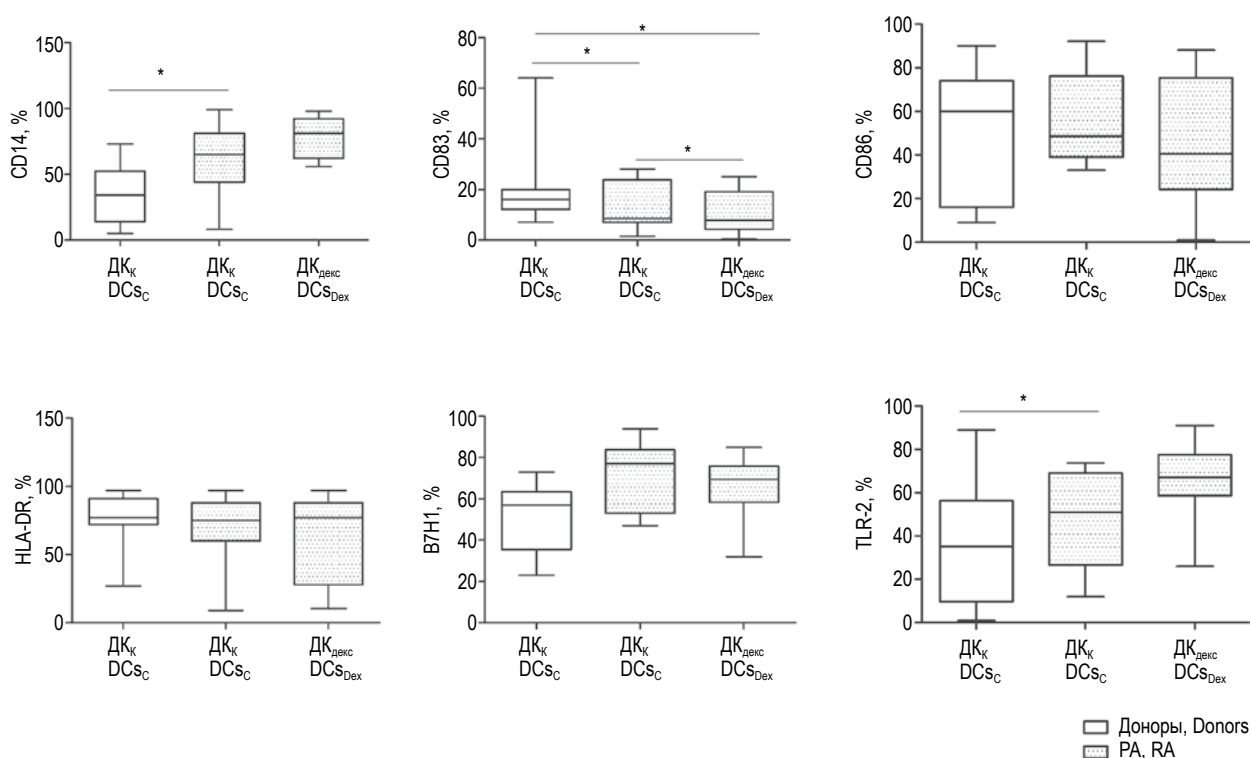
## Результаты

Фенотипический анализ IFN-ДК, генерируемых у больных РА (рис. 1), выявил ряд различий с ДК здоровых доноров. IFN-ДК пациентов характеризовались более высоким содержанием CD14<sup>+</sup> клеток и меньшей долей CD83<sup>+</sup> клеток, то есть являлись менее зрелыми. Кроме того, IFN-ДК больных РА отличались повышенным содержанием клеток, экспрессирующих TLR-2 и B7-H1 (PD-1L). Генерация IFN-ДК пациентов в присутствии дексаметазона сопровождалась усилением фенотипических признаков незрелости ДК (возрастанием экспрессии CD14 и уменьшением CD83), снижением экспрессии костимуляторных молекул (CD86) и усилением экспрессии TLR2.

Одной из важных функциональных характеристик ДК является их способность индуцировать пролиферацию Т-лимфоцитов в СКЛ. Стимуляторную активность ДК в СКЛ можно рассматривать в качестве интегрального показателя, поскольку она детерминирована экспрессией антигенпрезентирующих, костимуляторных и коингибиторных молекул, а также балансом продукции про- и противовоспалительных цитокинов, и ее снижение является характерным признаком тДК. Поскольку задачей настоящего исследования являлось изучение влияния IFN-ДК<sub>декс</sub> на функции аутологичных Т-клеток больных РА, в качестве витальной модели использовали ауто-СКЛ, в которой Т-лимфоциты пролиферируют в ответ на собственные антигены, презентруемые ДК. Из данных таблицы 1 видно, что уровень пролиферации Т-клеток в присутствии ДК<sub>декс</sub> был значительно ниже, чем при стимуляции контрольными ДК. Индексы влияния ДК снижались в среднем с 6,0 до 1,9 расч. ед. ( $p_w = 0,005$ ;  $n = 17$ ), то есть практически в 3 раза после модификации IFN-ДК дексаметазоном. Таким образом, ДК<sub>декс</sub> у больных РА индуцировали состояние гипореактивности Т-клеток, отвечающих в ауто-СКЛ.

Поскольку снижение реактивности Т-клеток могло быть обусловлено индукцией Т-клеточной анергии, исследовали клеточный цикл CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. Доля пролиферирующих CD4<sup>+</sup>Т-клеток (в S/G2+M-фазах клеточного цикла) в культурах, стимулированных ДК<sub>декс</sub>, была достоверно ниже, а содержание покоящихся CD4<sup>+</sup>Т-клеток (в G0/G1-фазах клеточного цик-





**Рисунок 1. Фенотип IFN-ДК здоровых доноров (n = 13) и больных РА (n = 10)**

**Примечание.** Данные представлены в виде медиан (сплошная горизонтальная линия), интерквартильного и min-max диапазона. На диаграммах показано относительное содержание CD14<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, B7-H1<sup>+</sup> и TLR-2<sup>+</sup> клеток в популяции IFN-ДК, генерированных в отсутствие (ДК<sub>с</sub>) или в присутствии 10<sup>-6</sup>М дексаметазона (ДК<sub>декс</sub>). \* – p < 0,05, парный критерий знаков.

Figure 1. IFN-DCs phenotype in healthy donors (n = 13) and RA patients (n = 10)

Note. Data are presented as medians (solid horizontal line), interquartile and min-max range. Diagrams show the percentage of CD14<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, B7-H1<sup>+</sup> and TLR-2<sup>+</sup> cells in the IFN-DCs population, generated without or with 10<sup>-6</sup>M dexamethasone (DCs<sub>c</sub> and DCs<sub>Dex</sub> respectively). \*, p < 0.05, Sign-test.

ла) выше, чем при стимуляции контрольными ДК. Как следствие, соотношение покоящихся/пролиферирующих CD4<sup>+</sup>Т-клеток в ауто-СКЛ в присутствии ДК<sub>декс</sub> более чем в 5 раз превышало значения контрольных культур (13,7 против 2,5 расч. ед. соответственно; p<sub>w</sub> = 0,028; n = 6).

Другой механизм снижения Т-клеточной реактивности мог быть связан со способностью ДК<sub>декс</sub> индуцировать гибель Т-лимфоцитов. Поэтому далее исследовали уровень апоптоза CD3<sup>+</sup>Т-клеток в ауто-СКЛ, оценка которого включала определение общего количества апоптотических клеток (An<sup>+</sup>), а также клеток в стадии раннего (An<sup>+</sup>Pi<sup>-</sup>) и позднего (An<sup>+</sup>Pi<sup>+</sup>) апоптоза. Стимуляция МНК контрольными ДК сопровождалась возрастанием доли апоптотических Т-клеток, являясь отражением активационно-индуцированного апоптоза. Однако в присутствии ДК<sub>декс</sub> относительное содержание апоптотических Т-клеток было достоверно выше. При этом усиление апоптоза было обусловлено преимущественно за счет прироста CD3<sup>+</sup>Т-клеток в стадии позднего апоптоза. Таким образом, гипореактивность Т-клеток

больных РА в ауто-СКЛ при стимуляции дексаметазон-модифицированными ДК была обусловлена как индукцией анергии, так и усилением апоптоза аутореактивных Т-лимфоцитов.

Известно, что Т-клетки в состоянии анергии характеризуются не только низкой пролиферативной активностью, но и угнетением цитокин-секреторной функции. Чтобы выяснить, какие субпопуляции CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов подвержены анергии, оценили содержание Th1 (IFN $\gamma$ ), Th17 (IL-17) и Th2 (IL-4, IL-13) цитокинов в 5-суточных супернатантах ауто-СКЛ. Из данных таблицы 2 видно, что ДК<sub>декс</sub> больных РА в наибольшей степени подавляли продукцию IFN $\gamma$  и IL-17, тогда как снижение синтеза IL-4 и IL-13 было менее выраженным, хотя и статистически достоверным. Таким образом, по сравнению с Th2-клетками Th1 и Th17 Т-лимфоциты были более чувствительны супрессорному влиянию со стороны ДК<sub>декс</sub>. Различный эффект ДК<sub>декс</sub> на Th1- и Th2-клетки проявлялся снижением индексов соотношения IFN $\gamma$ /IL-4 и IFN $\gamma$ /IL-13 с 30 (IQR 15,3-89,5) до 17,8 (IQR 1,5-26,6; p = 0,024) и с 19,4

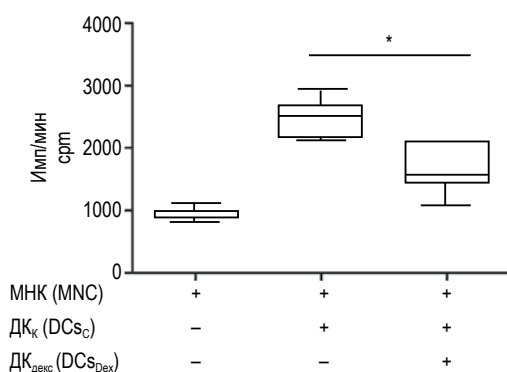
**ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ДК<sub>декс</sub> БОЛЬНЫХ РА НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ, КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И УРОВЕНЬ АПОПТОЗА Т-КЛЕТОК В АУТО-СКЛ**

TABLE 1. INFLUENCE OF DCs<sub>Dex</sub> OF RA PATIENTS ON T CELL PROLIFERATIVE RESPONSE, CELL CYCLE AND APOPTOSIS LEVEL IN AUTO-MLC

| Параметры<br>Parameters                                                       | МНК<br>MNC         | Ауто-СКЛ<br>Auto-MLC                    |                                              | P <sub>w</sub> |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|----------------|
|                                                                               |                    | + ДК <sub>к</sub><br>+ DCs <sub>c</sub> | + ДК <sub>декс</sub><br>+ DCs <sub>Dex</sub> |                |
| <b>Пролиферация (имп/мин)</b><br>Proliferation (cpm)<br>n = 17                | 2340<br>(400-3380) | 10550<br>(7250-15900)                   | 4690<br>(1070-8350)                          | 0,005          |
| <b>Индекс влияния ДК</b><br>Index of influence of DCs                         | –                  | 6,0<br>(4,3-18,6)                       | 1,9<br>(1,4-4,2)                             | 0,005          |
| <b>Клеточный цикл (%)</b><br>Cell cycle (%)<br>n = 6                          |                    |                                         |                                              |                |
| <b>CD4<sup>+</sup>Т-клетки в G0/G1</b><br>CD4 <sup>+</sup> T cells in G0/G1   | –                  | 64<br>(56-87)                           | 82<br>(82-86)                                | 0,1            |
| <b>CD4<sup>+</sup>Т-клетки в S/G2+M</b><br>CD4 <sup>+</sup> T cells in S/G2+M | –                  | 22,5<br>(6-30)                          | 6,5<br>(4-8)                                 | 0,028          |
| <b>Соотношение клеток в G0/G1 и S/G2+M</b><br>Ratio G0/G1 and S/G2+M          | –                  | 2,5<br>(2,2-14,5)                       | 13,7<br>(10,3-20,5)                          | 0,028          |
| <b>Апоптоз Т-клеток (%)</b><br>T cell apoptosis (%)<br>n = 7                  |                    |                                         |                                              |                |
| CD3 <sup>+</sup> An <sup>+</sup>                                              | 9 (7-15)           | 22 (12-27)                              | 27,5 (17-33)                                 | 0,017          |
| CD3 <sup>+</sup> An <sup>+</sup> Pr                                           | 7 (6-8)            | 11 (10-11)                              | 12,5 (10-14)                                 | 0,028          |
| CD3 <sup>+</sup> An <sup>+</sup> Pr <sup>+</sup>                              | 2 (1-7)            | 11 (2-12)                               | 17 (5-22)                                    | 0,018          |

**Примечание.** Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках). IFN-ДК больных РА, генерированные в отсутствие (ДК<sub>к</sub>) или присутствии дексаметазона (ДК<sub>декс</sub>), культивировали с аутологичными МНК в соотношении 1:10. Пролиферацию оценивали на 5 сут., клеточный цикл и уровень апоптоза – через 48 ч. P<sub>w</sub> – достоверность различий эффекта ДК<sub>декс</sub> по сравнению с контрольными ДК (W-критерий Вилкоксона).

Note. Data are presented as median and interquartile range (in brackets). IFN-DCs of RA patients generated without or with dexamethasone (DCs<sub>c</sub> and DCs<sub>Dex</sub> respectively) were culturing with autologous MNC as 1:10. Proliferation was assessed on day 5, cell cycle and apoptosis level – after 48 hours. P<sub>w</sub>, the significance of differences of DCs<sub>Dex</sub> compared with DCs<sub>c</sub> (Wilcoxon Matched Pairs Test).



**Рисунок 2. Супрессорный эффект ДК<sub>декс</sub> на пролиферацию Т-клеток в ауто-СКЛ индуцированной ДК<sub>к</sub>**

**Примечание.** Данные представлены в виде медиан (сплошная горизонтальная линия), интерквартильного и min-max диапазона. \* – p<sub>w</sub> = 0,028 (W-критерий Вилкоксона).

Figure 2. Suppressive effect of DCs<sub>Dex</sub> on T cell proliferation in auto-MLC induced by DCs<sub>c</sub>

Note. Data are presented as medians (solid horizontal line), interquartile and min-max range. \*, p<sub>w</sub> = 0,028 (Wilcoxon Matched Pairs Test).

(IQR 12-34) до 13 (IQR 6-18; p = 0,025) соответственно.

Гипореактивность Т-клеток больных РА в ауто-СКЛ могла быть связана не только с индукцией апоптоза/анергии, но также и с супрессорным эффектом дексаметазон-модифицированных ДК. Для проверки этого предположения исследовали способность ДК<sub>декс</sub> подавлять пролиферативный ответ Т-клеток в ауто-СКЛ, индуцированной контрольными ДК. Действительно (рис. 2), в присутствии ДК<sub>декс</sub> пролиферативная активность Т-лимфоцитов, стимулированных ДК<sub>к</sub>, снижалась в среднем на 30% (IQR 25-40; p<sub>w</sub> = 0,028; n = 6).

Чтобы выяснить, связан ли супрессорный эффект ДК<sub>декс</sub> с индукцией регуляторных Т-клеток, исследовали содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg и IL-10-продуцирующих Т-лимфоцитов (Tr1) в ауто-СКЛ (табл. 3). Относительное количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg в культурах, стимулированных ДК<sub>к</sub> и ДК<sub>декс</sub>, было достоверно выше,

**ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ДК<sub>декс</sub> БОЛЬНЫХ РА НА ПРОДУКЦИЮ Th1 (IFN $\gamma$ ), Th17 (IL-17) И Th2 (IL-4, IL-13) ЦИТОКИНОВ В АУТО-СКЛ**

TABLE 2. INFLUENCE OF DCs<sub>Dex</sub> OF RA PATIENTS ON Th1 (IFN $\gamma$ ), Th17 (IL-17) AND Th2 (IL-4, IL-13) CYTOKINE PRODUCTION IN AUTO-MLC

| Цитокины (пг/мл)<br>Cytokines (pg/ml) | Ауто-СКЛ<br>Auto-MLC                    |                                              | P <sub>w</sub> | Супрессия<br>Suppression<br>% |
|---------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|----------------|-------------------------------|
|                                       | + ДК <sub>к</sub><br>+ DCs <sub>c</sub> | + ДК <sub>декс</sub><br>+ DCs <sub>Dex</sub> |                |                               |
| IFN $\gamma$                          | 1120<br>(834-8620)                      | 660<br>(330-900)                             | 0,017          | 85 (40-96)                    |
| IL-17                                 | 460<br>(355-610)                        | 150<br>(140-260)                             | 0,027          | 60 (57-72)                    |
| IL-4                                  | 49<br>(39-54)                           | 37<br>(29-45)                                | 0,04           | 42 (26-67)                    |
| IL-13                                 | 78<br>(62-199)                          | 52<br>(44-58)                                | 0,011          | 14 (11-39)                    |

**Примечание.** Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках). IFN-ДК больных РА (n = 8), генерированные в отсутствие (ДК<sub>к</sub>) или присутствии дексаметазона (ДК<sub>декс</sub>), культивировали с аутологичными МНК в соотношении 1:10. Продукцию цитокинов оценивали на 5 сут. P<sub>w</sub> – достоверность различий эффекта ДК<sub>декс</sub> по сравнению с контрольными ДК (W-критерий Вилкоксона).

Процент супрессии рассчитывали по формуле: 100% - (ДК<sub>декс</sub> × 100/ДК<sub>к</sub>).

Note. Data are presented as median and interquartile range (in brackets). IFN-DCs of RA patients (n = 8) generated without or with dexamethasone (DCs<sub>c</sub> and DCs<sub>Dex</sub> respectively) were culturing with autologous MNC as 1:10. Cytokine production was assessed on day 5. P<sub>w</sub>, the significance of differences of DCs<sub>Dex</sub> compared with DCs<sub>c</sub> (Wilcoxon Matched Pairs Test).

The percentage of suppression was calculated as 100% - (DCs<sub>Dex</sub> × 100/ DCs<sub>c</sub>).

чем среди интактных МНК, однако значимо не различалось. Стимуляция МНК ДК<sub>декс</sub> также сопровождалась значимым возрастанием доли CD4<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>Т-клеток. Но в этом случае относительное содержание CD4<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>Tr1 было достоверно выше, чем при стимуляции контрольными ДК. Таким образом, супрессорная активность ДК<sub>декс</sub> в ауто-СКЛ была сопряжена с индукцией IL-10-продуцирующих CD4<sup>+</sup>Т-клеток.

## Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют, что дексаметазон-модифицированные ДК, генерируемые у больных РА из моноцитов в присутствии IFN $\alpha$ , обладают толерогенным эффектом и индуцируют состояние гипореактивности Т-лимфоцитов в ауто-СКЛ. Гипореактивность Т-клеток ассоциирована с блокированием клеточного цикла в популяции CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и угнетением продукции Th1 (IFN $\gamma$ ), Th17 (IL-17) и Th2 (IL-13 и IL-4) цитокинов, что свидетельствует об индукции анергии CD4<sup>+</sup>Т-клеток. При этом более выраженная ингибция синтеза IFN $\gamma$  и IL-17 указывает на большую подверженность анергии Th1- и Th17-клеток. Снижение пролиферативного ответа в ауто-СКЛ ассоциировано также с усилением апоптоза Т-лимфоцитов. Кроме того, ДК<sub>декс</sub> больных РА обладают супрессорным эффектом, в частности подавляют пролифера-

цию аутологичных Т-клеток, стимулированных контрольными ДК. Данный эффект сопряжен с возрастанием в ауто-СКЛ доли CD4<sup>+</sup>Т-клеток, секретирующих IL-10, и свидетельствует о способности ДК<sub>декс</sub> индуцировать конверсию CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в регуляторные Т-клетки (Tr1).

Дексаметазон, широко используемый в клинической практике, оказывает ингибирующий эффект на созревание и функции ДК *in vitro* и *in vivo*, что обосновывает возможность его применения для генерации тДК [11, 24, 36]. Влияние дексаметазона на свойства ДК у человека наиболее хорошо исследовано в отношении IL-4-ДК здоровых доноров, а механизмы подавления Т-клеточных функций – в алло-СКЛ [35]. Показано, что дексаметазон-модифицированные IL-4-ДК обладают толерогенным фенотипом (сниженной экспрессией костимуляторных молекул и повышенным уровнем коингибиторных молекул) и сниженной продукцией провоспалительных цитокинов, а их ингибирующий эффект на Т-лимфоциты связан с индукцией анергии и генерацией IL-10-секретирующих CD4<sup>+</sup>Т-клеток [4, 24, 30, 36]. Garcia-Gonzalez P.A. и соавт., используя 5-дневный протокол генерации IL-4-ДК в присутствии дексаметазона и активации ДК в последние 24 часа монофосфорил-липидом А, показали возможность получения тДК у больных РА [11]. Генерируемые ДК характеризовались сниженной экспрессией ко-

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ДК<sub>декс</sub> БОЛЬНЫХ РА НА СОДЕРЖАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК В АУТО-СКЛ

TABLE 3. INFLUENCE OF DCs<sub>декс</sub> OF RA PATIENTS ON THE CONTENT OF REGULATORY T-CELLS IN AUTO-MLC

|                                                                     | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> Treg<br>(n = 9) |                                                                                | CD4 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> Tr1<br>(n = 8) |                                                                                  |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                     | % клеток<br>Cells percent                                             | P <sub>w</sub>                                                                 | % клеток<br>Cells percent                          | P <sub>w</sub>                                                                   |
| <b>МНК (1)</b><br>MNC (1)                                           | 0,9 (0,7-1,1)                                                         | p <sub>1-2</sub> = 0,007<br>p <sub>1-3</sub> = 0,02<br>p <sub>2-3</sub> = 0,21 | 4,0 (2,5-7,0)                                      | p <sub>1-2</sub> = 0,176<br>p <sub>1-3</sub> = 0,013<br>p <sub>2-3</sub> = 0,012 |
| <b>МНК + ДК<sub>к</sub> (2)</b><br>MNC + DCs <sub>к</sub> (2)       | 1,7 (1,3-2,6)                                                         |                                                                                | 6,5 (4,8-7,0)                                      |                                                                                  |
| <b>МНК + ДК<sub>декс</sub> (3)</b><br>MNC + DCs <sub>декс</sub> (3) | 1,3 (1,2-2,0)                                                         |                                                                                | 8,5 (6,0-9,6)                                      |                                                                                  |

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках). IFN-ДК больных РА, генерированные в отсутствие (ДК<sub>к</sub>) или присутствии дексаметазона (ДК<sub>декс</sub>), культивировали с аутологичными МНК в соотношении 1:10. Относительное содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>T-клеток оценивали на 5 сут. P<sub>w</sub> – критерий Вилкоксона.

Note. Data are presented as median and interquartile range (in brackets). IFN-DCs of RA patients generated without or with dexamethasone (DCs<sub>к</sub> and DCs<sub>декс</sub> respectively) were culturing with autologous MNC as 1:10. Content of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>T cells was assessed on day 5. P<sub>w</sub>, Wilcoxon Matched Pairs Test.

стимуляторных молекул, высоким соотношением продуцируемых IL-10/IL-12, а также индуцировали гипореактивность Т-клеток, отвечающих в ауто-СКЛ и распознающих синовиальные антигены, хотя снижение пролиферативного ответа в ауто-СКЛ не было статистически значимым. Hilkens С.М. и Isaacs J.D. продемонстрировали возможность получения тДК у больных РА при использовании 7-дневного протокола генерации IL-4-ДК. Дексаметазон-индуцированные тДК больных были сравнимы с тДК здоровых доноров, характеризовались сниженной экспрессией костимуляторных молекул и продукцией провоспалительных цитокинов, низкой способностью стимулировать антиген-специфический ответ аутологичных Т-клеток и наличием супрессорной активности [16]. Однако авторы не выявили ингибирующего эффекта тДК в ауто-СКЛ.

Новизна полученных в настоящей работе результатов заключается в том, что нами впервые охарактеризованы механизмы ингибирующего действия тДК, полученных на платформе IFNα-индуцированных ДК, причем эффекты этих клеток исследованы у больных РА в ауто-СКЛ. Ауто-СКЛ является хорошо известным витральным подходом, отражающим пролиферацию Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию аутологичными не-Т-клетками, среди которых наиболее эффективными стимуляторами являются ДК [18, 31]. Хотя доминирующей субпопуляцией отвечающих клеток считаются CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>Т-лимфоциты [17], наивные CD8<sup>+</sup>Т-клетки также пролиферируют в ауто-СКЛ [12]. Предполагается, что пролиферации подвержены Т-лимфоциты

с низкоаффинными Т-клеточными рецепторами, распознающими собственные антигены МНС в комплексе с аутологичными пептидами или модифицированными каспазами нуклеогистонами апоптотических клеток [3, 29]. Данная реакция направлена на поддержание пула наивных Т-клеток и является отражением гомеостатической пролиферации Т-лимфоцитов *in vivo* [29]. Однако, поскольку пролиферирующие Т-клетки распознают собственные антигены, то их накопление препятствует поддержанию Т-клеточной толерантности. Учитывая, что CD4<sup>+</sup>Т-лимфоциты больных РА подвержены гомеостатической пролиферации [33], выявленный нами ингибирующий эффект ДК<sub>декс</sub> в ауто-СКЛ у больных РА свидетельствует о способности этих клеток ограничивать репликацию аутореактивных Т-лимфоцитов и, возможно, участвовать в негативной регуляции гомеостатической пролиферации. Согласно данным Ge Q. и соавт., пролиферация Т-клеток в системе сокультивирования ДК с аутологичными Т-лимфоцитами подвержена негативной регуляции со стороны CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток [12]. Результаты настоящего исследования демонстрируют, что угнетение функций аутореактивных Т-клеток под действием ДК<sub>декс</sub> опосредуется с вовлечением нескольких механизмов, включая индукцию анергии и апоптоза отвечающих Т-клеток, а также генерацию регуляторных Tr1-клеток.

По способности индуцировать анергию Т-клеток и генерацию Tr1 IFN-ДК<sub>декс</sub> оказались сходными с дексаметазон-модифицированными IL-4-ДК, однако обладали проапоптогенной

активностью, нетипичной для IL-4-ДК<sub>декс</sub> [5, 21]. Способность IFN-ДК<sub>декс</sub> индуцировать анергию Т-клеток обусловлена, по всей видимости, незрелым фенотипом ДК, включая сниженную экспрессию костимуляторных молекул, и повышенной экспрессией TLR2, который позиционируется в качестве оптимального маркера при оценке качества дексаметазон-модифицированных толерогенных IL-4-ДК [11, 15]. Усиление экспрессии TLR2 является ответной реакцией на действие глюкокортикоидов и ассоциируется со сниженной секрецией IL-12 и высокой продукцией IL-10 и TGF- $\beta$  [7, 22], способных индуцировать Treg [10]. Исследования показали, что запуск продукции IL-10 при сигналинге через TLR2 связан с активацией в ДК  $\beta$ -катенина, и данный сигнальный путь рассматривается в качестве нового механизма, посредством которого ДК могут регулировать аутоиммунное воспаление [20]. Способность IFN-ДК<sub>декс</sub> индуцировать апоптоз Т-клеток обусловлена, по-видимому, повышенной экспрессией молекулы B7-H1, которая при связывании с PD1-рецептором вызывает апоптоз Т-лимфоцитов и коррелирует с толерогенной активностью ДК [9]. Ранее нами было показано, что блокирование PD-1L снижает проапоптогенную активность IFN-ДК в алло-СКЛ [2], а усиление экспрессии данной моле-

кулы на IFN-ДК при патологии может являться причиной повышенной апоптоз-стимулирующей активности IFN-ДК [26].

Результаты исследования представляют интерес в нескольких аспектах. Во-первых, охарактеризован новый тип тДК, обладающих ингибирующим действием в отношении аутореактивных Т-клеток в ауто-СКЛ. Во-вторых, охарактеризованы механизмы, посредством которых IFN-ДК<sub>декс</sub> оказывают ингибирующий эффект на аутореактивные Т-клетки. В третьих, полученные данные раскрывают новые механизмы ДК-опосредованного действия кортикостероидов, учитывая, что интерфероны I типа и регулируемые ими гены играют важную роль в патогенезе РА, в том числе регуляции ДК [6], а глюкокортикоиды активно используются в лечении РА. В этом аспекте представляет интерес тот факт, что резистентность к терапии анти-TNF-препаратами ассоциирована с меньшим соотношением IFN $\beta$ /IFN $\alpha$  в сыворотке крови [34], что может быть связано с активацией ДК при повышенном уровне IFN $\alpha$ . В этом случае не исключено, что пульс-терапия глюкокортикоидами за счет индукции толерогенных IFN-ДК может восстановить чувствительность к терапии биологическими препаратами.

## Список литературы / References

1. Курочкина Ю.Д., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Баторов Е.В., Сизиков А.Э., Останин А.А., Черных Е.Р. Влияние дексаметазона на интерферон- $\alpha$ -индуцированную дифференцировку моноцитов в дендритные клетки // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 347-356. [Kurochkina Yu.D., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Batorov E.V., Sizikov A.E., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Effect of dexamethasone on interferon- $\alpha$ -induced differentiation of monocytes to dendritic cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 347-356. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-347-356.
2. Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика сигнальных путей, опосредующих цитотоксический эффект дендритных клеток против активированных Т-лимфоцитов и NK-клеток // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 1-2. С. 43-50. [Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Sakhno L.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Characteristics of signaling pathways mediating a cytotoxic effect of dendritic cells upon activated T lymphocytes and NK cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 1-2, pp. 43-50. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-1-2-43-50.
3. AmelKashipaz M.R., Huggins M.L., Powell R.J., Todd I. Human autologous mixed lymphocyte reaction as an *in vitro* model for autoreactivity to apoptotic antigens. *Immunology*, 2002, Vol. 107, no. 3, pp. 358-365.
4. Bosma B.M., Metselaar H.J., Nagtzaam N.M., de Haan R., Mancham S., van der Laan L.J., Kuipers E.J., Kwekkeboom J. Dexamethasone transforms lipopolysaccharide-stimulated human blood myeloid dendritic cells into myeloid dendritic cells that prime interleukin-10 production in T cells. *Immunology*, 2008, Vol. 125, no. 1, pp. 91-100.
5. Calmette J., Ellouze M., Tran T., Karaki S., Ronin E., Capel F., Pallardy M., Bachelierie F., Krzysiek R., Emilie D., Schlecht-Louf G., Godot V. Glucocorticoid-induced leucine zipper enhanced expression in dendritic cells is sufficient to drive regulatory T cells expansion *in vivo*. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 12, pp. 5863-5872.

6. Castaneda-Delgado J.E., Bastian-Hernandez Y., Macias-Segura N., Santiago-Algarra D., Castillo-Ortiz J.D., Aleman-Navarro A.L., Martinez-Tejada P., Enciso-Moreno L., Garcia-De Lira Y., Olguin-Calderon D., Trouw L.A., Ramos-Remus C., Enciso-Moreno J.A. Type I interferon gene response is increased in early and established rheumatoid arthritis and correlates with autoantibody production. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 285. doi: 10.3389/fimmu.2017.00285.
7. Chamorro S., García-Vallejo J.J., Unger W.W., Fernandes R.J., Bruijns S.C., Laban S., Roep B.O., Hart B.A., van Kooyk Y. TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 5, pp. 2984-2994.
8. Choy E.H., Kavanaugh A.F., Jones S.A. The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2013, Vol. 9, no. 3, pp. 154-163.
9. Dai S., Jia R., Zhang X., Fang Q., Huang L. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. *Cell. Immunol.*, 2014, Vol. 290, no. 1, pp. 72-79.
10. Domogalla M.P., Rostan P.V., Raker V.K., Steinbrink K. Tolerance through education: how tolerogenic dendritic cells shape immunity. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1764. doi: 10.3389/fimmu.2017.01764.
11. Garcia-Gonzalez P.A., Schinnerling K., Sepulveda-Gutierrez A., Maggi J., Hoyos L., Morales R.A., Mehdi A.M., Nel H.J., Soto L., Pesce B., Molina M.C., Cuchacovich M., Larrondo M.L., Neira O., Catalan D.F., Hilken C.M., Thomas R., Verdugo R.A., Aguillon J.C. Treatment with dexamethasone and monophosphoryl lipid A removes disease-associated transcriptional signatures in monocyte-derived dendritic cells from rheumatoid arthritis patients and confers tolerogenic features. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 458. doi: 10.3389/fimmu.2016.00458.
12. Ge Q., Palliser D., Eisen H.N., Chen J. Homeostatic T cell proliferation in a T cell-dendritic cell coculture system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, Vol. 99, no. 5, pp. 2983-2988.
13. Gessani S., Conti L., Del Cornò M., Belardelli F. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins (Basel)*, 2014, Vol. 6, no. 6, pp. 1696-1723.
14. Guo Q., Wang Y., Xu D., Nossent J., Pavlos N.J., Xu J. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res.*, 2018, Vol. 6, p. 15.
15. Harry R.A., Anderson A.E., Isaacs J.D., Hilken C.M. Generation and characterization of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, Vol. 69, no. 11, pp. 2042-2050.
16. Hilken C.M., Isaacs J.D. Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now? *Clin. Exp. Immunol.*, 2013, Vol. 172, no. 2, pp. 148-157.
17. Kimura S., Fujimoto N., Okada H. Impaired autologous mixed-lymphocyte reaction of peripheral blood lymphocytes in adult periodontitis. *Infect. Immun.*, 1991, Vol. 59, no. 12, pp. 4418-4424.
18. Kondo T., Cortese I., Markovic-Plese S., Wandinger K.P., Carter C., Brown M., Leitman S., Martin R. Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nat. Immunol.*, 2001, Vol. 2, no. 10, pp. 932-938.
19. Leplina O.Y., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Interferon alpha induces generation of semi-mature dendritic cells with high pro-inflammatory and cytotoxic potential. *Cytokine*, 2015, Vol. 71, no. 1, pp. 1-7.
20. Manoharan I., Hong Y., Suryawanshi A., Angus-Hill M.L., Sun Z., Mellor A.L., Munn D.H., Manicassamy S. TLR2-dependent activation of  $\beta$ -catenin pathway in dendritic cells induces regulatory responses and attenuates autoimmune inflammation. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 8, pp. 4203-4213.
21. Naranjo-Gómez M., Raich-Regue D., Onate C., Grau-Lopez L., Ramo-Tello C., Pujol-Borrell R., Martinez-Caceres E., Borrás F.E.. Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J. Transl. Med.*, 2011, Vol. 9, p. 89.
22. Netea M.G., Suttmüller R., Hermann C., van der Graaf C.A., van der Meer J.W., van Krieken J.H., Hartung T., Adema G., Kullberg B.J. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 6, pp. 3712-3718.
23. Osorio F., Fuentes C., Lypczak M.N., Salazar-Onfray F., Gonzalez F.E. Role of dendritic cells in the induction of lymphocyte tolerance. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 535. doi: 10.3389/fimmu.2015.00535.
24. Piemonti L., Monti P., Allavena P., Sironi M., Soldini L., Leone B.E., Succi C., di Carlo V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 162, no. 11, pp. 6473-6481.
25. Romain P.L., Schlossman S.F., Reinherz E.L. Surface molecules involved in self-recognition and T cell activation in the autologous mixed lymphocyte reaction. *J. Immunol.*, 1984, Vol. 133, no. 3, pp. 1093-1100.
26. Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Shevela E.Ya., Nikonov S.D., Zhdanov O.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Cytotoxic activity of dendritic cells as a possible mechanism of negative regulation of T lymphocytes in pulmonary tuberculosis. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, Vol. 2012, 628635. doi: 10.1155/2012/628635.
27. Selim A., Yong-Soo B. Dendritic cell-based immunotherapy for rheumatoid arthritis: from bench to bedside. *Immune Network*, 2016, Vol. 16, no. 1, pp. 44-51.
28. Stoop J.N., Robinson J.H., Hilken C.M. Developing tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: what can we learn from mouse models? *Ann. Rheum. Dis.*, 2011, Vol. 70, no. 9, pp. 1526-1533.
29. Surh C.D., Sprent J. Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands? *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 4, pp. 9-14.

30. Unger W.W., Laban S., Kleijwegt F.S., van der Slik A.R., Roep B.O. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 11, pp. 3147-3159.
31. Vakkila J., Hurme M. Both dendritic cells and monocytes induce autologous and allogeneic T cells receptive to interleukin 2. *Scand. J. Immunol.*, 1990, Vol. 31, no. 1, pp. 75-83.
32. van Duivenvoorde L.M., Han W.G.H., Bakker A.M., Louis-Plence P., Charbonnier L.-M., Apparailly F., van der Voort E.I.H., Jorgensen C., Huizinga T.W.J., Toes R.E.M. Immunomodulatory dendritic cells inhibit Th1 responses and arthritis via different mechanisms. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 3, pp. 1506-1515.
33. Wagner U., Pierer M., Wahle M., Moritz F., Kaltenhäuser S., Häntzschel H. *Ex vivo* homeostatic proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells in rheumatoid arthritis is dysregulated and driven by membrane-anchored TNF- $\alpha$ . *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 4, pp. 2825-2833.
34. Wampler M.T., Vashisht P., Dorschner J.M., Jensen M.A., Chrabot B.S., Kern M., Curtis J.R., Danila M.I., Cofield S.S., Shadick N., Nigrovic P.A., St Clair E.W., Bingham C.O., Furie R., Robinson W., Genovese M.O., Striethorst C.C., O'Dell J.R., Thiele G.M., Moreland L.W., Levesque M., Bridges S.L. Jr, Gregersen P.K., Niewold T.B. Increased pretreatment serum IFN- $\beta/\alpha$  ratio predicts non-response to tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibition in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2016, Vol. 75, no. 10, pp. 1757-1762.
35. Woltman A.M., van der Kooij S.W., de Fijter J.W., van Kooten C. Maturation-resistant dendritic cells induce hyporesponsiveness in alloreactive CD45RA<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> T-cell populations. *Am. J. Transplant.*, 2006, Vol. 6, no. 11, pp. 2580-2591.
36. Xia C.Q., Peng R., Beato F., Clare-Salzler M.J. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand. J. Immunol.*, 2005, Vol. 62, no. 1, pp. 45-54.

**Авторы:**

**Курочкина Ю.Д.** — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии, врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Тыринова Т.В.** — к.м.н., научный сотрудник лаборатории 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

**Сизиков А.Э.** — к.м.н., заведующий отделением ревматологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Kurochkina Yu.D.**, Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Rheumatologist, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Tyrinova T.V.**, PhD (Medicine), Research Associate, 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

**Sizikov A.E.**, PhD (Medicine), Head, Rheumatology Department, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Сулутьян А.Э.** — к.м.н., врач-ревматолог отделения ревматологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Чумасова О.А.** — к.м.н., врач-ревматолог отделения ревматологии клиники иммунопатологии 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

**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

**Sulutian A.E.**, PhD (Medicine), Rheumatologist, Rheumatology Department, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Chumasova O.A.**, PhD (Medicine), Rheumatologist, Rheumatology Department, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Поступила 17.10.2019  
Принята к печати 19.10.2019

Received 17.10.2019  
Accepted 19.10.2019



## КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ МИНОРНЫЕ АНТИГЕНЫ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ДЛЯ РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАЮЩИХ ТРАНСПЛАНТАЦИЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРОВИ

Романюк Д.С., Хмелевская А.А., Постовская А.М., Малько Д.Б.,  
Кузьмина Е.П., Хамаганова Е.Г., Ефимов Г.А.

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

**Резюме.** Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от здорового донора применяется при лечении неопластических заболеваний кроветворной системы. Одним из осложнений трансплантации является развитие аллоиммунной реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), которая в случае полной совместимости по аллелям генов главного комплекса гистосовместимости (HLA) обусловлена различиями в пептидах, представляемых молекулами HLA на поверхности клеток. Такие полиморфные пептиды — минорные антигены гистосовместимости (МАГ) — могут происходить из любых генов, в том числе специфично экспрессированных в клетках кроветворной системы. В этом случае развивается реакция «трансплантат против лейкоза» (РТПЛ), которая препятствует развитию рецидива. Одним из самых частых аллелей HLA для европейской части России является аллель A\*02:01. Нами были оценены частоты 20 полиморфизмов, приводящих к появлению МАГ, представляемых в контексте молекул A\*02:01, для потенциальных доноров костного мозга или стволовых клеток крови (СКК) регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, также мы определили встречаемость иммуногенных несоответствий в реальных парах донор — реципиент. Всего было генотипировано 608 потенциальных доноров, 90 доноров и 92 пациента. При сравнении с публичными базами данных частот полиморфизмов было показано, что частоты аллелей МАГ в российской популяции наиболее близки к частотам европейской популяции. На основании этих данных была рассчитана вероятность возникновения после ТГСК аллоиммунного ответа, направленного против МАГ: в 33 и 75% случаев родственной и неродственной ТГСК, соответственно, ожидается три и более генетических иммуногенных несоответствия (ИН). Подсчет реального числа ИН в 20 родственных и 20 неродственных парах донор — реципиент согласуется с теоретическим расчетом. Исходя из определенных частот, самыми перспективными для российской популяции мишенями для разработки направленной клеточной терапии злокачественных заболеваний кроветворной системы являются МАГ LB-NDC80-1P/A, LB-CC14-1T и HA-1. Полученные данные можно использовать при планировании алло-ТГСК для российских пациентов.

**Ключевые слова:** минорные антигены гистосовместимости, МАГ, HA-1, ОНП, АСП, аллель-специфичный праймер, АС-ПЦР-РВ, аллель-специфичная ПЦР в реальном времени, РТПХ, РТПЛ

### Адрес для переписки:

Ефимов Григорий Александрович  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский  
центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ  
125167, Россия, Москва, Новый Зыковский проезд, 4.  
Тел.: 8 (495) 612-44-43.  
E-mail: efimov.g@blood.ru

### Address for correspondence:

Efimov Grigory A.  
National Research Center for Hematology  
125167, Russian Federation, Moscow, Novy Zykovsky pass., 4.  
Phone: 7 (495) 612-44-43.  
E-mail: efimov.g@blood.ru

### Образец цитирования:

Д.С. Романюк, А.А. Хмелевская, А.М. Постовская,  
Д.Б. Малько, Е.П. Кузьмина, Е.Г. Хамаганова,  
Г.А. Ефимов «Клинически значимые минорные антигены  
гистосовместимости для российских пациентов,  
получающих трансплантацию стволовых клеток  
крови» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5.  
С. 847-860. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-847-860  
© Романюк Д.С. и соавт., 2019

### For citation:

D.S. Romaniuk, A.A. Khmelevskaya, A.M. Postovskaya,  
D.B. Malko, E.P. Kuzminova, E.G. Khamaganova,  
G.A. Efimov "Clinically relevant minor histocompatibility  
antigens for Russian patients undergoing hematopoietic  
stem cell transplantation", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5,  
pp. 847-860. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-847-860  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-847-860

# CLINICALLY RELEVANT MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS FOR RUSSIAN PATIENTS UNDERGOING HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Romaniuk D.S., Khmelevskaya A.A., Postovskaya A.M., Malko D.B., Kuzminova E.P., Khamaganova E.G., Efimov G.A.

National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from healthy donors is used for blood cancer treatment. Alloreactive graft-versus-host disease (GvHD) is one of the post-transplant detrimental side effects, and the main reason for GvHD after HSCT fully matched for human leukocyte peptide antigens (HLA) presented by HLA molecules on cell surface. These polymorphic peptides, minor histocompatibility antigens (MiHA), arise from any genes, including those expressed at hematopoietic tissues. The latter may lead to the s.c. graft-versus-leukemia effect (GvL), thus preventing relapse of a malignancy. A\*02:01 is one of the most frequent HLA alleles for European part of Russia. We assessed frequencies for 20 MiHA-encoded genetic polymorphisms, presented *via* A\*02:01 allele, for plausible bone marrow donors, or hematopoietic stem cells (HSC) from the Donor Registry at Russian National Research Center for Hematology, we have also determined a number of immunogenic mismatches for these 20 MiHA in real donor – recipient pairs. A total of 608 potential donors, 90 donors and 92 recipients were genotyped. Using public data, we have shown that frequencies for MiHA coding genes are most close to appropriate frequencies among the European population. We have calculated probability of MiHA-specific alloimmune response after HSCT: there are chances of 33 and 75% for three or more immunogenic mismatches (IM) for related and unrelated HSCTs, respectively. Real frequencies for immune mismatch in 20 related and 20 unrelated donor – recipient pairs are in accordance with estimated theoretical probabilities. As based on the calculated frequencies, we suggest the LB-NDC80-1P/A, LB-CCL4-1T, and HA-1 MiHA to be the most promising minor antigens for targeted cell therapies of hematopoietic tissue malignancies. The data obtained could be used for planning allo-HSCTs in Russian patients.

**Keywords:** minor histocompatibility antigen, MiHA, HA-1, SNP, ASP, allele-specific primer, AS-qPCR, allele-specific qPCR, GvHD, GvL

Статья написана при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 17-15-01512).

## Введение

Минорные антигены гистосовместимости (МАГ) являются полиморфными пептидами, которые презентуются на поверхности клетки молекулами главного комплекса гистосовместимости (HLA) I или II классов. МАГ чаще всего возникают в результате несинонимических однонуклеотидных замен (нсОНП), инсерций и делеций [12]. Как правило, кодирующие МАГ полиморфизмы биаллельные, и только один из аллелей является иммуногенным – приводит к презентации пептида на поверхности клетки [29]. При трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) может развиваться иммунный ответ на МАГ [4]. Таким образом, минорные антигены гистосовместимости могут влиять на исход трансплантации

гемопоэтических стволовых клеток. Несовпадение донора и реципиента по МАГ может приводить к отторжению трансплантата, развитию реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) или реакции «трансплантат против лейкоза» (РТПЛ) [11, 19]. Отдельные МАГ, специфично экспрессируемые в гемопоэтической ткани реципиента, могут быть мишенями для Т-клеточной иммунотерапии [20].

Каждый МАГ представляется, как правило, одним, а в редких случаях несколькими аллелями HLA. Аллель HLA-A\*02:01 является самым распространенным в российской популяции. В московском регионе частота аллельной группы A\*02 достигает 29% (база данных «Allele Frequency Net», <http://www.allelefrequency.net>), при этом известно, что доля аллеля A\*02:01 для серотипа A\*02 достигает 98% (база данных «IPD-IMGT/HLA», <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>). Это значит, что около 50% пациентов и доноров яв-

ляются носителями HLA-A\*02:01. Для того чтобы выявить наиболее иммуногенные в российской популяции МАГ и в том числе наиболее перспективные в качестве мишеней для клеточной терапии, мы проанализировали частоты встречаемости 20 HLA-A\*02:01-рестрицированных минорных антигенов среди 608 потенциальных доноров стволовых клеток крови (СКК) регистра костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, а также 90 доноров СКК и 92 реципиентов, участвовавших в алло-ТГСК в «НМИЦ гематологии».

#### Экспериментальная часть

##### Образцы ДНК

Для анализа были взяты образцы геномной ДНК регистра потенциальных доноров костного мозга и стволовых клеток крови ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, а также образцы ДНК, выделенной из периферической крови реципиентов до алло-ТГСК и их доноров. Геномную ДНК потенциальных доноров из регистра выделяли с помощью прибора Arrow и наборов реагентов для него Arrow Blood DNA 200 (NorDiag, Норвегия). Геномную ДНК пар донор – реципиент выделяли с помощью набора для очистки Wizard (Promega, США). Всего было генотипировано 790 образцов ДНК: 608 потенциальных доноров регистра, 90 доноров СКК и 92 пациента до проведения алло-ТГСК. Аллели HLA при этом не учитывались.

##### Генотипирование

20 МАГ, презентруемые в HLA-A\*02:01, были выбраны на основе литературных данных (табл. 1). Все выбранные для исследования полиморфизмы не связаны между собой и наследуются независимо. Быстрое генотипирование полиморфизмов, кодирующих МАГ, проводилось методом мультиплексной ПЦР в реальном времени с аллель-специфичными праймерами (АС-ПЦР-РВ), описанным ранее [28]. Для каждого образца ДНК определяли аллели 19 нсОНП и одной делеции гена. АС-ПЦР-РВ проводили готовыми растворами, содержащими следующие компоненты: смесь для проведения ПЦР-РВ qPCRMix-HS (Евроген, Россия); праймеры и зонды для генотипирования, сгруппированные для референсных и альтернативных аллелей нсОНП по четыре; набор праймеров и зондов к гену В2М в качестве внутреннего контроля. Для определения делеции гена UGT2B17 в обеих АС-ПЦР-РВ использовались одинаковые праймеры и зонд. Готовые реакционные смеси для АС-ПЦР-РВ предварительно проверялись. В качестве контроля использовались фрагменты генов, содержащие исследуемые нсОНП, кло-

нированные с помощью вектора pJet1.2 в составе набора CloneJET PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific, США) и бактериального штамма *E. coli* DH5α. Выделение плазмид осуществлялось с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific, США), их проверка проводилась методом секвенирования по Сэнгеру с использованием реактивов и секвенатора ABI 3500 фирмы Applied Biosystems (США).

Результат генотипирования определяли по разнице пороговых циклов ПЦР-РВ для двух реакций: АС-ПЦР-РВ, содержащей аллель-специфичный праймер к референсному аллелю нсОНП, и АС-ПЦР-РВ, содержащей аллель-специфичный праймер к альтернативному состоянию нсОНП. Референсное состояние нсОНП определялось согласно референсному геному человека: <http://ensembl.org>, сборка генома GRCh38. Всего было генотипировано 790 человек. После этого были отсеяны образцы, где отсутствовали данные хотя бы для одного локуса.

Как иммуногенные несоответствия определялись такие: у реципиента есть один или два иммуногенных аллеля МАГ, а донор гомозигота по неиммуногенному аллелю. Иммуногенный (доминантный) аллель определялся по литературным данным, для всех этих аллелей показано присутствие соответствующего пептида на поверхности клетки в комплексе с молекулами HLA-A\*02:01 (табл. 1), также для них показана индукция специфического иммунного ответа. Для МАГ LB-SSR1-1S, LB-NISCH-1A, LB-CLYBL-1Y и LB-NDC80-1P показано присутствие на поверхности клетки продуктов альтернативных аллелей – пептидов LB-SSR1-1L, LB-NISCH-1V, LB-CLYBL-1D и LB-NDC80-1A соответственно [4, 12]. Для таких МАГ иммуногенное несоответствие определялось по тому же алгоритму, но для каждого из двух аллелей.

##### Статистический анализ

Статистический анализ выполнялся с использованием программного обеспечения RStudio версии 1.0.143 и языка программирования R версии 3.5.1. Образцы ДНК были разделены на две части. В одну часть вошли потенциальные доноры СКК регистра, а также пациенты и доноры СКК, которые после фильтрации не имели генотипированной пары. Дополнительно из этой группы были отсеяны образцы ДНК от родственников: случайным образом оставляли только один образец ДНК от связанных людей. Полученные данные для оставшихся 365 людей проверялись и использовались для расчета частот аллелей МАГ, как описано далее. Во вторую часть вошли пары

ТАБЛИЦА 1. МИНОРНЫЕ АНТИГЕНЫ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫЕ В КОНТЕКСТЕ АЛЛЕЛЯ HLA A\*02:01

TABLE 1. MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS PRESENTED VIA HLA-A\*02:01 ALLELE

| МАГ<br>MiHA    | Ген<br>Gene     | Хр.<br>Ch. | Нт.<br>Nt. | АК<br>AA   | Номер<br>ID | Ссылка<br>Ref. |
|----------------|-----------------|------------|------------|------------|-------------|----------------|
| HER-2/NEU      | <i>ERBB2</i>    | 17         | <b>C/G</b> | <b>P/A</b> | rs1058808   | [23]           |
| HA-1/A2        | <i>ARHGAP45</i> | 19         | <b>G/A</b> | <b>R/H</b> | rs1801284   | [24]           |
| HA-2           | <i>MYO1G</i>    | 7          | <b>C/T</b> | <b>V/M</b> | rs61739531  | [25]           |
| UTA2-1         | <i>KIAA1551</i> | 12         | <b>T/C</b> | <b>L/P</b> | rs2166807   | [26]           |
| LB-ADIR-1F     | <i>TOR3A</i>    | 1          | <b>T/C</b> | <b>F/S</b> | rs2296377   | [27]           |
| LB-CLYBL-1Y    | <i>CLYBL</i>    | 13         | <b>G/T</b> | <b>D/Y</b> | rs17577293  | [28]           |
| C19ORF48       | <i>C19ORF48</i> | 19         | <b>T/A</b> | <b>T/S</b> | rs3745526   | [29]           |
| TRIM22         | <i>TRIM22</i>   | 11         | <b>C/T</b> | <b>R/C</b> | rs187416296 | [30]           |
| LB-PRCP-1D     | <i>PRCP</i>     | 11         | <b>T/G</b> | <b>E/D</b> | rs2229437   | [32]           |
| LB-SSR1-1S     | <i>SSR1</i>     | 6          | <b>A/G</b> | <b>L/S</b> | rs10004     | [32]           |
| LB-WNK1-1I     | <i>WNK1</i>     | 12         | <b>G/T</b> | <b>M/I</b> | rs12828016  | [32]           |
| T4A1           | <i>TRIM42</i>   | 3          | <b>C/A</b> | <b>A/E</b> | rs9876490   | [33]           |
| HA-8           | <i>PUM3</i>     | 9          | <b>C/G</b> | <b>R/P</b> | rs2173904   | [34]           |
| LB-HIVEP1-1S   | <i>HIVEP1</i>   | 6          | <b>A/G</b> | <b>N/S</b> | rs2228220   | [35]           |
| LB-NISCH-1A(V) | <i>NISCH</i>    | 3          | <b>C/T</b> | <b>A/V</b> | rs887515    | [35]           |
| UGT2B17/A2     | <i>UGT2B17</i>  | 4          |            |            | esv3600873  | [36]           |
| LB-CCL4-1T     | <i>CCL4</i>     | 17         | <b>T/A</b> | <b>S/T</b> | rs1719152   | [10]           |
| LB-NCAPD3-1Q   | <i>NCAPD3</i>   | 11         | <b>C/T</b> | <b>R/Q</b> | rs12292394  | [10]           |
| LB-NDC80-1P(A) | <i>NDC80</i>    | 18         | <b>G/C</b> | <b>A/P</b> | rs9051      | [10]           |
| WDR27-1L       | <i>WDR27</i>    | 6          | <b>A/G</b> | <b>L/P</b> | rs4236176   | [1]            |

Примечание. Хр. – хромосома, содержащая представленный ген; Нт. – нуклеотидный полиморфизм; АК – аминокислотная замена; Номер – идентификационный номер полиморфизма, согласно базам данных dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) и Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Иммуногенный аллель и соответствующие нуклеотид и аминокислота выделены жирным, первым идет референсный аллель, согласно базе данных Ensembl (<http://ensembl.org>, версия генома – GRCh38).

Note. MiHA, minor histocompatibility antigen; Ch., chromosome, containing MiHA coding gene; Nt., nucleotide polymorphism; AA, amino acid substitution; ID, identification number for polymorphism, according dbSNP and Ensembl databases (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, <http://www.ensembl.org>). Ref., reference. Immunogenic allele and corresponding nucleotide and amino acid are in bold, reference MiHA allele stands first (Ensembl database, reference genome – GRCh38).

донор – реципиент: всего 79 человек, из них 39 человек, участвовавших в неродственной алло-ТГСК (у одного пациента было два донора), и 40 человек для родственной алло-ТГСК. Для этих пар определяли иммуногенные несоответствия по приведенному выше алгоритму.

Далее полученные генотипы МАГ для первой группы – 365 человек – переводились в цифровую кодировку, где 0 соответствовал гомозиготе по референсному аллелю нсОМП, 1 – гетерозиготе, а 2 – гомозиготе по альтернативному аллелю.

Расчет частоты аллелей производили по формуле (1).

$$p = \frac{2 \cdot \text{homo} + \text{hetero}}{2 \cdot n}, \quad (1)$$

где homo – количество всех гомозигот для данного аллеля, hetero – количество гетерозигот, а n – количество образцов.

Использованный метод генотипирования не позволяет определять количество копий гена для делеции гена UGT2B17 – невозможно разделить две копии гена и моноаллельную делецию,

**ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТЫ ИММУНОГЕННЫХ АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФИЗМОВ, КОДИРУЮЩИХ МАГ В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ И В ПЯТИ СУПЕРПОПУЛЯЦИЯХ ПРОЕКТА «1000 ГЕНОМОВ» (<http://www.internationalgenome.org>), РАНЖИРОВАННЫЕ ПО ЧАСТОТАМ РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ**

TABLE 2. IMMUNOGENIC ALLELES FREQUENCIES FOR POLYMORPHISMS, CODING MIHA, FOR RUSSIAN POPULATION AND FIVE SUPER POPULATIONS FROM 1000 GENOMES PROJECT (<http://www.internationalgenome.org>), SORTED BY FREQUENCIES FOR RUSSIAN POPULATION

| МАГ<br>MiHA  | RUS   | EUR      | AMR   | EAS   | AFR   | SAS   |
|--------------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|
| HA-2         | 0,788 | 0,770    | 0,814 | 0,905 | 0,871 | 0,940 |
| WDR27-1L     | 0,693 | 0,708    | 0,447 | 0,063 | 0,520 | 0,557 |
| UGT2B17/A2   | 0,608 | 0,632    | 0,655 | 0,174 | 0,755 | 0,392 |
| T4A1         | 0,485 | 0,467    | 0,494 | 0,610 | 0,728 | 0,616 |
| HA-8         | 0,397 | 0,458*   | 0,496 | 0,459 | 0,367 | 0,380 |
| HA-1/A2      | 0,374 | 0,345    | 0,386 | 0,361 | 0,527 | 0,360 |
| HER-2/NEU    | 0,348 | 0,327    | 0,520 | 0,598 | 0,808 | 0,391 |
| LB-WNK1-1I   | 0,322 | 0,388**  | 0,322 | 0,281 | 0,552 | 0,475 |
| C19ORF48     | 0,290 | 0,301    | 0,217 | 0,654 | 0,132 | 0,375 |
| LB-SSR1-1S   | 0,288 | 0,246    | 0,155 | 0,261 | 0,514 | 0,181 |
| UTA2-1       | 0,266 | 0,211**  | 0,182 | 0,176 | 0,094 | 0,165 |
| LB-ADIR-1F   | 0,264 | 0,288    | 0,357 | 0,332 | 0,012 | 0,284 |
| LB-CCL4-1T   | 0,249 | 0,249    | 0,118 | 0,276 | 0,049 | 0,228 |
| LB-NDC80-1P  | 0,234 | 0,229    | 0,136 | 0,125 | 0,124 | 0,312 |
| LB-PRCP-1D   | 0,145 | 0,187*   | 0,130 | 0,113 | 0,105 | 0,171 |
| LB-NISCH-1A  | 0,130 | 0,176**  | 0,189 | 0,022 | 0,692 | 0,119 |
| LB-HIVEP1-1S | 0,118 | 0,116    | 0,101 | 0,130 | 0,180 | 0,186 |
| LB-CLYBL-1Y  | 0,082 | 0,030*** | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,006 |
| LB-NCAPD3-1Q | 0,068 | 0,054    | 0,023 | 0,015 | 0,001 | 0,045 |
| TRIM22       | 0,007 | 0,010    | 0,010 | 0,000 | 0,001 | 0,000 |

**Примечание.** RUS – российская популяция; EUR, AMR, EAS, AFR и SAS – суперпопуляции, согласно проекту «1000 геномов» – европейская, смешанная американская, восточноазиатская, африканская и южноазиатская соответственно. Отмечена статистическая значимость различий европейской и российской популяций: \*, \*\* и \*\*\* –  $p < 0,05$ ,  $0,005$  и  $0,0001$  соответственно.

Note. MiHA, minor histocompatibility antigen; RUS, Russian population; EUR, AMR, EAS, AFR and SAS, European, Ad Mixed American, East Asian, African and South Asian super population respectively, according to 1000 Genomes Project. Statistically significant difference between Russian and European populations are marked with asterisks: \*, \*\* and \*\*\*,  $p < 0.05$ ,  $0.005$  and  $0.0001$  respectively.

поэтому частота делеции определялась через закон Харди–Вайнберга (ЗХВ), так как, согласно [30], распределение этой делеции в суперпопуляциях проекта «1000 геномов» соответствует ЗХВ. Далее проверялось соответствие ЗХВ частот генотипов нсОНП, при этом нсОНП, кодирующий МАГ TRIM22 с частотой одного из аллелей менее 0,01, был исключен из анализа. Ожидаемое

количество генотипов для каждого нсОНП сравнивалось с наблюдаемым с использованием критерия хи-квадрат. Все 18 нсОНП соответствовали ЗХВ ( $p = 1 \times 10^{-6}$ ). Для сравнения данных «НМИЦ гематологии» с данными проекта «1000 геномов» (<http://www.internationalgenome.org>) генотипы 2504 человек для 19 нсОНП были загружены и приведены к описанной выше кодировке дан-

ТАБЛИЦА 3. ИНДЕКС ИММУНОГЕННОСТИ (ИИ) МАГ В РАЗНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ДЛЯ НЕРОДСТВЕННЫХ ПАР ДОНОР – РЕЦИПИЕНТ

TABLE 3. MiHA IMMUNOGENIC INDEX FOR UNRELATED MATCHED DONOR – RECIPIENT PAIRS FOR DIFFERENT POPULATIONS

| МАГ<br>MiHA       | RUS   | EUR   | AMR   | EAS   | AFR   | SAS   |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| LB-SSR1-1         | 0,328 | 0,302 | 0,227 | 0,311 | 0,375 | 0,253 |
| <b>LB-NDC80-1</b> | 0,299 | 0,291 | 0,207 | 0,195 | 0,194 | 0,337 |
| C19ORF48          | 0,250 | 0,250 | 0,237 | 0,106 | 0,186 | 0,238 |
| LB-WNK1-1I        | 0,249 | 0,235 | 0,221 | 0,218 | 0,147 | 0,211 |
| UTA2-1            | 0,249 | 0,250 | 0,243 | 0,247 | 0,024 | 0,250 |
| LB-ADIR-1F        | 0,248 | 0,234 | 0,248 | 0,250 | 0,160 | 0,199 |
| <b>LB-CCL4-1T</b> | 0,246 | 0,248 | 0,177 | 0,135 | 0,036 | 0,233 |
| HER-2/NEU         | 0,245 | 0,246 | 0,173 | 0,249 | 0,087 | 0,241 |
| <b>HA-1/A2</b>    | 0,239 | 0,245 | 0,235 | 0,242 | 0,174 | 0,242 |
| HA-8              | 0,232 | 0,207 | 0,190 | 0,207 | 0,240 | 0,237 |
| T4A1              | 0,198 | 0,203 | 0,190 | 0,129 | 0,068 | 0,126 |
| LB-PRCP-1D        | 0,198 | 0,248 | 0,260 | 0,042 | 0,336 | 0,187 |
| LB-NISCH-1        | 0,197 | 0,224 | 0,184 | 0,168 | 0,160 | 0,215 |
| LB-HIVEP1-1S      | 0,173 | 0,171 | 0,155 | 0,184 | 0,220 | 0,224 |
| LB-CLYBL-1        | 0,139 | 0,056 | 0,006 | 0,000 | 0,000 | 0,012 |
| UGT2B17/A2        | 0,133 | 0,117 | 0,105 | 0,217 | 0,056 | 0,233 |
| LB-NCAPD3-1Q      | 0,114 | 0,094 | 0,044 | 0,029 | 0,002 | 0,080 |
| WDR27-1L          | 0,086 | 0,078 | 0,212 | 0,108 | 0,177 | 0,158 |
| <b>HA-2</b>       | 0,041 | 0,050 | 0,034 | 0,009 | 0,016 | 0,004 |
| TRIM22            | 0,014 | 0,019 | 0,020 | 0,000 | 0,002 | 0,000 |

Примечание. МАГ ранжированы по ИИ для российской популяции. Жирным выделены специфичные для гемопоэтической ткани МАГ. МАГ – минорный антиген гистосовместимости; RUS – российская популяция; EUR, AMR, EAS, AFR и SAS – европейская, смешанная американская, восточноазиатская, африканская и южноазиатская, соответственно, суперпопуляции из проекта «1000 геномов» (<http://www.internationalgenome.org>).

Note. MiHA are sorted according immunogenic index for Russian population. MiHA specific for hematopoietic tissue are in bold. MiHA – minor histocompatibility antigen; RUS, Russian population; EUR, AMR, EAS, AFR and SAS, European, Ad Mixed American, East Asian, African and South Asian super population respectively, according to 1000 Genomes Project (<http://www.internationalgenome.org>).

ных, а популяции были сгруппированы согласно списку пяти суперпопуляций этой базы данных. Два человека были исключены, так как имели редкие третьи аллели нсОНП. Анализ частоты делеции гена UGT2B17 по данным проекта «1000 геномов» был проведен ранее [30], полученные в этой работе частоты делеции гена *UGT2B17* использовались нами для дальнейшего анализа. Первые две главные компоненты метода главных компонент, примененного к частотам аллелей МАГ, использовались для отображения популя-

ционных различий. Сравнение частот аллелей МАГ для российской популяции и европейской суперпопуляции осуществлялось с помощью точного теста Фишера.

Расчет вероятности иммуногенного несоответствия в паре донор – реципиент для полученных частот аллелей проводился методом Монте-Карло с помощью написанной для этих целей программы, используя по 100 тысяч симуляций родственных и неродственных алло-ТГСК. Для сравнения количества иммуногенных

**ТАБЛИЦА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕВАЛИРУЮЩИХ ДЛЯ КРОВЕТВОРНОЙ ТКАНИ МАГ НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ ПРОЕКТА «БЕЛКОВЫЙ АТЛАС ЧЕЛОВЕКА» (<https://www.proteinatlas.org/>)**

TABLE 4. DETERMINATION OF HEMATOPOIETIC TISSUE SPECIFIC MiHA USING HUMAN PROTEIN ATLAS PROJECT DATA (<https://www.proteinatlas.org/>)

| МАГ<br>MiHA  | Представленность<br>Expression      | Ткань с макс. ПНМ<br>Tissue with max. TPM | Кр. ткань / РТПХ-ткань<br>Blood-TPM / GvHD-TPM |
|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|
| HA-1/A2      | Тканеспецифичная<br>Tissue enhanced | Легкие<br>Lungs                           | 3,31                                           |
| LB-NDC80-1   | Смешанная<br>Mixed                  | Прямая кишка<br>Colon                     | 1,80                                           |
| HA-2         | Тканеспецифичная<br>Tissue enhanced | Легкие<br>Lungs                           | 1,34                                           |
| LB-CCL4-1T   | Тканеспецифичная<br>Tissue enhanced | Желчный пузырь<br>Gallbladder             | 1,17                                           |
| LB-NCAPD3-1Q | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Эндокринная система<br>Endocrine tissues  | 1,00                                           |
| LB-ADIR-1F   | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Эндокринная система<br>Endocrine tissues  | 0,70                                           |
| C19ORF48     | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Эндокринная система<br>Endocrine tissues  | 0,67                                           |
| HA-8         | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Пищевод<br>Esophagus                      | 0,51                                           |
| TRIM22       | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Легкие<br>Lungs                           | 0,50                                           |
| UTA2-1       | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Желчный пузырь<br>Gallbladder             | 0,48                                           |
| LB-SSR1-1    | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Эндокринная система<br>Endocrine tissues  | 0,46                                           |
| LB-WNK1-1I   | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Пищевод<br>Esophagus                      | 0,43                                           |
| LB-HIVEP1-1S | Смешанная<br>Mixed                  | Эндокринная система<br>Endocrine tissues  | 0,42                                           |
| WDR27-1L     | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Эндокринная система<br>Endocrine tissues  | 0,39                                           |
| LB-NISCH-1   | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Кожа<br>Skin                              | 0,26                                           |
| LB-PRCP-1D   | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Почки<br>Kidneys                          | 0,18                                           |
| LB-CLYBL-1   | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Почки<br>Kidneys                          | 0,05                                           |
| HER-2/NEU    | Повсеместно<br>Ubiquitous           | Эндокринная система<br>Endocrine tissues  | 0,01                                           |
| UGT2B17/A2   | Тканеспецифичная<br>Tissue enhanced | Тонкий кишечник<br>Small intestine        | 0,00                                           |
| T4A1         | Тканеспецифичная<br>Tissue enhanced | НД<br>NA                                  | НД<br>NA                                       |

**Примечание.** Доля белков, кодирующих МАГ, в кроветворной системе сравнивалась с представленностью этих белков в тканях, где может развиваться РТПХ. Представленность – приводится оценка распределения белков, кодирующих МАГ по тканям по данным проекта «Белковый атлас человека». Ткань с макс. ПНМ – не кроветворная ткань, с наибольшей экспрессией белка, кодирующего МАГ, в которой может развиваться РТПХ, ПНМ – нормированное на миллион прочтений количество прочтений целевого транскрипта в ходе РНК-секвенирования. Кр. ткань / РТПХ-ткань – отношение ПНМ белка, кодирующего МАГ в кроветворной ткани к ткани с максимальным ПНМ, где может развиваться РТПХ; значения больше единицы скорее будут приводить к РТПХ.

Note. Fraction of the protein, containing MiHA, in hematopoietic system was compared with the protein abundance in GvHD tissues. MiHA – minor histocompatibility antigen. Expression, MiHA proteins tissue distribution, according to Human Protein Atlas Project. Tissue with max. TPM, non-hematopoietic tissue with maximum MiHA protein expression, where GvHD can take place. TPM, transcripts per million, is the number of the target RNA reads normalized for million reads during RNAseq. Blood-TPM / GvHD-TPM, ratio of TPM for MiHA protein in the haematogenic tissue to the tissue with maximum TPM for the MiHA protein; if value is more than one – GvL reaction is more plausible in case of MiHA mismatch.

несоответствий в реальных парах доноров и реципиентов использовались критерий Фишера и t-критерий Стьюдента.

Расчет индекса иммуногенности осуществляли с использованием частот иммуногенных аллелей, кодирующих МАГ (табл. 1), согласно формулам, подробно разобранным в [7]. Для доминантных МАГ использовалась формула 2, для кодоминантных — 3.

$$ИИ_{дом} = A^2 \times (1 - A^2), \quad (2)$$

где  $A$  — частота доминантного, кодирующего МАГ аллеля.

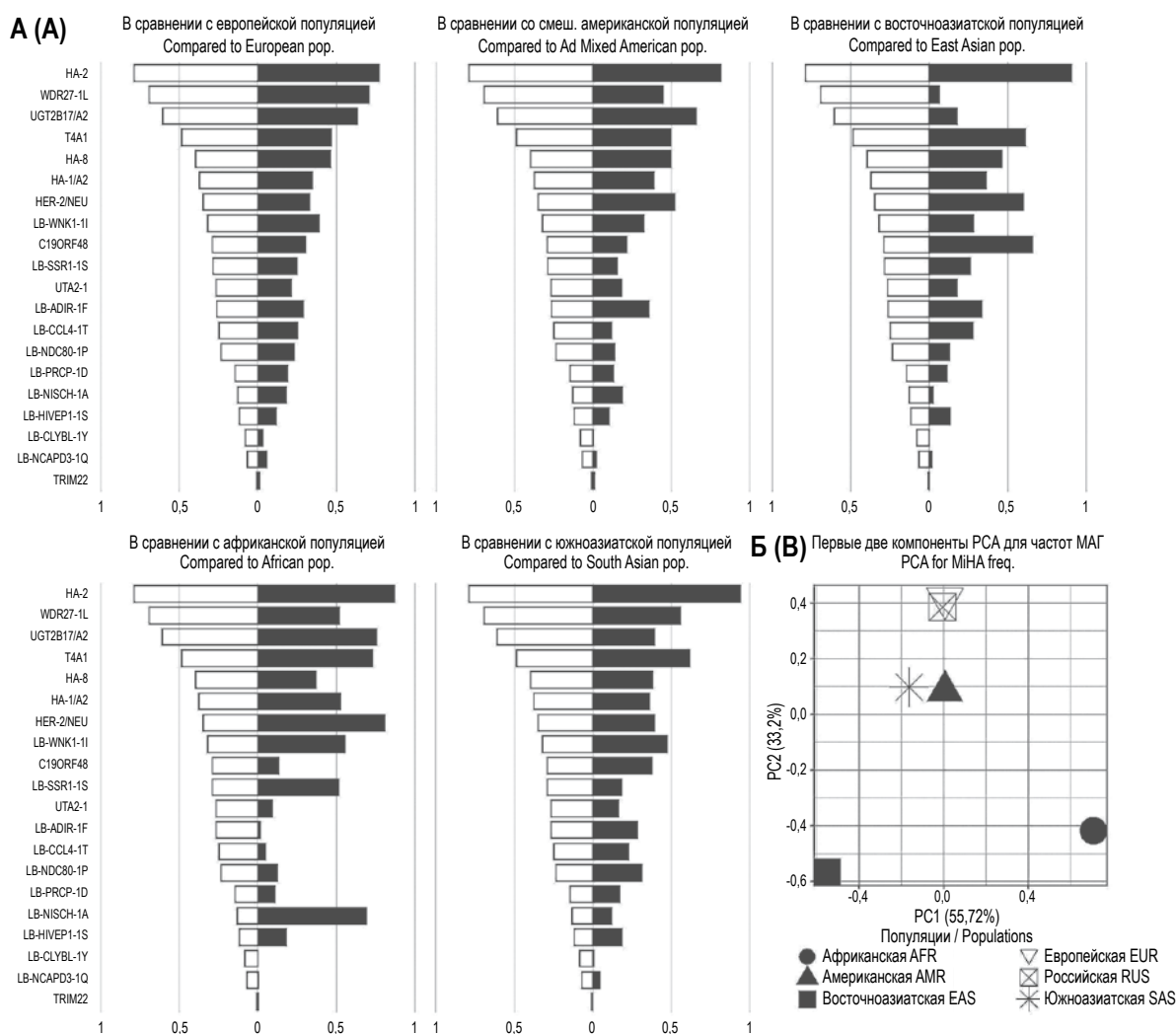
$$ИИ_{код} = A^2 \times (1 - A^2) + B^2 \times (1 - B^2), \quad (3)$$

где  $A$  и  $B$  — частоты двух аллелей, кодирующих кодоминантные МАГ.

Расчет ИИ для родственных пар осуществлялся по формуле 4.

$$ИИ_{род} = A \times (1 - A)^2 \times (4 - A) / 4, \quad (4)$$

где  $A$  — частота доминантного, кодирующего МАГ аллеля.



**Рисунок 1. Частоты иммуногенных аллелей МАГ российской популяции наиболее близки к частотам для европейской популяции**

**Примечание.** А. Частоты иммуногенных аллелей МАГ в российской популяции и соответствующие частоты суперпопуляций проекта «1000 геномов» (<http://www.internationalgenome.org>), для кодоминантных МАГ указана только частота одного из двух аллелей. Слева (белые столбцы) – частоты по данным «НМИЦ гематологии», справа (черные столбцы) – частоты для соответствующей суперпопуляции из «1000 геномов». Б. Сопоставление описанных частот методом главных компонент (PCA), проецирующим все частоты для каждой популяции на одну плоскость.

Figure 1. MiHA immune allele frequencies for the Russian population are most similar to the European population

Note. A. MiHA immune allele frequencies in the Russian population in comparison with 1000 Genomes project frequencies for five super populations (<http://www.internationalgenome.org>), only one allele frequency shown for codominant MiHA. White bars – the NRCH data, black bars – 1000 Genomes data. B. Principal component analysis for MiHA frequencies.



Для родственных пар для кодоминантных МАГ ИИ считался по аналогии с ИИ для неродственных пар — ИИ рассчитывался по формуле 4 для обоих аллелей МАГ и суммировался.

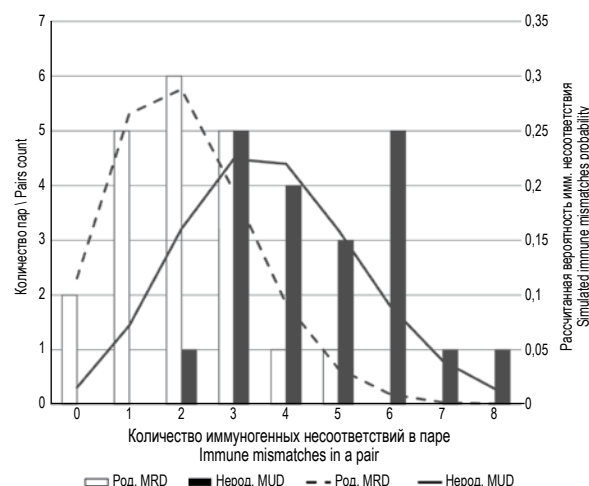
Для предсказания РТПХ и РТПО после ТГСК, вызванных несоответствиями по МАГ, использовались данные базы «Белковый атлас человека» (<https://www.proteinatlas.org/>). Представленность МАГ для кроветворной ткани определялась как отношение ПНМ (прочтений целевого транскрипта, нормированного на миллион прочтений) в костном мозге для белков, кодирующих МАГ, к наибольшему значению ПНМ для тканей, где может развиваться РТПХ (легкие, прямая кишка, желчный пузырь, эндокринная система, пищевод, кожа, почки, тонкий кишечник). Данный расчет не проводился для МАГ T4A1 ввиду неполноты данных РНК-секвенирования (табл. 4).

## Результаты

Всего было генотипировано 790 образцов (608 потенциальных доноров регистра, 90 доноров СКК и 92 пациента до алло-ТГСК). Аллели HLA при этом не учитывались. После предварительной фильтрации данных были получены генотипы 20 полиморфизмов, кодирующих МАГ, представленные в контексте HLA A\*02:01 (табл. 1), для 444 человек. Распределение частот генотипов нсОНП, кодирующих МАГ, соответствовало закону Харди–Вайнберга. Для делеции гена UGT2B17 и нсОНП rs187416296, кодирующего МАГ TRIM22, данная проверка не осуществлялась ввиду технических ограничений.

Полученные частоты аллелей МАГ были сопоставлены с частотами для пяти суперпопуляций из проекта «1000 геномов» (рис. 1А). Как и ожидалось, российская популяция наиболее схожа с европейской суперпопуляцией (рис. 1Б). Мы отдельно сравнили частоты аллелей МАГ для российской и европейской популяций, как наиболее близких. Статистически достоверные различия в частотах между российской популяцией и европейской суперпопуляцией наблюдались только для нсОНП, кодирующих МАГ UTA2-1, LB-CLYBL-1Y, LB-PRCP-1D, LB-WNK1-1I, HA-8, LB-NISCH-1A. При этом в абсолютных значениях различие частоты аллелей для этих двух популяций не превышало 7% (МАГ LB-WNK1-1I) (табл. 2).

На основе данных о частотах аллелей для каждого МАГ был рассчитан индекс иммуногенности (ИИ) — вероятность того, что в паре донор — реципиент из одной популяции у реципиента есть хотя бы один иммуногенный аллель, а донор гомозигота по неиммуногенному аллелю. Вви-



**Рисунок 2. Распределение вероятности числа иммуногенных несоответствий МАГ для родственных и неродственных пар**

**Примечание.** Количество иммуногенных несоответствий для родственных и неродственных пар в российской популяции было рассчитано в результате компьютерной симуляции (ломаные линии) и определено в 40 HLA-совместимых парах донор — реципиент: 20 родственных и 20 неродственных пар (столбики).

Figure 2. Immune MiHA mismatch probability distribution for related and unrelated donor-recipient pairs

Note. Simulated immune mismatches frequencies for related (dashed line) and unrelated pairs (solid line) for the Russian population and observed immune mismatch count for 40 HLA-matched donor-recipient pairs: 20 related (white bars) and 20 unrelated (black bars).

ду генетической схожести для родственных пар донор — реципиент вероятность иммуногенного несоответствия ниже, поэтому ИИ для родственных пар рассчитывался по другой формуле [21]. На основе ИИ для неродственных пар мы составили список самых иммуногенных МАГ для российской популяции и сравнили этот показатель с ИИ для суперпопуляций проекта «1000 геномов» (табл. 3). Наиболее иммуногенным для российской и европейской популяций является МАГ LB-SSR1-1S. Несоответствие по этому МАГ, приводящее к развитию аллореактивного иммунного ответа, может возникнуть более чем в 33% неродственных алло-ТГСК. Эту информацию мы совместили с данными по экспрессии МАГ для того, чтобы разделить МАГ, способные приводить только к РТПЛ или РТПЛ и РТПХ (табл. 4). Наиболее перспективным для терапии является МАГ HA-1, его уровень экспрессии в гемопоэтической ткани более чем в три раза превосходит уровень экспрессии в любой из тканей, поражаемых РТПХ, при этом иммуногенные несоответствия по HA-1 возникают в 24% случаев. Также потенциальными мишенями являются LB-NDC80-1P/A, LB-CCL4-1T, чья экспрессия в кроветворной ткани повышена, а индекс имму-

ногенности составляет 30 и 25% соответственно. Необходимо отметить, что аллели LB-NDC80-1A и LB-NDC80-1P — кодоминантные — оба аллеля приводят к презентации пептидов, отличающихся на одну аминокислоту. Было показано, что такого различия достаточно для МАГ-специфичного Т-клеточного ответа [4]. Таким образом, для кодоминантных МАГ иммуногенными могут быть как тот, так и другой аллели, *in vivo* иммуногенность альтернативного аллеля для LB-NDC80-1P не была экспериментально подтверждена [33].

Для того чтобы рассчитать распределение количества несоответствий донора и реципиента алло-ТГСК для всех 20 МАГ, мы провели компьютерную симуляцию, взяв за основу ИИ для исследуемых МАГ. Поскольку родственные пары имеют меньший ИИ, симуляция для сиблингов проводилась отдельно. Было показано, что при алло-ТГСК от неродственного донора в 72,7% случаев ожидается 3 и более несоответствия по МАГ, в то время как для родственных доноров эта цифра составила 30,5% (рис. 2).

Помимо этого, были генотипированы 40 HLA-совместимых пар доноров и реципиентов, прошедших трансплантацию в «НМИЦ гематологии» и определено количество иммуногенных несоответствий в каждой паре. Изучено 20 родственных и 20 неродственных пар донор — реципиент. Как и ожидалось по данным симуляции, реципиенты, получившие СКК от родственного HLA-совместимого донора, имели достоверно меньше иммуногенных несоответствий, чем реципиенты, которым был подобран неродственный HLA-совместимый донор СКК: в среднем 2,05 и 4,65 различий соответственно ( $p = 1,54 \times 10^{-6}$ ) (рис. 2).

## Обсуждение

Иммуногенное несовпадение по МАГ, способное привести к развитию аллореактивного иммунного ответа после алло-ТГСК, определяется конкретным сочетанием генотипов донора и реципиента. Информация о частоте встречаемости в исследуемой популяции полиморфизмов, кодирующих МАГ, позволяет предсказывать вероятность возникновения иммуногенного несоответствия. Ранее проводился анализ частот аллелей МАГ для населения Тайваня [18] и Туниса [27], при этом в обеих работах анализировались только 2 МАГ: HA-1 и HA-2.

Предварительно нами было проведено сравнение различных методов генотипирования полиморфизмов, кодирующих МАГ [1], что привело к разработке нового подхода, до этого

не используемого для генотипирования МАГ — мультиплексной ПЦР в реальном времени с аллель-специфичными праймерами [28]. Используя этот высокопроизводительный метод, мы определили частоты полиморфизмов, кодирующих 20 МАГ, рестрицированных по аллелю HLA-A\*02:01 (табл. 1) в российской популяции.

Существуют исследования, в которых проводился анализ частот МАГ, основанный на данных проекта «1000 геномов» [23]. В данной работе мы использовали наиболее свежие данные этого проекта с увеличенным по сравнению с опубликованным ранее исследованием количеством генотипированных образцов (2502 против 1092), что позволило уточнить частоты для различных суперпопуляций. Сравнение определенных нами частот для 20 полиморфизмов с частотами в различных суперпопуляциях проекта «1000 геномов» показало, что по полиморфизмам, кодирующим МАГ, российская популяция наиболее близка к европейской. Однако при этом для некоторых исследованных полиморфизмов частоты существенно отличались (рис. 1, табл. 2). Это согласуется с опубликованными ранее данными, что частоты генетических полиморфизмов, кодирующих МАГ, варьируют для разных этносов [23], что делает необходимым оценку частоты МАГ для конкретных популяций.

Известно, что число несовпадений по МАГ может определять вероятность развития РТПЛ и РТПХ [9, 15, 28]. Кроме того, показано, что количество несоответствий по нсОМП, кодирующим МАГ, соотносится с общим количеством нсОМП несоответствий для пары донор — реципиент [21]. В нашей работе мы предсказали вероятность иммуногенных несоответствий для каждого МАГ с помощью компьютерной симуляции. Наиболее иммуногенными для российской популяции являются МАГ LB-SSR1-1S и C19ORF48, приводящие к РТПХ, а также LB-NDC80-1, приводящий к РТПЛ. Также нами были генотипированы пары донор — реципиент, проходившие ТГСК. Количество иммуногенных несоответствий хорошо предсказывается методом компьютерной симуляции.

Учитывать несоответствия по МАГ при подборе донора на сегодняшний день неосуществимо ввиду ограниченного размера донорских регистров, однако информация об иммуногенных несоответствиях по МАГ в паре донор — реципиент может быть учтена при выборе иммуносупрессивной терапии и для направленной клеточной терапии [10, 14, 34, 35].

Часть МАГ экспрессируется только в гемопоэтической ткани, в этом случае иммунный ответ, направленный против них, будет вызывать РТПЛ и потенциально снижать риск развития рецидива [25]. Учитывая данные по экспрессии генов, кодирующих МАГ в различных тканях (табл. 4), мы предсказали наиболее релевантные МАГ для направленной клеточной иммунотерапии рецидивов лейкозов после алло-ТГСК — это LB-NDC80-1P, LB-NDC80-1A, LB-CCL4-1T и HA-1 (табл. 3, 4).

Полученные нами данные по частотам 20 представляемых в контексте HLA-A\*02:01 МАГ для российской популяции позволят предсказывать ожидаемые осложнения после HLA-совместимой алло-ТГСК как для доноров из российских регистров костного мозга, так и для доноров из европейских регистров. Кроме того, эти данные могут быть использованы для определения мишеней для иммунотерапии.

## Список литературы / References

1. Вдовин А.С., Постовская А.М., Быкова Н.А., Романюк Д.С., Алиева А.Х., Ефимова П.Р., Шитиков С.А., Джулакян У.Л., Ефимов Г.А. Сравнительный анализ методов генотипирования минорных антигенов гистосовместимости // Онкогематология, 2016. Т. 11, № 2. С. 40-50. [Vdovin A.S., Postovskaya A.M., Bykova N.A., Romaniuk D.S., Alieva A.K., Efimova P.R., Shitikov S.A., Julakyan U.L., Efimov G.A. Comparative analysis of minor histocompatibility antigens genotyping methods. *Onkogematologiya = Oncohematology*, 2016, Vol. 11, no. 2, pp. 40-50. (In Russ.)]
2. Armistead P.M., Liang S., Li H., Lu S., Bergen C.A., Alatrash G., John L., Hunsucker S.A., Sarantopoulos S., Falkenburg J., Molldrem J.J. Common minor histocompatibility antigen discovery based upon patient clinical outcomes and genomic data. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, no. 8, e23217. doi: 10.1371/journal.pone.0023217
3. Bergen C., Rutten C.E., Meijden E.D., Luxemburg-Heijs S., Lurvink E., Houwing-Duistermaat J.J., Kester M., Mulder A., Willemze R., Falkenburg J.H., et al. High-throughput characterization of 10 new minor histocompatibility antigens by whole genome association scanning. *Cancer Research*, 2010, Vol. 70, pp. 9073-9083.
4. Bijen H.M., Hassan C., Kester M.G.D., Janssen G.M.C., Hombrink P., Ru A.H., Drijfhout J.W., Meiring H.D., de Jong A.P., Falkenburg J.H.F., Jimenez C.R., Heemskerk M.H.M., van Veelen P.A. Specific T cell responses against minor histocompatibility antigens cannot generally be explained by absence of their allelic counterparts on the cell surface. *Proteomics*, 2018, Vol. 18, no. 12, e1700250. doi: 10.1002/pmic.201700250.
5. Bleakley M., Riddell S.R. Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia. *Immunol. Cell Biol.*, 2011, Vol. 89, no. 3, pp. 396-407.
6. Brickner A.G., Warren E.H., Caldwell J.A., Akatsuka Y., Golovina T.N., Zarling A.L., Shabanowitz J., Eisenlohr L.C., Hunt D.F., Engelhard V.H., Riddell S.R. The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results from differential antigen processing. *J. Exp. Med.*, 2001, Vol. 193, no. 2, pp. 195-206.
7. Bykova N.A., Malko D.B., Efimov G.A. *In silico* analysis of the minor histocompatibility antigen landscape based on the 1000 Genomes Project. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, e1819. doi: 10.3389/fimmu.2018.01819.
8. den Haan J. The minor histocompatibility antigen HA-1: A diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science*, 1998, Vol. 279, pp. 1054-1057.
9. Dzierzak-Mietla M., Markiewicz M., Siekiera U., Mizia S., Koclega A., Zielinska P., Sobczyk-Kruszelnicka M., Kyrzacz-Krzemien S. Occurrence and impact of minor histocompatibility antigens' disparities on outcomes of hematopoietic stem cell transplantation from HLA-matched sibling donors. *Bone Marrow Res.*, 2012, Vol. 2012, e257086. doi: 10.1155/2012/257086.
10. Franssen L.E., Roeven M.W.H., Hobo W., Doorn R., Oostvogels R., Falkenburg J.H.F., van de Donk N.W., Kester M.G.D., Fredrix H., Westinga K., Slaper-Cortenbach I., Spierings E., Kersten M.J., Dolstra H., Mutis T., Schaap N., Lokhorst H.M. A phase I/II minor histocompatibility antigen-loaded dendritic cell vaccination trial to safely improve the efficacy of donor lymphocyte infusions in myeloma. *Bone Marrow Transplant.*, 2017, Vol. 52, no. 10, pp. 1378-1383.
11. Goulmy E. Minor histocompatibility antigens: from transplantation problems to therapy of cancer. *Hum. Immunol.*, 2006, Vol. 67, pp. 433-438.
12. Granados D.P., Rodenbrock A., Laverdure J.P., Côté C., Caron-Lizotte O., Carli C., Pearson H., Janelle V., Durette C., Bonnel E., Roy D.C., Delisle J.S., Lemieux S., Thibault P., Perreault C. Proteogenomic-based discovery of minor histocompatibility antigens with suitable features for immunotherapy of hematologic cancers. *Leukemia*, 2016, Vol. 30, no. 6, pp. 1344-1354.
13. Haan D.J., Sherman N.E., Blokland E., Huczko E., Koning F., Drijfhout J., Skipper J., Shabanowitz J., Hunt D.F., Engelhard V.H. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science*, 1995, Vol. 268, no. 5216, pp. 1476-1480.

14. Hambach L., Vermeij M., Buser A., Aghai Z., van der Kwast T., Goulmy E. Targeting a single mismatched minor histocompatibility antigen with tumor-restricted expression eradicates human solid tumors. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 5, pp. 1844-1852.
15. Hobo W., Broen K., van der Velden W.J., Greupink-Draaisma A., Adisty N., Wouters Y., Kester M., Fredrix H., Jansen J.H., van der Reijden B., Falkenburg J.H., de Witte T., Preijers F., Schattenberg T., Feuth T., Blijlevens N.M., Schaap N., Dolstra H. Association of disparities in known minor histocompatibility antigens with relapse-free survival and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2013, Vol. 19, no. 2, pp. 274-282.
16. Hombrink P., Hassan C., Kester M., Jahn L., Pont M.J., de Ru A.H., van Bergen C., Griffioen M., Falkenburg J.H., van Veelen P.A., Heemskerk M.H. Identification of biological relevant minor histocompatibility antigens within the B-lymphocyte-derived HLA-ligandome using a reverse immunology approach. *Clin. Cancer Res.*, 2015, Vol. 21, no. 9, pp. 2177-2186.
17. Hombrink P., Hassan C., Kester M.G., de Ru A.H., van Bergen C.A., Nijveen H., Drijfhout J.W., Falkenburg J., Heemskerk M.H., van Veelen P.A. Discovery of T cell epitopes implementing HLA-peptidomics into a reverse immunology approach. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 8, pp. 3869-3877.
18. Lio H-Y., Tang J-L., Wu J., Wu S-J., Lin C-Y., Yang Y-C. Minor histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 polymorphisms in Taiwan: frequency and application in hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2010, Vol. 48, no. 9, pp. 1287-1293.
19. Malarkannan S., Regunathan J., Timler A.M. Minor histocompatibility antigens: Molecular targets for immunomodulation in tissue transplantation and tumor therapy. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, 2005, Vol. 5, pp. 95-109.
20. Marijt W.A., Heemskerk M.H., Kloosterboer F.M., Goulmy E., Kester M.G., van der Hoorn M.A., van Luxemburg-Heys S.A., Hoogeboom M., Mutis T., Drijfhout J.W., van Rood J.J., Willemze R., Falkenburg J.H. Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, Vol. 100, no. 5, pp. 2742-2747.
21. Martin P.J., Levine D.M., Storer B.E., Warren E.H., Zheng X., Nelson S.C., Smith A.G., Mortensen B.K., Hansen J.A. Genome-wide minor histocompatibility matching as related to the risk of graft-versus-host disease. *Blood*, 2017, Vol. 129, no. 6, pp. 791-798.
22. Murata M., Warren E.H., Riddell S.R. A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 197, no. 10, pp. 1279-1289.
23. Oostvogels R., Lokhorst H.M., Minnema M.C., van Elk M., van den Oudenalder K., Spierings E., Mutis T., Spaapen R.M. Identification of minor histocompatibility antigens based on the 1000 Genomes Project. *Haematologica*, 2014, Vol. 99, no. 12, e109801. doi: 10.3324/haematol.2014.109801.
24. Oostvogels R., Minnema M.C., van Elk M., Spaapen R.M., te Raa G.D., Giovannone B., Buijs A., van Baarle D., Kater A., Griffioen M., Spierings E., Lokhorst H.M., Mutis T. Towards effective and safe immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation: identification of hematopoietic-specific minor histocompatibility antigen UTA2-1. *Leukemia*, 2013, Vol. 27, no. 3, pp. 642-649.
25. Pierce R.A., Field E.D., Mutis T., Golovina T.N., von Kap-Herr C., Wilke M., Pool J., Shabanowitz J., Pettenati M.J., Eisenlohr L.C., Hunt D.F., Goulmy E., Engelhard V.H. The HA-2 minor histocompatibility antigen is derived from a diallelic gene encoding a novel human class I myosin protein. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 6, pp. 3223-3230.
26. Romaniuk D.S., Postovskaya A.M., Khmelevskaya A.A., Malko D.B., Efimov G.A. Rapid multiplex genotyping of 20 HLA-A\*02:01 restricted minor histocompatibility antigens. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1226. doi: 10.3389/fimmu.2019.01226.
27. Sellami M.H., Ben Ahmed B.A., Kaabi H., Jridi A., Dridi A., Hmida S. HA-1 and HA-2 minor histocompatibility antigens in Tunisians. *Tissue Antigens*, 2010, Vol. 75, no. 6, pp. 720-723.
28. Spellman S., Warden M.B., Haagenson M., Pietz B.C., Goulmy E., Warren E.H., Wang T., Ellis T.M. Effects of mismatching for minor histocompatibility antigens on clinical outcomes in HLA-matched, unrelated hematopoietic stem cell transplants. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2009, Vol. 15, no. 7, pp. 856-863.
29. Spierings E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future. *Tissue Antigens*, 2014, Vol. 84, no. 4, pp. 374-360.
30. Sudmant P.H., Rausch T., Gardner E.J., Handsaker R.E., Abyzov A., Huddleston J., Zhang Y., Ye K., Jun G., Fritz M.H., Konkel M.K., Malhotra A., Stütz A.M., Shi X., Casale F.P., Chen J., Hormozdiari F., Dayama G., Chen K., Malig M., Chaisson M.J.P., Walter K., Meiers S., Kashin S., Garrison E., Auton A., Lam H.Y.K., Mu X.J., Alkan C., Antaki D., Bae T., Cerveira E., Chines P., Chong Z., Clarke L., Dal E., Ding L., Emery S., Fan X., Gujral M., Kahveci F., Kidd J.M., Kong Y., Lameijer E.W., McCarthy S., Flicek P., Gibbs R.A., Marth G., Mason C.E., Menelaou A., Muzny D.M., Nelson B.J., Noor A., Parrish N.F., Pendleton M., Quitadamo A., Raeder B., Schadt E.E., Romanovitch M., Schlattl A., Sebra R., Shabalin A.A., Untergasser A., Walker J.A., Wang M., Yu F., Zhang C., Zhang J., Zheng-Bradley X., Zhou W., Zichner T., Sebat J., Batzer M.A., McCarroll S.A., 1000 Genomes Project Consortium, Mills R.E., Gerstein M.B., Bashir A., Stegle O., Devine S.E., Lee C., Eichler E.E., Korbel J.O. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature*, 2015, Vol. 526, no. 7571, pp. 75-81.

31. Tykodi S.S., Fujii N., Vigneron N., Lu S.M., Mito J.K., Miranda M.X., Chou J., Voong L.N., Thompson J.A., Sandmaier B.M., Cresswell P., van den Eynde B., Riddell S.R., Warren E.H. C19orf48 encodes a minor histocompatibility antigen recognized by CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells from renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.*, 2008, Vol. 14, no. 16, pp. 5260-5269.
32. van Bergen C.A., Kester M.G., Jedema I., Heemskerk M.H., van Luxemburg-Heijs S.A., Kloosterboer F.M., Marijt E.W., de Ru A.H., Schaafsma M.R., Willemze R., van Veelen P.A., Falkenburg J.H. Multiple myeloma-reactive T cells recognize an activation-induced minor histocompatibility antigen encoded by the ATP-dependent interferon-responsive (ADIR) gene. *Blood*, 2007, Vol. 109, no. 9, pp. 4089-4096.
33. van Bergen C.A., van Luxemburg-Heijs S.A., de Wreede L.C., Eefting M., von dem Borne P.A., van Balen P., Heemskerk M.H., Mulder A., Claas F.H., Navarrete M.A., Honders W.M., Rutten C.E., Veelken H., Jedema I., Halkes C.J., Griffioen M., Falkenburg J.H. Selective graft-versus-leukemia depends on magnitude and diversity of the alloreactive T cell response. *J. Clin. Invest.*, 2017, Vol. 127, no. 2, pp. 517-529.
34. van Loenen M.M., de Boer R., Hagedoorn R.S., van Egmond E.H., Falkenburg J.H., Heemskerk M.H. Optimization of the HA-1-specific T-cell receptor for gene therapy of hematologic malignancies. *Haematologica*, 2011, Vol. 96, no. 3, pp. 477-481.
35. Warren E.H., Fujii N., Akatsuka Y., Chaney C.N., Mito J.K., Loeb K.R., Gooley T.A., Brown M.L., Koo K.K., Rosinski K.V., Ogawa S., Matsubara A., Appelbaum F.R., Riddell S.R. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 9, pp. 3869-3878.
36. Wenandy L., Kollgaard T., Letsch A., Andersen R.S., Stather D., Seremet T., Svane I.M., Vindeløv L., Andersen M.H., Thor Straten P. The 1170 A-P single-nucleotide polymorphism (SNP) in the Her-2/neu protein (HER2) as a minor histocompatibility antigen (mHag). *Leukemia*, 2009, Vol. 23, no. 10, e2009112. doi: 10.1038/leu.2009.112.
37. Wölfel C., Lennerz V., Lindemann E., Hess G., Derigs H.G., Huber C., Herr W., Wölfel T. Dissection and molecular analysis of alloreactive CD8<sup>+</sup> T cell responses in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2008, Vol. 57, no. 6, pp. 849-857.

---

**Авторы:**

**Романиук Д.С.** — магистр биологии, научный сотрудник лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Хмелевская А.А.** — бакалавр биологии, стажер-исследователь лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Постовская А.М.** — магистр биологии, стажер лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Малько Д.Б.** — к.техн.н., научный сотрудник лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

---

**Authors:**

**Romaniuk D.S.**, MSc (Biology), Research Associate, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

**Khmelevskaya A.A.**, BSc (Biology), Research Intern, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

**Postovskaya A.M.**, MSc (Biology), Research Intern, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

**Malko D.B.**, PhD (Technics), Research Associate, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

**Кузьмина Е.П.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Хамаганова Е.Г.** — д.б.н., заведующий лабораторией тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Ефимов Г.А.** — к.б.н., заведующий лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Kuzminova E.P.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Tissue Typing, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

**Khamaganova E.G.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Tissue Typing, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

**Efimov G.A.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 15.12.2018  
Отправлена на доработку 26.12.2018  
Принята к печати 26.01.2019

---

Received 15.12.2018  
Revision received 26.12.2018  
Accepted 26.01.2019

## ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Лыков А.П.<sup>1,2</sup>, Суровцева М.А.<sup>1,2</sup>, Повещенко О.В.<sup>1,2</sup>,  
Бондаренко Н.А.<sup>1,2</sup>, Ким И.И.<sup>1,2</sup>, Чернявский А.М.<sup>2</sup>, Фомичев А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Эритропоэтин используется в основном для стимуляции эритропоэза. В последнее время показаны его цитопротекторные эффекты на другие клетки организма человека и животных, в частности антиапоптотическое действие. Свое влияние на клетки эритропоэтин опосредует через взаимодействие с рецептором к эритропоэтину в комплексе с образованием гетеродимерной связи с  $\beta$ -общей цепью (CD131). В представленной работе проведено исследование изменения экспрессии рецептора к эритропоэтину, CD131 и спектра продукции биологически активных молекул костномозговыми мононуклеарами (КМ-МНК) больных ишемической болезнью сердца. Методом проточной цитофлуориметрии показано, что кратковременная инкубация КМ-МНК с эритропоэтином способствует увеличению экспрессии рецептора к эритропоэтину на гемопоэтических стволовых клетках и имеет тенденцию к уменьшению количества эндотелиальных прогениторных клеток, несущих рецептор к эритропоэтину. Методом твердофазного иммуноферментного анализа в кондиционных средах от КМ-МНК выявлено, что длительное (72 часа) воздействие эритропоэтина на КМ-МНК способствует увеличению уровней продукции IL-1 $\beta$ , PDGF-AB и EPO по сравнению с базальным уровнем продукции ( $p < 0,05$ ), а кратковременная инкубация КМ-МНК с эритропоэтином (60 минут) способствовала значимому повышению уровней продукции IL-1 $\beta$ , PDGF-AB и CXCL-12/SDF-1 $\alpha$ , а также значимому снижению уровней продукции IL-10 по сравнению с базальным уровнем продукции ( $p < 0,05$ ).

**Ключевые слова:** костномозговые стволовые клетки, эритропоэтин, цитокины, ишемическая болезнь сердца

## EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON CYTOKINE PRODUCTION BY STEM CELLS

Lykov A.P.<sup>a,b</sup>, Surovtseva M.A.<sup>a,b</sup>, Poveshchenko O.V.<sup>a,b</sup>,  
Bondarenko N.A.<sup>a,b</sup>, Kim I.I.<sup>a,b</sup>, Chernyavsky A.M.<sup>b</sup>, Fomichev A.V.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Erythropoietin (EPO) is mainly used to stimulate erythropoiesis. Its cytoprotective effects upon other cells of the human body and animals were recently shown, in particular, anti-apoptotic effect was

### Адрес для переписки:

Лыков Александр Петрович  
Научно-исследовательский институт клинической  
и экспериментальной лимфологии  
630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.  
Тел.: 8 (383) 335-93-32.  
E-mail: aplykov2@mail.ru

### Address for correspondence:

Lykov Alexander P.  
Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology  
630060, Russian Federation, Novosibirsk, Timakova str., 2.  
Phone: 7 (383) 335-93-32.  
E-mail: aplykov2@mail.ru

### Образец цитирования:

А.П. Лыков, М.А. Суровцева, О.В. Повещенко,  
Н.А. Бондаренко, И.И. Ким, А.М. Чернявский,  
А.В. Фомичев «Влияние эритропоэтина на продукцию  
цитокинов стволовыми клетками» // Медицинская  
иммунология, 2019. Т. 21, № 5. С. 861-868.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-861-868

© Лыков А.П. и соавт., 2019

### For citation:

A.P. Lykov, M.A. Surovtseva, O.V. Poveshchenko,  
N.A. Bondarenko, I.I. Kim, A.M. Chernyavsky, A.V. Fomichev  
“Effect of erythropoietin on cytokine production by stem cells”,  
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,  
2019, Vol. 21, no. 5, pp. 861-868.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-861-868

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-861-868

observed. EPO effect upon the cells is mediated by interaction with erythropoietin receptor, with a complex forming a heterodimeric bond with  $\beta$ -common chain (CD131). In the present work, we studied the changes in erythropoietin receptor expression, and production spectrum of biologically active molecules in bone marrow mononuclear cells (BM-MNC) of patients with coronary heart disease. The flow cytometric assays showed that short-term incubation of BM-MNC with erythropoietin caused increased expression of the erythropoietin receptors on hematopoietic stem cells and tended to reduce the number of endothelial progenitor cells carrying the erythropoietin receptors. Solid-phase enzyme immunoassay in conditioned media from BM-MNC revealed that long-term (72 hours) exposure of BM-MNC to erythropoietin promoted increased production of IL-1 $\beta$ , PDGF-AB, and Epo, if compared to the basal production level ( $p < 0.05$ ). Short-term incubation of BM-MNC with erythropoietin (60 minutes) caused a significant increase in the IL-1 $\beta$ , PDGF-AB and CXCL-12/SDF-1 $\alpha$  production levels, as well as significant reduction in the IL-10 production levels compared to the basal levels ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** bone marrow stem cells, erythropoietin, cytokine, ischemic heart disease

## Введение

Альтернативным методом лечения ишемической болезни сердца является клеточная терапия аутологичными костномозговыми стволовыми клетками [13, 15, 16]. Так, интрамиокардиальное введение аутологичных костномозговых мононуклеаров (КМ-МНК) способствует регенерации миокарда и восстановлению сократительной способности желудочков сердца [4, 7, 14, 17]. Однако эффективность клеточной терапии зависит от микроокружения, в которое помещаются клетки. В частности, окислительный стресс значительно снижает жизнеспособность клеток, а одним из веществ, способных влиять на жизнеспособность клеток, является эритропоэтин [9]. Показано, что эритропоэтин проявляет антигипоксическое и антиапоптотическое действие, усиливает неоваскулогенез, мобилизует эндотелиальные прогениторные клетки и усиливает ангиогенез [3, 8]. Влияние эритропоэтина опосредуется его взаимодействием с рецептором для эритропоэтина, сформировавшийся комплекс эритропоэтин/рецептор к эритропоэтину запускает каскад сигнальных путей с вовлечением янус-киназы (JAK-2), сигнального проводника и активатора транскрипции (STAT) и других сигнальных путей, вовлеченных в регуляцию пролиферации, выживаемости и экспрессии генов [11]. В то же время влияние эритропоэтина на костномозговые стволовые клетки исследовано недостаточно.

**Целью настоящего исследования** явилось установление влияния эритропоэтина на уровни продукции цитокинов и экспрессию рецептора к эритропоэтину после инкубации костномозговых мононуклеарных клеток с эритропоэтином *in vitro*.

## Материалы и методы

Исследование проведено у 50 больных ишемической болезнью сердца (43 мужчины и 7 женщин в возрасте 52–74 лет) с функциональным классом

сердечной недостаточности по NYHA II–III класса, давших информированное согласие. Аспират костного мозга забирали из подвздошной кости традиционным способом под местной анестезией. КМ-МНК выделяли из костного мозга на градиенте плотности фиколл/верографин ( $\rho = 1,077$  г/л). На проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD, США) исследовали количество клеток, несущих рецептор к эритропоэтину (EpoR, R&DS, США) и CD131 (BD, США) исходно и после инкубации с эритропоэтином. Экспозицию КМ-МНК с эритропоэтином (Рекормон, Швейцария, 33,4 МЕ/мл) проводили в культуральных флаконах в физиологическом растворе с добавлением 10% аутологичной сыворотки в течение 60 минут при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Далее КМ-МНК трижды отмывали от остатков эритропоэтина и аутологичной сыворотки при 1500 об/мин в течение 5 минут. КМ-МНК, не подвергшиеся и подвергшиеся инкубации с эритропоэтином, инкубировали с моноклональными антителами к рецептору эритропоэтина и к CD131, конъюгированные с фикоэритрином или с аллофикоцианином, в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре, далее клетки отмывали от меток и вносили фиксирующий раствор, определяли количество клеток, несущих данные маркеры на 10 000 клеток, и выражали в %. Для исследования уровней продукции цитокинов клетками, 10<sup>6</sup>/мл КМ-МНК инкубировали в питательной среде ДМЕМ с добавлением 10% фетальной сыворотки плода (FCS, Биолот, Россия), 2мМ L-глутамина (ICN, США), 80 мкг/мл гентамицина (Дальхимфарм, Россия) и эритропоэтина (0 и 33,4 МЕ/мл) в течение 72 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C, далее собирали кондиционную среду, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут, разливали по аликвотам и хранили при -70 °C. Кроме этого, получали кондиционные среды от КМ-МНК, предварительно проинкубированных с эритропоэтином, отмывых от остатков эритропоэтина и помещенных в аналогичную питательную сре-



ду с добавками, но без внесения эритропоэтина и инкубировали в аналогичных условиях 72 часа, далее кондиционную среду собирали, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут, разливали по аликвотам и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . В кондиционных средах исследовали уровни IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB, VEGF, FGF basal, Epo, IGF-1, CXCL-12/SDF-1 $\alpha$ , MMP-9, TIMP-1 методом твердофазного иммуноферментного анализа. Кроме этого, в кондиционных средах оценивали уровни стойких метаболитов NO с использованием реактива Грисса. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 for Windows (Stat Soft, США). Полученные данные проверяли на нормальность распределения согласно W-критерию Шапиро–Уилка, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой, нижним и верхним квартилями — Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ); статистически значимое различие рассчитывали по U-критерию Манна–Уитни и принимали при значении  $p < 0,05$ . Связь между различными признаками определяли с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Спирмена (r).

## Результаты

### Эритропоэтин увеличивает экспрессию рецептора к эритропоэтину на гемопоэтических стволовых клетках

Как видно из таблицы 1, кратковременная инкубация КМ-МНК с эритропоэтином способствует увеличению относительного количества гемопоэтических стволовых клеток (CD34 $^{+}$ /CD45 $^{+}$ ), несущих на своей мембране рецептор к эритропоэтину в сравнении с исходным уровнем ( $p < 0,05$ ). В то же время отмечена тенденция уменьшения относительного количества клеток с фенотипом CD34 $^{+}$ /CD45 $^{-}$ , несущих рецептор к эритропоэтину, а также количества клеток, несущих на своей мембране CD131 и рецептор

к эритропоэтину, по сравнению с исходным количеством таких клеток до инкубации с эритропоэтином, хотя статистически незначимо ( $p > 0,05$ ).

### Эритропоэтин стимулирует продукцию IL-1 $\beta$

Одним из функциональных свойств полноценности клеточного трансплантата, используемого для регенеративной медицины, является уровень секреторной активности клеток, а именно уровень продукции цитокинов, ростовых факторов, металлопротеаз и молекул межклеточного взаимодействия (оксид азота). Нами показано, что КМ-МНК спонтанно продуцируют широкий спектр биологически активных веществ, включая провоспалительные (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6) и противовоспалительные (IL-10) цитокины, факторы роста (PDGF-AB, VEGF, FGF basal, Epo, IGF-1, TGF- $\beta$ 1), металлопротеазы и ингибиторы металлопротеаз (MMP-9, TIMP-1), хемокины (IL-8, CXCL-12/SDF-1 $\alpha$ ) и NO (табл. 2). Необходимо отметить тот факт, что без стимуляции в спектре продукции цитокинов отмечено преобладание фона противовоспалительного цитокина (IL-10), что можно расценивать как сдерживающее влияние на пролиферативный потенциал клеток.

В то же время после длительной инкубации КМ-МНК с эритропоэтином (72 часа) отмечено значимое смещение продукции цитокинов в сторону провоспалительного спектра (IL-1 $\beta$ ,  $p < 0,05$ ) в сравнении с уровнями продукции клетками без стимуляции. Также длительная стимуляция КМ-МНК эритропоэтином увеличивает уровни продукции PDGF-AB и Epo по сравнению с базальным уровнем продукции ( $p < 0,05$ ). В отношении других биоактивных молекул (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta$ 1, VEGF, FGF basal, IGF-1, CXCL-12/SDF-1 $\alpha$ , MMP-9, TIMP-1 и NO), продуцируемых КМ-МНК, длительная инкубация клеток с эритропоэтином не приводила к значимому изменению уровней продукции ( $p > 0,05$ ).

Кратковременная инкубация КМ-МНК с эритропоэтином (60 минут) способствовала значи-

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО КМ-МНК, НЕСУЩИХ EpoR И CD131, ДО И ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ С ЭРИТРОПОЭТИНОМ, Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )

TABLE 1. QUANTITY OF BM-MNC EXPRESSED EpoR AND CD131 BEFORE AND POST-TREATMENT WITH ERYTHROPOIETIN, Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )

| Фенотип КМ-МНК<br>Phenotype of BM-MNC | Исходно<br>Basal | После инкубации<br>с эритропоэтином<br>Post-treatment with erythropoietin |
|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| CD34 $^{+}$ /CD45 $^{+}$ /EpoR $^{+}$ | 0,94 (0,50-6,25) | 4,65 (1,90-15,47)*                                                        |
| CD34 $^{+}$ /CD45 $^{+}$ /EpoR $^{-}$ | 0,64 (0,40-0,94) | 0,5 (0,3-0,6)                                                             |
| CD131 $^{+}$ /EpoR $^{+}$             | 5,1 (4,8-5,4)    | 3,45 (1,1-5,8)                                                            |

Примечание. \* p – статистическая значимость различия с исходным показателем ( $p < 0,05$ ).

Note. \* p, significance of differences with basal parameters ( $p < 0,05$ ).

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ ПРОДУКЦИИ КМ-МНК ЦИТОКИНОВ И NO

TABLE 2. BM-MNC CYTOKINE AND NO PRODUCTION

| Цитокины<br>Cytokines                   | Тип продукции<br>Type of production |                                                                |                                                                                               |
|-----------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                         | Спонтанная<br>Basal                 | Стимулированная<br>эритропоэтином<br>Erythropoietin stimulated | Спонтанная<br>после инкубации<br>с эритропоэтином<br>Basal after erythropoietin-<br>treatment |
| IL-1 $\beta$ (пг/мл)<br>pg/ml           | 10,25 (5,12-20,10)                  | 60,65 (34,25-72,05)*                                           | 37,85 (34,20-56,20)*                                                                          |
| TNF $\alpha$ (пг/мл)<br>pg/ml           | 12,25 (4,97-36,35)                  | 16,94 (7,70-28,00)                                             | 23,0 (10,3-1026,4)                                                                            |
| IL-6 (пг/мл)<br>pg/ml                   | 1615 (1208-1743)                    | 1651,0 (1208,5-1776,0)                                         | 1560 (824-1666)                                                                               |
| IL-8 (пг/мл)<br>pg/ml                   | 1260 (1225-1320)                    | 1270,5 (1164,0-1353,0)                                         | 1268 (1218-1280)                                                                              |
| IL-10 (пг/мл)<br>pg/ml                  | 193 (63-305)                        | 96,0 (26,5-223,4)                                              | 42,8 (13,6-81,0)*                                                                             |
| TGF- $\beta$ 1 (пг/мл)<br>pg/ml         | 3,14 (2,73-5,92)                    | 2,36 (1,52-4,94)                                               | 5,70 (2,04-21,20)                                                                             |
| PDGF-AB (пг/мл)<br>pg/ml                | 97,5 (76,8-123,0)                   | 1310 (1240-1310)*                                              | 1270 (1220-1400)*                                                                             |
| VEGF (пг/мл)<br>pg/ml                   | 128,5 (113,0-275,5)                 | 139,0 (117,5-384,5)                                            | 129 (121-133)                                                                                 |
| FGF basal (пг/мл)<br>pg/ml              | 73 (70-75)                          | 72,5 (70,5-149,0)                                              | 73,5 (72,5-90,0)                                                                              |
| Еро (мМЕ/мл)<br>mIU/ml                  | 446,10 (192,00-755,85)              | 844,8 (841,5-849,1)*                                           | 705,6 (265,6-836,8)**                                                                         |
| IGF-1 (нг/мл)<br>ng/ml                  | 0,18 (0,15-0,21)                    | 0,24 (0,18-0,28)                                               | 0,22 (0,16-0,25)                                                                              |
| CXCL-12/SDF-1 $\alpha$ (пг/мл)<br>pg/ml | 10320 (1000-10320)                  | 10580 (10320-21820)                                            | 10860 (10560-11500)*                                                                          |
| MMP-9 (нг/мл)<br>ng/ml                  | 17 (12-21)                          | 14,5 (12,5-24,5)                                               | 11,5 (11,0-12,0)                                                                              |
| TIMP-1 (нг/мл)<br>ng/ml                 | 43 (36-52)                          | 52,5 (43,0-84,5)                                               | 48,5 (39,0-51,0)                                                                              |
| NO ( $\mu$ М/мл)<br>$\mu$ M/ml          | 1,1 (1,0-1,2)                       | 1,05 (0,95-1,20)                                               | 1,0 (0,5-1,2)                                                                                 |

Примечание. \* p – статистическая значимость различия со спонтанной продукцией (p < 0,05), \*\* p – статистическая значимость различия с продукцией, стимулированной эритропоэтином.

Note. \* p, significance of differences with basal production (p < 0.05), \*\* p, significances with erythropoietin stimulated production (p < 0.05).

мому повышению уровней продукции IL-1 $\beta$ , PDGF-AB и CXCL-12/SDF-1 $\alpha$ , а также значимому снижению уровней продукции IL-10 по сравнению с базальным уровнем продукции данных биологически активных молекул клетками без стимуляции эритропоэтином (p < 0,05). Также не выявлено существенного изменения уровней продукции КМ-МНК (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ 1, VEGF, FGF basal, IGF-1, MMP-9, TIMP-1 и NO) после кратковременной инкубации с эритропоэ-

тином в сравнении с аналогичными параметрами без стимуляции (p > 0,05). Необходимо отметить тот факт, что кратковременная инкубация КМ-МНК с эритропоэтином вела к значимому снижению уровней продукции Еро по сравнению с аналогичным параметром после длительной стимуляции клеток эритропоэтином (p < 0,05).

#### Взаимосвязи клеток с цитокинами

Между исходным количеством клеток с фенотипом CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/ЕроR<sup>+</sup> и уровнями продук-

ции КМ-МНК после кратковременной стимуляции эритропоэтином TNF $\alpha$  и IL-6 выявлены разнонаправленные взаимосвязи ( $r = -0,633611$ ,  $p < 0,05$  и  $r = 0,523682$ ,  $p < 0,05$  соответственно), что может указывать на вклад клеток данного фенотипа в продукцию этих цитокинов. Количество клеток с фенотипом CD34 $^{+}$ /CD45 $^{+}$ /EpoR $^{+}$  после кратковременной инкубации с эритропоэтином находилось в обратной и сильной связи с уровнями продукции TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 и MMP-9 ( $r = -0,733333$ ,  $p < 0,05$ ;  $r = -0,61863$ ,  $p < 0,05$  и  $r = -0,92582$ ,  $p < 0,05$  соответственно), что также указывает на существенный вклад данного фенотипа костномозговых стволовых клеток в спектр продукции биологически активных молекул. В то же время количество клеток с фенотипом CD34 $^{+}$ /CD45 $^{+}$ /EpoR $^{+}$  после кратковременной инкубации с эритропоэтином находилось в прямой и сильной взаимосвязи с уровнями продукции IL-1 $\beta$  и Epo ( $r = 0,723408$ ,  $p < 0,05$  и  $r = 0,487593$ ,  $p < 0,05$  соответственно), что отражает роль этого фенотипа клеток во вкладе в спектр продуцируемых КМ-МНК биологически активных молекул.

Уровни продукции NO взаимосвязаны с уровнями продукции IL-1 $\beta$  и Epo ( $r = 0,728895$ ,  $p < 0,05$  и  $r = 0,738177$ ,  $p < 0,05$  соответственно), уровни продукции TNF $\alpha$  сопряжены с уровнями продукции Epo ( $r = 0,738095$ ,  $p < 0,05$ ), уровни продукции IL-6 взаимосвязаны с уровнями продукции IL-8 ( $r = 0,753145$ ,  $p < 0,05$ ), а уровни продукции IL-10 сопряжены с уровнями продукции TGF- $\beta$ 1 ( $r = 0,8$ ,  $p < 0,05$ ) КМ-МНК при длительной стимуляции эритропоэтином. В то же время уровни продукции IL-1 $\beta$  взаимосвязаны с уровнями продукции IL-6 ( $r = 0,809524$ ,  $p < 0,05$ ), уровни продукции IL-6 – с уровнями продукции IL-10 ( $r = 0,711303$ ,  $p < 0,05$ ), уровни продукции IL-8 – с уровнями продукции IGF-1 ( $r = 0,80387$ ,  $p < 0,05$ ), а уровни продукции IL-10 сопряжены с уровнями продукции Epo и NO ( $r = 0,574966$ ,  $p < 0,05$  и  $r = 0,665943$ ,  $p < 0,05$  соответственно), что отражает наличие сложной сети взаимодействий (сдерживание и/или стимуляция) между биологически активными молекулами, продуцируемыми костномозговыми стволовыми клетками.

## Обсуждение

Регенеративная медицина ишемических заболеваний на основе стволовых клеток рассматривается как новый метод восстановления ишемизированных тканей и стимулирования неоангиогенеза. Эритропоэтин способствует выживаемости, пролиферации и дифференцировке эритроидных прогениторов. Рецептор к эритропоэтину – это 95 кДа пептид, выявленный не только на эритроидных, но и на эндотелиаль-

ных клетках, моноклеарах периферической крови. Известны антиишемические эффекты эритропоэтина, но механизмы этого действия изучены недостаточно. Показано, что эритропоэтин увеличивает пролиферацию эндотелиоцитов и неоангиогенез, запускает пролиферацию, дифференцировку и адгезию прогениторных клеток и проявляет антиапоптотическое влияние [5, 12].

Выявленное нами увеличение количества гемопоэтических клеток с фенотипом CD34 $^{+}$ /CD45 $^{+}$ , экспрессирующих рецептор к эритропоэтину, не противоречит литературным данным. Так, авторы показали, что среди мобилизованных в периферическое русло костномозговых стволовых клеток, введением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, у здоровых доноров до 40% клеток несли рецептор к эритропоэтину [10]. В нашем исследовании мы целенаправленно исследовали уровни экспрессии рецептора к эритропоэтину среди предшественников гемопоэза (CD34 $^{+}$ /CD45 $^{+}$ ) и среди предшественников эндотелиальных прогениторных клеток (CD34 $^{+}$ /CD45 $^{-}$ ), что существенно уменьшало количество клеток в общем пуле КМ-МНК, экспрессирующих рецептор к эритропоэтину, но выявленное нами увеличение гемопоэтических стволовых клеток, несущих рецептор к эритропоэтину, укладывается в результаты других исследований и не противоречит им. В отношении выявленного уменьшения количества клеток с фенотипом CD34 $^{+}$ /CD45 $^{-}$ , экспрессирующих рецептор к эритропоэтину, в доступной нам литературе такого рода исследований не выявлено, но показано, что эритропоэтин способствует мобилизации эндотелиальных клеток в очаг ишемии [6]. В работе авторов на эндотелиальной линии из вен пуповины (HUVEC) было показано, что связывание эритропоэтина с рецептором к эритропоэтину зависит от времени экспозиции и достигает пика через 4 часа, при этом необходимо помнить об интернализации комплекса эритропоэтин/рецептор к эритропоэтину, что может привести к уменьшению количества рецепторов к эритропоэтину на мембране клеток [1].

Известно, что эритропоэтин влияет на клетки с образованием гетеродимерного комплекса с  $\beta$ -общей цепью (CD131), трансмембранным гликопротеином суперсемейства иммуноглобулинов с молекулярной массой 120-140 кДа, что обеспечивает цитопротекторный эффект [2]. Кроме этого, авторы показали, что на эндотелиальных клетках из пуповинной крови после инкубации с эритропоэтином увеличивается экспрессия рецептора к эритропоэтину и CD131, что отражает их возможную ковалентную связь. В нашем исследовании мы не выявили суще-

ственного влияния кратковременной экспозиции КМ-МНК с эритропоэтином на количество клеток, экспрессирующих CD131 и рецептор к эритропоэтину. Возможно, что это следствие недостаточной длительности инкубации клеток с эритропоэтином и оценки экспрессии этих поверхностных молекул в общем пуле клеток, а не на отдельном типе стволовых клеток. Эритропоэтин — основной регулятор эритропоэза, но имеет и негемопоэтический эффект. У имаго вовлечен в физиологический и патологический ангиогенез, врожденный ответ организма на повреждение тканей, особенно на ишемию. На молекулярном уровне цитопротекторный эффект эритропоэтина опосредован ассоциацией рецептора к эритропоэтину с CD131, что подтверждено на *knockout* по CD131 мышях, не способных к развитию цитопротекторного эффекта в ответ на эритропоэтин [2].

Способность эритропоэтина влиять на продукцию клетками биологически активных

веществ подтверждена и в исследовании авторов [10]. В ответ на эритропоэтин мобилизованные из костного мозга гранулоцитарным колониестимулирующим фактором стволовые клетки отвечали увеличением экспрессии (IL-8, IL-10, FGF basal, PDGF, MMP-9 и интегринов) опосредованно через активацию JAK2 и Akt сигнальных путей.

## Заключение

Наличие взаимосвязей между количеством стволовых клеток в общем пуле КМ-МНК, экспрессирующих рецептор к эритропоэтину, с уровнями продукции клетками биологически активных веществ может отражать их вклад в стимуляцию или же снижение этой продукции в ответ на кратковременное (60 минут) или длительное (72 часа) воздействие эритропоэтина на КМ-МНК у больных с ишемической болезнью сердца.

## Список литературы / References

1. Anagnostou A., Lee E.S., Kessimian N., Levinson R., Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, Vol. 87, no. 15, pp. 5978-5982.
2. Bennis Y., Sarlon-Bartoli G., Guillet B., Hubert L., Pellegrini P., Velly L., Blot-Chabaud M., Dignat-Georges F., Sabatier F., Pisano P. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential. *J. Thromb. Haemost.*, 2012, Vol. 10, pp. 1914-1928.
3. Ercan E., Bagla A.G., Aksoy A., Gacar G., Unal Z.S., Asgun H.F., Karaoz E. *In vitro* protection of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by erythropoietin. *Acta Histochem.*, 2014, Vol. 116, no. 1, pp. 117-125.
4. Fisher S.A., Doree C., Brunskill S.J., Mathur A., Martin-Rendon E. Bone marrow stem cell treatment for ischemic heart disease in patients with no option of revascularization: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 6, e64669. doi: 10.1371/journal.pone.0064669.
5. George J., Goldstein E., Abashidze A., Wexler D., Hamed S., Shmilovich H., Deutsch V., Miller H., Keren G., Roth A. Erythropoietin promotes endothelial progenitor cell proliferative and adhesive properties in a PI 3-kinase-dependent manner. *Cardiovasc. Res.*, 2005, Vol. 68, pp. 299-306.
6. Heeschen C., Aicher A., Lehmann R., Fichtlscherer S., Vasa M., Urbich C., Mildner-Rihm C., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 4, pp. 1340-1346.
7. Henry T.D., Schaer G.L., Traverse J.H., Povsic T.J., Davidson C., Lee J.S., Costa M.A., Bass T., Mendelsohn F., Fortuin F.D., Pepine C.J., Patel A.N., Riedel N., Junge C., Hunt A., Kereiakes D.J., White C., Harrington R.A., Schatz R.A., Losordo D.W., and the ACT34-CMI Investigators. Autologous CD34<sup>+</sup> cell therapy for refractory angina: 2-year outcomes from the ACT34-CMI study. *Cell Transplant.*, 2016, Vol. 25, pp. 1701-1711.
8. Hirata A., Minamino T., Asanuma H., Fujita M., Wakeno M., Myoishi M., Tsukamoto O., Okada K., Koyama H., Komamura K., Takashima S., Shinozaki Y., Mori H., Shiraga M., Kitakaze M., Hori M. Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs. *J. Am. Coll. Cardio.*, 2006, Vol. 48, pp. 176-184.
9. Hu R., Cheng Y., Jing H., Wu H. Erythropoietin promotes the protective properties of transplanted endothelial progenitor cells against acute lung injury via PI3K/Akt pathway. *Shock*, 2014, Vol. 42, no. 4, pp. 327-336.
10. Jang J., Yun J.Y., Hur I.J., Kang J.A., Choi J.I., Ko S.B., Lee J., Kim J.Y., Hwang I.C., Park Y.B., Kim H.S. Erythropoietin priming improves the vasculogenic potential of G-CSF mobilized human peripheral blood mononuclear cells. *Cardiovasc. Res.*, 2014, Vol. 104, pp. 171-182.
11. Kimakova P., Solar P., Solarova Z., Komel R., Debeljak N. Erythropoietin and its angiogenic activity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 7, 1519. doi: 10.3390/ijms18071519.
12. Lisowska K.A., Debska-Slizien A., Bryl E., Rutkowski B., Witkowski J.M. Erythropoietin receptor is expressed on human peripheral blood T and B lymphocytes and monocytes and is modulated by recombinant human erythropoietin treatment. *Artif. Organs*, 2010, Vol. 34, pp. 654-662.
13. Madigan M., Atoui R. Therapeutic use of stem cells for myocardial infarction. *Bioengineering (Basel)*, 2018, Vol. 5, no. 2, E28. doi: 10.3390/bioengineering5020028.

14. Mozid A., Yeo C., Arnous S., Ako E., Saunders N., Locca D., Brookman P., Archbold R.A., Rothman M., Mills P., Agrawal S., Martin J., Mathur A. Safety and feasibility of intramyocardial versus intracoronary delivery of autologous cell therapy in advanced heart failure: the REGENERATE-IHD pilot study. *Regen. Med.*, 2014, Vol. 9, no. 3, pp. 269-278.
15. Pavo I.J., Michel-Behnke I. Clinical cardiac regenerative studies in children. *World J. Cardiol.*, 2017, Vol. 9, no. 2, pp. 147-153.
16. Rupp S., Jux C., Bonig H., Bauer J., Tonn T., Seifried E., Dimmeler S., Zeiher A.M., Schranz D. Intracoronary bone marrow cell application for terminal heart failure in children. *Cardiol. Young*, 2012, Vol. 22, no. 5, pp. 558-563.
17. Seurder D., Radrizzani M., Turchetto L., Lo Cicero V., Soncin S., Muzzarelli S., Auricchio A., Moccetti T. Combined delivery of bone marrow-derived mononuclear cells in chronic ischemic heart disease: rationale and study design. *Clin. Cardiol.*, 2013, Vol. 36, no. 8, pp. 435-441.

---

**Авторы:**

**Лыков А.П.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»; старший научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Суровцева М.А.** — к.м.н., старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»; старший научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Повешченко О.В.** — д.м.н., заведующая лабораторией, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»; заведующая лабораторией ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

---

**Authors:**

**Lykov A.P.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Surovtseva M.A.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Poveshchenko O.V.**, PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Head of Laboratory, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Бондаренко Н.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»; старший научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Ким И.И.** — к.м.н., научный сотрудник, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»; младший научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Чернявский А.М.** — д.м.н., руководитель ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Фомичев А.В.** — к.м.н., научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Bondarenko N.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Kim I.I.**, PhD (Medicine), Research Associate, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Junior Research Associate, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Chernyavsky A.M.**, PhD, MD (Medicine), Head, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

**Fomichev A.V.**, PhD (Medicine), Research Associate, E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 06.02.2019  
Отправлена на доработку 07.03.2019  
Принята к печати 24.04.2019

Received 06.02.2019  
Revision received 07.03.2019  
Accepted 24.04.2019

## ИММУНОРЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЭСТРАДИОЛА И ПРОГЕСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

Глушков А.Н.<sup>1</sup>, Поленок Е.Г.<sup>1</sup>, Мун С.А.<sup>1</sup>, Гордеева Л.А.<sup>1</sup>,  
Луценко В.А.<sup>2</sup>, Вафин И.А.<sup>3</sup>, Вержбицкая Н.Е.<sup>2</sup>, Колпинский Г.И.<sup>4</sup>,  
Костянко М.В.<sup>5</sup>

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

<sup>2</sup> ГБУЗ Кемеровской области «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия

<sup>3</sup> ГКУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

<sup>5</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

**Резюме.** Известно, что при иммунизации животных против эстрадиола (Es) и прогестерона (Pg) образуются специфические антитела, модулирующие содержание этих гормонов в сыворотке крови и их биологические эффекты. Предположили, что аутоантитела к Es и Pg у человека могут влиять на уровни этих гормонов в сыворотке крови. Цель исследования – выявить предполагаемые корреляционные взаимосвязи между содержанием Es к Pg с уровнями специфических антител в сыворотке крови здоровых женщин и больных раком молочной железы (РМЖ) в постменопаузе. Исследовали содержание Es и Pg, а также специфических антител класса А (IgA-Es и IgA-Pg) в сыворотке крови у 226 здоровых женщин и 633 больных РМЖ с помощью иммуноферментного анализа. Содержание Es (nmol/l) у больных РМЖ оказалось выше, чем у здоровых женщин (0,25 против 0,16;  $p < 0,0001$ ), а содержание Pg – ниже (0,79 против 0,87;  $p < 0,0001$ ). Индивидуальные соотношения Pg/Es у больных РМЖ были ниже, чем у здоровых (3,19 против 6,64;  $p < 0,0001$ ). Индивидуальные соотношения специфических антител (IgA-Pg/IgA-Es) коррелировали с уменьшением содержания Es ( $r_s = -0,15$ ;  $p = 0,029$ ) и с увеличением содержания Pg ( $r_s = 0,38$ ;  $p < 0,0001$ ) и с увеличением Pg/Es ( $r_s = 0,29$ ;  $p < 0,0001$ ) у здоровых женщин. У больных РМЖ выявлены аналогичные взаимосвязи (соответственно:  $r_s = -0,14$ ;  $p < 0,001$ ;  $r_s = 0,1$ ;  $p = 0,009$ ;  $r_s = 0,15$ ;  $p < 0,0001$ ). При этом уменьшение Es и увеличение Pg и Pg/Es у больных РМЖ было менее выражено, чем у здоровых: коэффициенты  $a$  в уравнениях регрессии  $y = ax + b$  (где  $y$  = уровень гормонов,  $x$  = уровень антител) у больных в 3-4 раза меньше, чем у здоровых. Выявленные особенности взаимосвязей уровней гормонов и специфических антител были характерны только для ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup> РМЖ, но не для ER<sup>+</sup>/PR<sup>-</sup> и ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup> РМЖ. Таким образом, подтвердили предположение об участии специфических антител в регуляции содержания стероидных гормонов в сыворотке крови человека. У больных РМЖ иммунологические механизмы регуляции гормонального статуса ослаблены.

**Ключевые слова:** антитела, стероидные гормоны, эстрадиол, прогестерон, рак молочной железы, гормональные рецепторы

### Адрес для переписки:

Мун Стелла Андреевна  
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» Сибирского отделения Российской академии наук  
650065, Россия, г. Кемерово, Ленинградский пр., 10.  
Тел.: 8 (3842) 57-50-79, (983) 214-71-54.  
E-mail: stellamun@yandex.ru

### Address for correspondence:

Mun Stella A.  
Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences  
650065, Russian Federation, Kemerovo, Leningradsky ave., 10.  
Phone: 7 (3842) 57-50-79, (983) 214-71-54.  
E-mail: stellamun@yandex.ru

### Образец цитирования:

А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, С.А. Мун, Л.А. Гордеева, В.А. Луценко, И.А. Вафин, Н.Е. Вержбицкая, Г.И. Колпинский, М.В. Костянко «Иммунорегуляция содержания эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови женщин в постменопаузе» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5. С. 869-876.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-869-876  
© Глушков А.Н. и соавт., 2019

### For citation:

A.N. Glushkov, E.G. Polenok, S.A. Mun, L.A. Gordeeva, V.A. Lutsenko, I.A. Vafin, N.E. Verzhbitskaya, G.I. Kolpinsky, M.V. Kostyanko "Immunoregulation of blood serum estradiol and progesterone levels in postmenopausal women", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 869-876.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-869-876  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-869-876

## IMMUNOREGULATION OF BLOOD SERUM ESTRADIOL AND PROGESTERONE LEVELS IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

Glushkov A.N.<sup>a</sup>, Polenok E.G.<sup>a</sup>, Mun S.A.<sup>a</sup>, Gordeeva L.A.<sup>a</sup>,  
Lutsenko V.A.<sup>b</sup>, Vafin I.A.<sup>c</sup>, Verzhbitskaya N.E.<sup>b</sup>, Kolpinsky G.I.<sup>d</sup>,  
Kostyanko M.V.<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

<sup>b</sup> Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

<sup>c</sup> Regional Center of Blood, Kemerovo, Russian Federation

<sup>d</sup> Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

<sup>e</sup> Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

**Abstract.** Specific antibodies against estradiol (Es) and progesterone (Pg) are known to modulate blood serum concentrations of these hormones and their biological effects after immunization of animals. It was suggested that specific IgA-Es and IgA-Pg could influence on Es and Pg levels in human blood serum. The purpose of this study was to identify the suggested correlations between serum Es and Pg and specific IgA-Es and IgA-Pg in postmenopausal healthy women (HW) and breast cancer patients (BCP). The serum levels of Es, Pg, IgA-Es and IgA-Pg were studied in 226 HW and 633 BCP by means of solid-phase immunoassay. The following results were obtained. The levels of Es in BCP (0.25 nmol/l) were higher than in HW (0.16;  $p < 0.0001$ ). The levels of Pg were lower (0.79 vs 0.87;  $p < 0.0001$ ), and individual Pg/Es ratios were lower (3.19 vs 6.64;  $p < 0.0001$ ). Individual IgA-Pg/IgA-Es ratios correlated with decrease of Es ( $r_s = -0.15$ ;  $p = 0.029$ ), with increase in Pg ( $r_s = 0.38$ ;  $p < 0.0001$ ), and with increased Pg/Es ratio ( $r_s = 0.29$ ;  $p < 0.0001$ ) in healthy women. Similar correlations were determined in BCP (correspondingly:  $r_s = -0.14$ ,  $p < 0.001$ ;  $r_s = 0.1$ ,  $p = 0.009$ ;  $r_s = 0.15$ ,  $p < 0.0001$ ). The decrease of Es and increase of Pg and Pg/Es in BCP were less significant than in HW: the  $a$  quotients in regression  $y = ax + b$  ( $y$  = hormones levels and  $x$  = antibodies levels) in BCP were 3 to 4-fold lower than in HW. These peculiarities of interrelations between hormones and specific antibody levels were revealed only in ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup> BCP but not in ER<sup>+</sup>/PR<sup>-</sup> and ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup> BCP. In conclusion, we have confirmed a suggestion about participation of specific antibodies in regulation of steroids levels in human blood serum. The immune regulation of hormonal status was weakened in BCP.

**Keywords:** antibodies, steroid hormones, estradiol, progesterone, breast cancer, hormone receptors

Работа выполнена в рамках проекта VI.59.1.1. Программы фундаментальных научных исследований СО РАН (гос. задание № 0352-2018-0018).

### Введение

Стероидные гормоны, будучи низкомолекулярными химическими соединениями, не обладают иммуногенностью. Однако в конъюгации с макромолекулярными носителями они становятся гаптенами и приобретают способность индуцировать синтез специфических антител (АТ). В многочисленных экспериментах, выполненных еще в 1970–1980 гг., показано, что иммунизация животных белковыми конъюгатами стероидных гормонов приводила к образованию специфических АТ, значительным изменениям гормонального статуса и сопровождалась выраженными биологическими эффектами.

Так, при иммунизации против эстрадиола (Es) или эстрогена наблюдали повышение в крови уровней не только эстрогенов, но и прогестерона (Pg), гонадотропина и лютеинизирующего гормона [19, 20], а также нарушения овуляции и ферти-

лизации [22, 24]. Иммунизация мышей против Es приводила к замедлению возникновения и роста опухолей после имплантации Es-чувствительной аденокарциномы молочной железы [8]. Авторы объясняли этот эффект связыванием Es-специфическими АТ.

Активная иммунизация животных конъюгатами Pg-белок сопровождалась повышением в циркулирующей крови уровней Pg, Es и лютеинизирующего гормона [7, 9, 13, 17] и нарушениями репродуктивных функций у самок [10, 11, 23].

Влияние специфических ауто-АТ на содержание стероидных гормонов у человека, в том числе при различных гормонозависимых заболеваниях, изучено недостаточно. Описана роль сенсibilизации к Pg в клинике привычного невынашивания беременности [1]. Гиперчувствительность к Es и Pg обнаружена при астме, аутоиммунном дерматите, предменструальном синдроме, дисменорее и невынашиваемости беременности у женщин [14, 15, 16, 21]. Выявлены корреляционные взаимосвязи уровней Es и Pg со специфическими АТ у беременных женщин и их особенности при



врожденных пороках развития плода [2]. Получены предварительные данные об ассоциациях ауто-АТ к Es и Pg с содержанием этих гормонов в сыворотке крови у больных раком молочной железы [5].

Результаты приведенных выше экспериментальных и клинических исследований позволяют предположить, что АТ к Es и Pg принимают участие в регуляции содержания этих гормонов в сыворотке крови человека.

**Цель настоящего исследования** — выявить предполагаемые корреляционные взаимосвязи между содержанием Es и Pg с уровнями специфических АТ в сыворотке крови здоровых женщин и больных РМЖ в постменопаузе.

## Материалы и методы

В обследовании приняли участие 859 женщин в постменопаузе, в том числе 633 с диагнозом «инвазивная карцинома молочной железы», поступившие на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз РМЖ в каждом случае был подтвержден морфологически. У большинства женщин была выявлена I и II стадии заболевания (36,2 и 46,7%), III и IV стадии составили 16,6 и 0,5% соответственно. Согласно рецепторному статусу опухоли молочной железы были выделены 3 подгруппы: 142 (22,4%) женщины с рецептор-негативными опухолями (ER-/PR-), 360 (56,9%) — с рецептор-положительными опухолями (ER+/PR+) и 123 (19,4%) — со смешанным типом опухолей (ER+/PR-). Информация о рецепторном статусе опухоли (ER+/-, PR+/-) у больных РМЖ была взята из протоколов патологоанатомического отделения. Медиана возраста женщин в исследуемой группе — 62 года (интерквартильный размах 57-69).

В группу сравнения были включены 226 условно здоровых женщин, проживающих на территории Кемеровской области, и доноры из Кемеровского центра крови, без патологии молочной железы. Медиана возраста женщин в группе сравнения — 57 лет (интерквартильный размах 42-80).

Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все женщины, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем.

Иммуноанализ АТ к Es и Pg класса А (IgA-Es, IgA-Pg) проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа, подробная методика описана в работе [3]. В качестве антигенов на полистирольные иммунологические планшеты были иммобилизованы конъюгаты Es и Pg с бычьим сывороточным альбумином (BSA).

Конъюгат Es-BSA был синтезирован путем присоединения BSA к эстрадиолхинонам, полученным окислением Es солью Фреми. Конъюгат Pg-BSA был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидроксипрогестерона и BSA карбодимидным способом. Иммунологические планшеты сенсibilizировали конъюгатами гаптен-BSA в течение ночи при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови в разведении 1:20 вносили по 100 мкл в лунки планшета в дублях, инкубировали 1 ч при 37 °С на шейкере. Связавшиеся АТ выявляли с помощью козьих АТ против IgA человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США), разведение конъюгата 1:10000. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (ТМБ, США), на фотометре (Униплан, Россия) при длине волны 450 нм. Уровни АТ выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

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

где X = Es, Pg;  $\text{OD}_{\text{X-BSA}}$  — связывание АТ с конъюгатом гаптен-BSA,  $\text{OD}_{\text{BSA}}$  — фоновое связывание с BSA.

Концентрацию стероидных гормонов (Es, Pg) определяли с помощью коммерческих наборов «ИммуноФА-Эстрадиол», «ИммуноФА-ПГ» («Иммунотех», г. Москва) согласно инструкции по применению.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Ненормальный характер распределения показателей выявили с помощью критерия Шапиро–Уилка, и в дальнейшем для выявления различий между группами использовали U-критерий Манна–Уитни для независимых выборок. За критический уровень значимости принималось значение  $p < 0,05$ . Взаимосвязи между уровнями специфических АТ выявляли с помощью ранговой корреляции по Спирмену.

## Результаты

### Содержание эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови женщин в постменопаузе

Измерили содержание Es и Pg в сыворотке крови и рассчитали индивидуальные соотношения Pg/Es у женщин в постменопаузе, здоровых и больных РМЖ. В таблице 1 представлены результаты сопоставления сравниваемых групп по этим показателям. Медианы уровней Es оказались статистически значимо выше, а Pg — ниже у больных РМЖ. Соответственно, и соотношение Pg/Es у больных РМЖ было ниже, чем в контроле.

Содержание Es было одинаково низким в трех основных подгруппах больных РМЖ по статусу гормональных рецепторов. Уровни Pg у больных

РМЖ с ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup> оказались статистически значимо выше, чем с ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup> и ER<sup>+</sup>/PR<sup>-</sup> РМЖ, но ниже, чем у здоровых женщин. По соотношениям Pg/Es указанные подгруппы не различались, по-видимому, из-за очень низких уровней Es.

Не выявлено никаких различий по уровням Es и Pg, а также по соотношению Pg/Es между больными в разных стадиях РМЖ.

#### Взаимосвязи уровней эстрадиола и прогестерона и специфических антител у женщин в постменопаузе

Измерили уровни АТ класса А, специфичных Es и Pg, рассчитали индивидуальные соотношения IgA-Pg/IgA-Es и исследовали предполагаемые взаимосвязи с содержанием Es и Pg в сыворотке крови здоровых женщин и больных РМЖ с помощью корреляционного анализа. Результаты представлены в таблице 2.

У здоровых женщин содержание Es слабо коррелировало с уровнями IgA-Es (положительно) и с соотношением Pg/Es (отрицательно), но не с IgA-Pg. Содержание Pg оказалось взаимосвязанным с уровнями IgA-Pg и с IgA-Pg/IgA-Es (положительная, статистически высокодостоверная корреляция), но не с IgA-Es. Взаимосвязь Pg/Es с IgA-Es оказалась слабой отрицательной, а с IgA-

Pg/IgA-Es-положительной, статистически высоко значимой.

У больных РМЖ выявили отрицательные взаимосвязи Es с IgA-Pg (слабые) и IgA-Pg/IgA-Es (статистически высокосвязные), но не с IgA-Es. Содержание Pg слабо коррелировало с IgA-Pg и с IgA-Pg/IgA-Es (положительно), но не с IgA-Es. Положительные корреляционные связи Pg/Es проявились с IgA-Pg и с IgA-Pg/IgA-Es (высокозначимые), но не с IgA-Es.

У здоровых женщин коэффициенты *a* в уравнениях регрессии, описывающих взаимосвязи уровней исследуемых гормонов с соотношением IgA-Pg/IgA-Es, оказались в 2 раза ниже для Es и в 4 раза выше для Pg и Pg/Es, чем у больных РМЖ. Обнаруженные различия наглядно изображены на рисунке 1.

#### Взаимосвязи уровней эстрадиола и прогестерона со специфичными антителами у больных раком молочной железы с различным статусом гормональных рецепторов в опухоли

Описанные выше взаимосвязи, выявленные в общей группе больных РМЖ, имели характерные особенности в зависимости от наличия/отсутствия рецепторов Es и Pg в трех основных подгруппах (табл. 3).

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЭСТРАДИОЛА (Es), ПРОГЕСТЕРОНА (Pg) И Pg/Es В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. BLOOD SERUM LEVELS OF ESTRADIOL (Es), PROGESTERONE (Pg) AND Pg/Es RATIOS IN POSTMENOPAUSAL HEALTHY WOMEN AND BREAST CANCER PATIENTS (BCP), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

| Группа<br>Group                                                                            | N   | Es (nmol/l)      | Pg (nmol/l)      | Pg/Es             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------|------------------|-------------------|
| <b>1. Здоровые</b><br>1. Healthy women                                                     | 226 | 0,16 (0,09-0,28) | 0,87 (0,75-1,27) | 6,64 (3,08-12,69) |
| <b>2. Больные РМЖ</b><br>2. Breast cancer patients                                         | 633 | 0,25 (0,18-0,38) | 0,79 (0,66-1,05) | 3,19 (1,98-5,31)  |
| p 1-2                                                                                      |     | < 0,0001         | < 0,0001         | < 0,0001          |
| <b>3.1. РМЖ ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup></b><br>3.1. BCP ER <sup>-</sup> /PR <sup>-</sup> | 142 | 0,25 (0,19-0,38) | 0,76 (0,64-0,93) | 3,14 (1,98-4,68)  |
| <b>3.2. РМЖ ER<sup>+</sup>/PR<sup>-</sup></b><br>3.2. BCP ER <sup>+</sup> /PR <sup>-</sup> | 123 | 0,25 (0,17-0,36) | 0,76 (0,64-0,91) | 3,09 (2,08-4,99)  |
| <b>3.3. РМЖ ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup></b><br>3.3. BCP ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> | 360 | 0,25 (0,18-0,39) | 0,81 (0,68-1,22) | 3,27 (1,87-6,24)  |
| p 3.1-3.2                                                                                  |     | 0,374            | 0,573            | 0,940             |
| p 3.1-3.3                                                                                  |     | 0,929            | 0,034            | 0,491             |
| p 3.2-3.3                                                                                  |     | 0,317            | 0,006            | 0,544             |
| p 1-3.3                                                                                    |     | < 0,0001         | 0,005            | < 0,0001          |
| <b>4.1. РМЖ I стадия</b><br>4.1. BCP I stage                                               | 229 | 0,25 (0,17-0,35) | 0,79 (0,64-1,10) | 3,25 (2,16-5,77)  |
| <b>4.2. РМЖ II стадия</b><br>4.2. BCP II stage                                             | 296 | 0,25 (0,17-0,39) | 0,79 (0,68-1,06) | 3,23 (1,86-5,46)  |
| <b>4.3. РМЖ III+IV стадия</b><br>4.3. BCP III+IV stage                                     | 108 | 0,25 (0,20-0,40) | 0,79 (0,67-0,96) | 3,03 (1,87-4,22)  |
| p 4.1-4.2                                                                                  |     | 0,336            | 0,293            | 0,765             |
| p 4.1-4.3                                                                                  |     | 0,113            | 0,860            | 0,205             |
| p 4.2-4.3                                                                                  |     | 0,376            | 0,560            | 0,223             |

**ТАБЛИЦА 2. ВЗАИМОСВЯЗИ УРОВНЕЙ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ (y) И СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ (x) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ)**

TABLE 2. CORRELATIONS OF STEROIDS LEVELS (y) AND SPECIFIC ANTIBODIES LEVELS (x) IN THE BLOOD SERUM OF THE HEALTHY WOMEN AND BREAST CANCER PATIENTS

| Антитела<br>Antibodies                                  | Es                     |                    | Pg                     |                    | Pg/Es                  |                    |
|---------------------------------------------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
|                                                         | $r_s(p)$               | $y = ax+b$         | $r_s(p)$               | $y = ax+b$         | $r_s(p)$               | $y = ax+b$         |
| <b>Здоровые женщины</b><br>Healthy women<br>n = 226     |                        |                    |                        |                    |                        |                    |
| 1. IgA-Es                                               | 0,16<br>(0,015)        | $y = 0,01x+0,19$   | -0,08<br>(0,250)       | $y = -0,01x+1,10$  | -0,16<br>(0,016)       | $y = -0,59x+11,64$ |
| 2. IgA-Pg                                               | 0,05<br>(0,473)        | $y = 0,002x+0,24$  | 0,18<br>(0,006)        | $y = 0,07x+0,87$   | 0,05<br>(0,434)        | $y = 0,003x+9,38$  |
| 3. IgAPg/IgA-Es                                         | -0,15<br>(0,029)       | $y = -0,08x+0,31$  | 0,38<br>( $< 0,0001$ ) | $y = 0,59x+0,60$   | 0,29<br>( $< 0,0001$ ) | $y = 4,98x+5,55$   |
| <b>Больные РМЖ</b><br>Breast cancer patients<br>n = 633 |                        |                    |                        |                    |                        |                    |
| 1. IgA-Es                                               | 0,02<br>(0,548)        | $y = 0,003x+0,29$  | 0,04<br>(0,314)        | $y = -0,002x+0,95$ | 0,01<br>(0,898)        | $y = -0,02x+5,58$  |
| 2. IgA-Pg                                               | -0,08<br>(0,043)       | $y = -0,006x+0,31$ | 0,13<br>(0,002)        | $y = 0,03x+0,85$   | 0,12<br>(0,002)        | $y = 0,33x+4,65$   |
| 3. IgA-Pg/IgA-Es                                        | -0,14<br>( $< 0,001$ ) | $y = -0,04x+0,33$  | 0,10<br>(0,009)        | $y = 0,13x+0,84$   | 0,15<br>( $< 0,0001$ ) | $y = 1,19x+4,54$   |

**ТАБЛИЦА 3. ВЗАИМОСВЯЗИ УРОВНЕЙ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ (y) И СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ (x) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) С РАЗНЫМ СТАТУСОМ ГОРМОНАЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ (ER/PR)**

TABLE 3. CORRELATIONS OF STEROIDS LEVELS (y) AND SPECIFIC ANTIBODIES LEVELS (x) IN THE BLOOD SERUM OF THE BREAST CANCER PATIENTS WITH THE DIFFERENT STATUS OF STEROIDS RECEPTORS (ER/PR)

| Антитела<br>Antibodies                                                                       | Es               |                    | Pg                     |                   | Pg/Es            |                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------|------------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                                                                                              | $r_s(p)$         | $y = ax+b$         | $r_s(p)$               | $y = ax+b$        | $r_s(p)$         | $y = ax+b$         |
| <b>Больные РМЖ ER-/PR- N = 142 (22,4%)</b><br>Breast cancer patients ER-/PR- N = 142 (22,4%) |                  |                    |                        |                   |                  |                    |
| 1. IgA-Es                                                                                    | -0,04<br>(0,675) | $y = -0,001x+0,29$ | -0,13<br>(0,120)       | $y = -0,03x+0,99$ | -0,05<br>(0,585) | $y = -0,13x+5,45$  |
| 2. IgA-Pg                                                                                    | -0,15<br>(0,071) | $y = -0,02x+0,32$  | 0,03<br>(0,746)        | $y = 0,02x+0,85$  | 0,12<br>(0,146)  | $y = 0,55x+3,65$   |
| 3. IgA-Pg/IgA-Es                                                                             | -0,22<br>(0,009) | $y = -0,04x+0,32$  | 0,16<br>(0,062)        | $y = 0,10x+0,82$  | 0,24<br>(0,003)  | $y = 1,43x+3,78$   |
| <b>Больные РМЖ ER+/PR- N = 123 (19,4%)</b><br>Breast cancer patients ER+/PR- N = 123 (19,4%) |                  |                    |                        |                   |                  |                    |
| 1. IgA-Es                                                                                    | -0,03<br>(0,760) | $y = 0,003x+0,28$  | -0,09<br>(0,332)       | $y = -0,02x+0,92$ | -0,02<br>(0,827) | $y = 0,001x+5,64$  |
| 2. IgA-Pg                                                                                    | -0,03<br>(0,762) | $y = 0,002x+0,28$  | -0,05<br>(0,558)       | $y = -0,02x+0,89$ | 0,01<br>(0,925)  | $y = -0,001x+5,65$ |
| 3. IgA-Pg/IgA-Es                                                                             | -0,06<br>(0,517) | $y = 0,01x+0,28$   | 0,03<br>(0,708)        | $y = 0,01x+0,83$  | 0,08<br>(0,365)  | $y = -0,72x+6,21$  |
| <b>Больные РМЖ ER+/PR+ N = 360 (56,9%)</b><br>Breast cancer patients ER+/PR+ N = 360 (56,9%) |                  |                    |                        |                   |                  |                    |
| 1. IgA-Es                                                                                    | 0,06<br>(0,245)  | $y = 0,004x+0,29$  | 0,13<br>(0,017)        | $y = 0,02x+0,94$  | 0,02<br>(0,739)  | $y = -0,004x+5,70$ |
| 2. IgA-Pg                                                                                    | -0,06<br>(0,258) | $y = -0,006x+0,32$ | 0,21<br>( $< 0,0001$ ) | $y = 0,05x+0,85$  | 0,14<br>(0,007)  | $y = 0,32x+4,82$   |
| 3. IgA-Pg/IgA-Es                                                                             | -0,13<br>(0,015) | $y = -0,05x+0,34$  | 0,11<br>(0,030)        | $y = 0,17x+0,86$  | 0,15<br>(0,005)  | $y = 1,49x+4,49$   |

У больных с отсутствием рецепторов Es и Pg (ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>) обнаружены только взаимосвязи IgA-Pg/IgA-Es с Es (отрицательная) и с Pg/Es (положительная). Однако коэффициенты  $a$  в уравнениях регрессии оказались в 2 раза выше для Es и в 3,5 раза ниже для Pg/Es, чем у здоровых (сравнение с табл. 2).

Ни одной из искомых взаимосвязей не было обнаружено при наличии в опухоли ER и отсутствии PR (ER<sup>+</sup>/PR<sup>-</sup>).

При наличии в опухоли рецепторов и к Es, и к Pg (ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>) выявлены взаимосвязи IgA-Pg/IgA-Es с Es, Pg и Pg/Es, такие же, как и в общей группе больных РМЖ. Кроме того, для них было характерно наличие прямых взаимосвязей Pg и с

IgA-Pg (статистически высокодостоверных), и с IgA-Es. IgA-Pg коррелировали с Pg/Es.

## Обсуждение

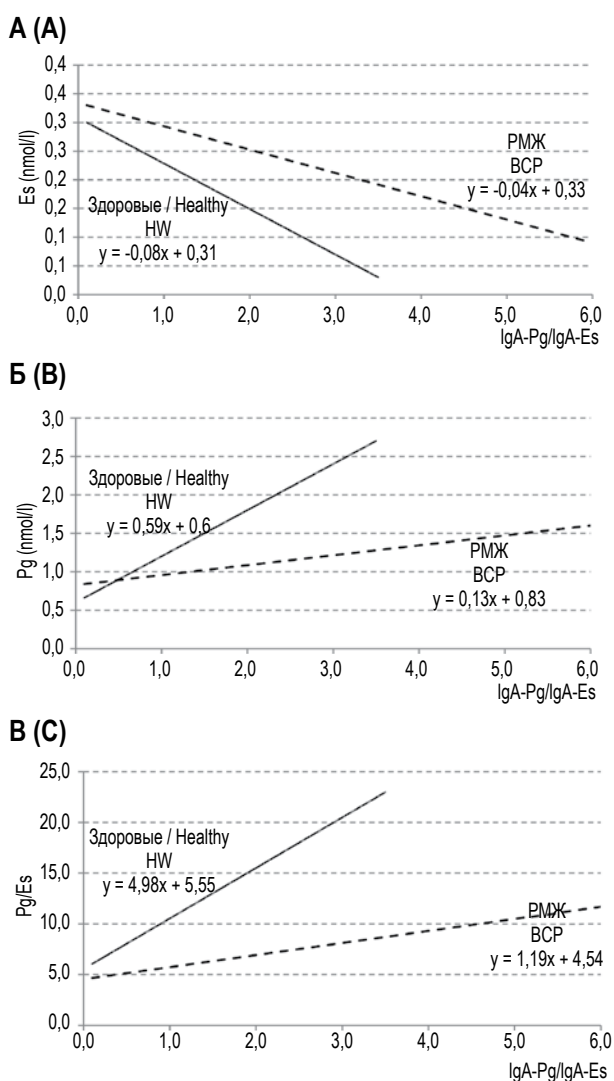
Полученные результаты соответствуют известным представлениям о роли стероидных гормонов в возникновении РМЖ: проканцерогенных эффектов Es и антиканцерогенных Pg [6, 12, 18]. У больных РМЖ содержание в сыворотке крови Es оказалось значительно выше, а Pg — ниже, чем у здоровых женщин в постменопаузе. Соотношение Pg/Es у больных также было ниже, чем в контроле. При этом содержание Pg в сыворотке у больных ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup> РМЖ оказалось выше, чем у больных ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup> и ER<sup>+</sup>/PR<sup>-</sup> РМЖ, хотя и ниже, чем у здоровых. Содержание Es в сыворотке крови было одинаково высоким, а соотношение Pg/Es одинаково низким у больных РМЖ независимо от наличия/отсутствия ER и PR. Это подтверждает ведущую роль Es в возникновении РМЖ и свидетельствует о возможной роли Pg в отборе злокачественных клеток, содержащих PR.

Впервые у здоровых женщин были выявлены взаимосвязи между содержанием в сыворотке крови стероидных гормонов и соответствующих специфических АТ: уровни Es коррелировали с IgA-Es, а уровни Pg — с IgA-Pg. Наиболее значимые взаимосвязи обнаружены при анализе индивидуальных соотношений IgA-Pg/IgA-Es с содержанием Pg и соотношением Pg/Es. Это подтверждает предположение о влиянии специфических АТ на содержание стероидных гормонов у человека в естественных условиях, а также свидетельствует о наличии взаимосвязи индивидуального иммунологического баланса между АТ к разным стероидам (IgA-Pg/IgA-Es) и индивидуального эндокринного баланса между разными стероидами (Pg/Es).

У больных РМЖ не обнаружили взаимосвязей между IgA-Es и Es. Корреляции Pg и Pg/Es с IgA-Pg и IgA-Pg/IgA-Es оказались значительно менее выраженными, чем у здоровых женщин. Это говорит об ослаблении иммунорегуляции содержания стероидных гормонов, то есть об иммунорегуляторном дисбалансе при РМЖ.

Выявленные корреляции Pg и Pg/Es с IgA-Pg и IgA-Pg/IgA-Es оказались характерными только для больных с ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup> РМЖ, но не для ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup> и ER<sup>+</sup>/PR<sup>-</sup>. Иными словами, при PR<sup>-</sup> РМЖ имело место полное отсутствие иммунорегуляции гормонального статуса, а при PR<sup>+</sup> РМЖ иммунорегуляция сохранялась, но была значительно слабее, чем в норме.

Подобную трактовку полученных результатов нужно считать предварительной. Для понимания полной картины описанных явлений необходимо учитывать аффинность АТ, специфичных к Es и Pg, с помощью конкурентных методов им-



**Рисунок 1. Зависимости уровней Es (А) и Pg (В), а также соотношения Pg/Es (С) от соотношения уровней IgA-Pg/IgA-Es в сыворотке крови здоровых женщин и больных РМЖ**

Figure 1. Correlations of Es (A) and Pg (B) levels and Pg/Es ratio with IgA-Pg/IgA-Es ratio in the blood serum of healthy women (HW) and breast cancer patients (BCP)

муноанализа, а также влияние описанных ранее соответствующих антиидиотипических АТ [4] на взаимодействие гормонов и идиотипических АТ. Дальнейшее изучение выявленного фено-

мена иммунорегуляции гормонального статуса в норме и при различных гормонозависимых заболеваниях у человека представляется весьма перспективным.

## Список литературы / References

1. Гладкова К.А., Менжинская И.В., Сухих Т.Г., Сидельникова В.М. Роль сенсибилизации к прогестерону в клинике привычного невынашивания беременности // Проблемы репродукции, 2007. Т. 13, № 6. С. 95-98. [Gladkova K.A., Menzhinskaya I.V., Sukhikh G.T., Sidelnikova V.M. Sensitization role of progesterone in the clinical presentation of miscarriage. *Problemy reproduksii = Russian Journal of Human Reproduction*, 2007, Vol. 13, no. 6, pp. 95-98. (In Russ.)]
2. Глушков А.Н., Красильникова К.С., Поленок Е.Г., Костянюк М.В., Оленникова Р.В., Нерсисян С.Л. Совместное влияние антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону на содержание половых гормонов в сыворотке крови беременных женщин с пороками развития плода // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 647-656. [Glushkov A.N., Krasilnikova K.S., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Olennikova R.V., Nersesyan S.L. Combined effect of antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone upon sex hormone concentrations in blood serum of pregnant women congenital malformations of fetus. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 647-656. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2018-5-647-656.
3. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А., Баканова М.Л., Минина В.И., Мун С.А., Ларин С.А., Костянюк М.В. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия // Российский иммунологический журнал, 2011. Т. 5 (14), № 1. С. 39-44. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Anosova T.P., Savchenko Ya.A., Bakanova M.L., Minina V.I., Mun S.A., Larin S.A., Kostyanko M.V. Serum antibodies to benzo[a]pyrene and chromosomal aberrations in lymphocytes peripheral blood at the workers of coal processing enterprise. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2011, Vol. 5 (14), no. 1, pp. 39-44. (In Russ.)]
4. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Костянюк М.В., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А., Рагожина С.Е. Антитела и анти-антитела к стероидным гормонам и риск рака молочной железы // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 577-584. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E., Vafin I.A., Ragozhina S.E. Antibodies and anti-antibodies to steroid hormones, and breast cancer risk. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 577-584. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2017-5-577-584.
5. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Костянюк М.В., Рогозин А.И., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е. Совместное влияние антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону на содержание женских половых гормонов в сыворотке крови у больных раком молочной железы // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12, № 21. С. 40-45. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Rogozin A.I., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E. Combination effects of antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone onto concentrations of female sex hormones in blood serum of the breast cancer patients risks. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12, no. 21, pp. 40-45. (In Russ.)]
6. Федотчева Т.А., Шимановский Н.Л. Роль гестагенов и антигестагенов в регуляции пролиферативной активности клеток рака молочной железы // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2005. № 3. С. 3-11. [Fedotcheva T.A., Shimahovsky N.L. Role of gestagens and antigestagens in the regulation of proliferate activity of breast cancer cells. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*, 2005, no. 3, pp. 3-11. (In Russ.)]
7. Bochkansl R., Thie M., Kirchner C.J. Active immunization of rabbits against progesterone: increase in hormone levels, and changes in metabolic clearance rates and in genital tract tissues. *J. Steroid Biochem.*, 1989, Vol. 33, no. 3, pp. 349-355.
8. Caldwell B.V., Tillson S.A., Esber H., Thorneycroft I.H. Survival of tumors after immunization against oestrogens. *Nature*, 1971, Vol. 231, no. 5298, pp. 118-119.
9. Chang C.F., Roberts A.J., Reeves J.J. Increased luteinizing hormone secretion and ovarian function in Heifers actively immunized against estrogen and progesterone. *J. Anim. Sci.*, 1987, Vol. 65, no. 3, pp. 771-776.
10. Dray F., Csapo A.I., Erdos T. Effects of antibodies to estradiol 17 beta and to progesterone on the placental weight and pregnancy in rats – a quantitative study. *J. Steroid Biochem.*, 1975, Vol. 6, no. 3-4, pp. 547-548.
11. Elsaesser F. Effects of active immunization against oestradiol-17 beta, testosterone or progesterone on receptivity in the female rabbit and evaluation of specificity. *J. Reprod. Fertil.*, 1980, Vol. 58, no. 1, pp. 213-218.
12. Fernandez S.V., Russo I.H., Russo J. Estradiol and its metabolites 4-hydroxyestradiol and 2-hydroxyestradiol induce mutations in human breast epithelial cells. *Int. J. Cancer.*, 2006, Vol. 118, no. 8, pp. 1862-1868.
13. French L.R., Spennetta B. Effects of antibodies to progesterone on reproduction of ewes. *Theriogenology*, 1981, Vol. 16, no. 4, pp. 407-418.
14. García-Ortega P., Scorza E. Progesterone autoimmune dermatitis with positive autologous serum skin test result. *Obstet. Gynecol.*, 2011, Vol. 117, no. 2, Pt 2, pp. 495-498.
15. Itsekson A.M., Seidman D.S., Zolti M., Alesker M., Carp H.J. Steroid hormone hypersensitivity: Clinical presentation and management. *Fertil. Steril.*, 2011, Vol. 95, no. 8, pp. 2571-2573.

16. Itsekson A.M., Seidman D.S., Zolti M., Lazarov A., Carp H.J. Recurrent pregnancy loss and inappropriate local immune response to sex hormones. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2007, Vol. 57, no. 2, pp. 160-165.
17. Kaushansky A., Bauminger S., Koch Y., Lindner H.R., Endocrine and reproductive repercussions of immunization against progesterone and oestradiol in female rats. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 1977, Vol. 84, no. 4, pp. 795-803.
18. Kim J.Y., Han W., Moon H.G., Ahn S.K., Kim J., Lee J.W., Kim M.K., Kim T., Noh D.Y. Prognostic effect of preoperative serum estradiol level in postmenopausal breast cancer. *BMC Cancer*, 2013, Vol. 13, p. 503.
19. Martin T.E., Henricks D.M., Hill J.R. Jr, Rawlings N.C. Active immunization of the cow against oestradiol-17beta. *J. Reprod. Fertil.*, 1978, Vol. 53, no. 1, pp. 173-178.
20. Rawlings N.C., Kennedy S.W., Henricks D.M. The active immunization of the cyclic ewe against an estrone protein conjugates. *Theriogenology*, 1979, Vol. 12, no. 3, pp. 139-151.
21. Roby R.R., Richardson R.H., Vojdani A. Hormone allergy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2006, Vol. 55, no. 4, pp. 307-313.
22. Sundaram K., Tsong Y.Y., Hood W., Brinson A. Effect of immunization with estrone-protein conjugate in rhesus monkeys. *Endocrinology*, 1973, Vol. 93, no. 4, pp. 843-847.
23. Thomas G.B., Oldham C.M., Hoskinson R.M., Scaramuzzi R.J., Martin G.B. Effect of immunization against progesterone on oestrus, cycle length, ovulation rate, luteal regression and LH secretion in the ewe. *Aust. J. Biol. Sci.*, 1987, Vol. 40, no. 3, pp. 307-313.
24. Wotiz H.H., Scublinsky A., Walker C. Effect of estrogen antibodies on pregnancy in the rat. *Gynecol. Invest.*, 1972, Vol. 3, no. 1, pp. 124-125.

---

**Авторы:**

**Глушков А.Н.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммуногенетики, Институт экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Кемерово, Россия

**Поленок Е.Г.** — к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии, Институт экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Кемерово, Россия

**Мун С.А.** — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики, Институт экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Кемерово, Россия

**Гордеева Л.А.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики, Институт экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Кемерово, Россия

**Луценко В.А.** — главный врач ГБУЗ Кемеровской области «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия

**Вафин И.А.** — главный врач ГКУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия

**Вержбицкая Н.Е.** — к.м.н., заведующая патологоанатомическим отделением ГБУЗ Кемеровской области «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия

**Колпинский Г.И.** — д.м.н., профессор кафедры лучевой диагностики, лучевой терапии и онкологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

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

---

**Authors:**

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

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

**Mun S.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

**Gordeeva L.A.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

**Lutsenko V.A.**, Main Physician, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

**Vafin I.A.**, Main Physician, Regional Center of Blood, Kemerovo, Russian Federation

**Verzhbitskaya N.E.**, PhD (Medicine), Head, Pathology Department, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

**Kolpinsky G.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Radiology, Radiotherapy and Oncology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

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

---

Поступила 20.02.2019  
Отправлена на доработку 04.03.2019  
Принята к печати 13.03.2019

---

Received 20.02.2019  
Revision received 04.03.2019  
Accepted 13.03.2019

## РОЛЬ ФАКТОРОВ АНГИОГЕНЕЗА В ТРАНСПЛАЦЕНТАРНОЙ ПЕРЕДАЧЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ КОРИ

Шмитко А.Д.<sup>1</sup>, Костинов М.П.<sup>1,2</sup>, Полищук В.Б.<sup>1</sup>, Сависко А.А.<sup>3</sup>,  
Васильева Г.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Резюме.** Факторы ангиогенеза (VEGF, Ang-1, TGF- $\beta$ ) влияют на формирование, развитие и функционирование эндотелиальных клеток сосудов, входящих в структуру гистологического плацентарного барьера и участвующих в трансплацентарной передаче веществ. Целью исследования явилось изучение взаимосвязи концентрации VEGF, Ang-1, TGF- $\beta$  и уровня трансплацентарных IgG-антител к вирусу кори в пуповинной крови детей, рожденных матерями с плацентарной недостаточностью. В венозной крови 32 женщин с неосложненной беременностью и 34 — с плацентарной недостаточностью, а также пуповинной крови их новорожденных методом ИФА был исследован уровень IgG-антител к вирусу кори и концентрация факторов ангиогенеза (VEGF, Ang-1, TGF- $\beta$ ). В пуповинной крови серонегативных к вирусу кори младенцев, рожденных женщинами с плацентарной недостаточностью, установлен одинаково низкий уровень VEGF, снижение концентрации Ang-1 (1,6 раза) и повышение TGF- $\beta$  (2,7 раза) по сравнению с серопозитивными новорожденными. У аналогичной группы детей от матерей с физиологическим течением беременности уровень данных факторов не отличался от таковых у новорожденных, имеющих протективные антитела к кори. При неосложненном течении беременности трансплацентарная передача IgG к вирусу кори находится в прямой зависимости от наличия специфических антител у женщины, при плацентарной недостаточности дисбаланс в системе факторов ангиогенеза может способствовать нарушению механизмов трансмиссии IgG-антител к вирусу кори от матери плоду.

**Ключевые слова:** корь, вакцинация, факторы ангиогенеза, VEGF, Ang-1, TGF- $\beta$ , трансплацентарные антитела, новорожденные

### Адрес для переписки:

Шмитко Анна Дмитриевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин  
и сывороток имени И.И. Мечникова»  
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.  
Тел.: 8 (495) 917-41-49.  
E-mail: violadellanna@gmail.com

### Address for correspondence:

Shmitko Anna D.  
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera  
105064, Russian Federation, Moscow,  
Malyy Kazenny lane, 5a.  
Phone: 7 (495) 917-41-49.  
E-mail: violadellanna@gmail.com

### Образец цитирования:

А.Д. Шмитко, М.П. Костинов, В.Б. Полищук,  
А.А. Сависко, Г.В. Васильева «Роль факторов  
ангиогенеза в трансплацентарной передаче антител  
к вирусу кори» // Медицинская иммунология, 2019.  
Т. 21, № 5. С. 877-884.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-877-884  
© Шмитко А.Д. и соавт., 2019

### For citation:

A.D. Shmitko, M.P. Kostinov, V.B. Polishchuk, A.A. Savisko,  
G.V. Vasilyeva "Role of angiogenic factors for transplacental  
transfer of the measles antibodies", Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5,  
pp. 877-884.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-877-884  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-877-884

## ROLE OF ANGIOGENIC FACTORS FOR TRANSPLACENTAL TRANSFER OF THE MEASLES ANTIBODIES

Shmitko A.D.<sup>a</sup>, Kostinov M.P.<sup>a,b</sup>, Polishchuk V.B.<sup>a</sup>, Savisko A.A.<sup>c</sup>,  
Vasilyeva G.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> First Moscow State I. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Abstract.** Angiogenesis factors (VEGF, Ang-1, TGF- $\beta$ ) influence production, development and functioning of vascular endothelium that are part of the placental barrier structure and are involved into transplacental transfer of different substances. The aim of this study was to study the relationship between VEGF, Ang-1, and TGF- $\beta$  concentrations, and the levels of transplacental IgG-antibodies to the measles virus in cord blood of children born to mothers with placental insufficiency. Patients and methods: venous blood was taken from 32 women with uncomplicated pregnancies, and 34 samples from pregnant women with placental insufficiency, as well as umbilical blood of their newborns, the level of IgG-antibodies to measles and the concentration of some angiogenic factors (VEGF, Ang-1, TGF- $\beta$ ) examined by ELISA techniques. The following results were obtained: in a cord blood of infants seronegative for the measles virus, born to women with placental insufficiency, showed uniformly low VEGF levels, decreased Ang-1 concentration (1.6) and increased TGF- $\beta$  concentration (2.7) as compared to seropositive newborns. In a similar group of children from mothers with physiological pregnancy, the level of these factors did not differ from those in newborns with protective antibodies to measles. Conclusion: in physiological pregnancy, transplacental transmission of IgG-antibodies to the measles virus is directly dependent on the presence of specific antibodies in a woman; in case of placental insufficiency, an imbalance in the system of angiogenic factors may promote disturbances of transmission mechanisms for IgG measles-specific antibodies from mother to the fetus.

**Keywords:** measles, vaccination, angiogenesis factors, VEGF, Ang-1, TGF- $\beta$ , transplacental antibodies, newborns

### Введение

В довакцинальный период «иммунологический опыт» в человеческой популяции приобретался в процессе заболеваемости, особенно в детском возрасте. Такая инфекция, как корь, была одной из основных причин смертности среди детей раннего возраста. С развитием цивилизации и прогрессом профилактической иммунологии был внедрен более контролируемый и безопасный способ индукции иммунологической памяти путем вакцинации. Однако исследования показывают, что иммунитет, сформировавшийся в результате иммунизации, сохраняется менее длительно, чем после перенесенного заболевания, а процесс образования поствакцинальных антител подвержен влиянию различных факторов [4, 7, 19]. Поэтому в ряде случаев вакцинации, проведенной в детском возрасте в декретированные сроки, может быть недостаточно для формирования стойкой пожизненной защиты, и необходимо проведение курсов повторной иммунизации [6]. Это особенно актуально в последние годы, когда на территории стран Европы и в России стали возникать вспышки коревой инфекции как среди взрослого, так и детского населения, а также у детей до года [3, 17, 20, 24].

Считается, что дети первого года жизни невосприимчивы к вирусу кори, поскольку внутриутробно получают IgG-антитела от матери. Однако, согласно литературным данным, трансплацентарная передача антител находится в прямой зависимости от уровней общего и специфических IgG-антител, подклассов IgG, природы антигена, гестационного возраста новорожденного, состояния плаценты [21]. Таким образом, важными моментами в обеспечении пассивного иммунитета у детей в возрасте до 12 месяцев (срок проведения первой вакцинации против кори) являются: состояние здоровья матери, ее прививочный анамнез, наличие защитных антител в отношении данной инфекции, течение беременности и срок рождения ребенка (состояние доношенности). В ранее выполненных исследованиях было показано, что при наличии у матери во время беременности таких патологий, как плацентарная недостаточность и внутриутробная инфекция, ребенок может оказаться серонегативным к вирусу кори в 27,9 и 32,6% соответственно; а в случае передачи протективных IgG-антител в низкой концентрации их количества может быть недостаточно для полноценной



защиты ребенка в течение первого года жизни [1, 5, 11].

Трансплацентарная передача иммуноглобулинов класса G осуществляется благодаря наличию неонатальных Fc-рецепторов (FcRn), расположенных на клетках плацентарного барьера, а именно на клетках синцитиотрофобласта (СТБ) и эндотелиальных клетках сосудов плаценты. Предполагается, что антитела, присутствующие в высокой концентрации в крови матери, поглощаются на поверхности СТБ путем пиноцитоза, а затем связываются с неонатальным рецептором в закисленной среде эндосом. Связанные антитела транспортируются к базолатеральной поверхности, где высвобождаются при контакте с кровью плода [16, 17, 22].

Таким образом, состояние плаценты играет ключевую роль в эффективности передачи антител от матери плоду. Правильное развитие плаценты напрямую зависит от удачной инвазии трофобласта, а также процессов васкулогенеза, то есть образования сосудов из мезодермальных клеток-предшественников, и ангиогенеза — создания новых сосудов из уже существующих [14]. Все стадии развития плаценты контролируются различными цитокинами и ростовыми факторами, образующими ее цитокиновую сеть [8, 9]. В качестве более изученных и значимых в регуляции ангиогенеза можно выделить: фактор ро-

ста эндотелия сосудов (VEGF), белок семейства ангиопоэтинов — ангиопоэтин-1 (Ang-1), а также трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ ), являющийся супрессорным цитокином и обладающий мощным антиангиогенным и проапоптогенным действием. Данные факторы влияют на формирование, развитие и функционирование эндотелиальных клеток сосудов, входящих в структуру гистологического плацентарного барьера и участвующих в трансплацентарной передаче веществ. Существуют исследования, показывающие их значимую роль в формировании таких патологий беременности, как гестоз и плацентарная недостаточность [9, 12, 13, 18, 23]. Таким образом, можно предположить влияние данных факторов и на трансплацентарную передачу IgG-антител от матери плоду. **Целью данного исследования** явилось изучение взаимосвязи концентрации факторов ангиогенеза (VEGF, Ang-1, TGF- $\beta$ ) и уровня трансплацентарных IgG-антител к вирусу кори в пуповинной крови детей, рожденных матерями с плацентарной недостаточностью.

## Материалы и методы

В исследование участвовали 66 пар мать — новорожденный. Осуществлен анализ 66 сывороток цельной венозной крови рожениц (возраст 26-35 лет), по данным анамнеза не болевших корью

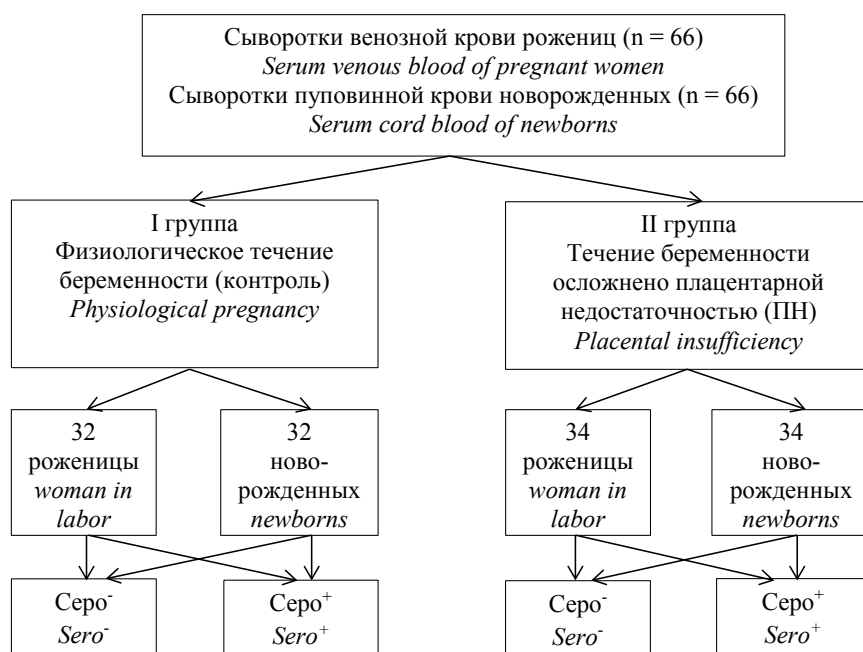
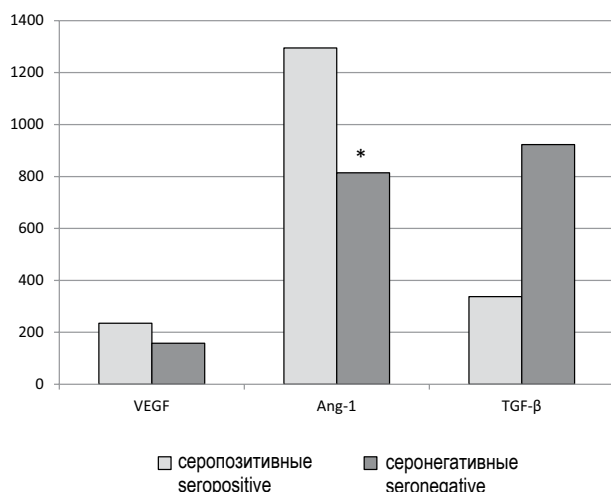


Рисунок 1. Группы наблюдения и материалы исследования

Figure 1. Observation groups and study material

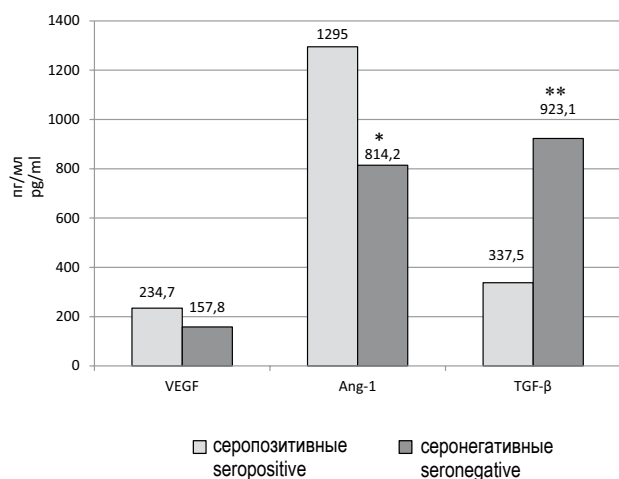


**Рисунок 2. Содержание факторов ангиогенеза в пуповинной крови серонегативных и серопозитивных к вирусу кори новорожденных при плацентарной недостаточности у матерей**

Примечание. Значимость различий ( $p < 0,05$ ) при сравнении показателей: \* – между серо (-) новорожденными при сравнении Ang-1; \*\* – между серо (-) и серо (+) новорожденными при сравнении TGF-β.

Figure 2. The factors of angiogenesis in the umbilical blood of seronegative and seropositive to the measles virus of newborns during the placental insufficiency at pregnancy

Note.  $p < 0,05$ : \*, between seronegative newborns, comparing Ang-1; \*\*, between seronegative newborns, comparing TGF-β.



**Рисунок 3. Содержание факторов ангиогенеза в пуповинной крови серонегативных и серопозитивных к вирусу кори новорожденных при физиологическом течении беременности матерей**

Примечание.  $p > 0,05$  – при сравнении показателей во всех группах.

Figure 3. Factors of angiogenesis in the umbilical blood of seronegative and seropositive to the measles virus of newborns during the physiological pregnancy

Note.  $p > 0,05$ , comparing indicators in all groups.

и вакцинированных от данной инфекции в декретированные сроки. Также оценено 66 образцов сывороток пуповинной крови их новорожденных (гестационный возраст  $\geq 37$  недель). Забор крови, все клинические и иммунологические исследования проводились после получения письменного информированного согласия. Забор пуповинной крови новорожденного производился в начале третьего периода родов (после рождения плода); цельной венозной крови роженицы – во время родов (до рождения плода). С целью выявления соматической патологии матери, нарушения течения беременности и родов, патологии новорожденного осуществлен сбор терапевтического, акушерско-гинекологического анамнеза женщин, анализ состояния новорожденных, исследование последа. Постановка диагноза и наблюдение за пациентами проводились совместно с врачами акушером-гинекологом и неонатологом. В зависимости от особенностей течения беременности были сформированы следующие группы: I – 32 женщины с физиологическим течением беременности и их новорожденные; II – 34 женщины, беременность которых была осложнена плацентарной недостаточностью (ПН), их новорожденные. В последующем новорожденные и их матери в зависимости от уровня антител к вирусу кори были разделены на серонегативных (серо<sup>-</sup>,  $< 0,18$  МЕ/мл) и серопозитивных (серо<sup>+</sup>,  $\geq 0,18$  МЕ/мл) – соответственно, без протективных антител и имеющие IgG-антитела к коревой инфекции в защитных значениях (рис. 1).

Уровень IgG-антител к вирусу кори в пуповинной крови новорожденных и венозной крови рожениц определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя наборы реагентов «ВектоКорь – IgG» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия), согласно инструкции. Концентрацию цитокинов и ростовых факторов: фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиопоэтина-1 (Ang-1), трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), в пуповинной крови новорожденных и венозной крови рожениц, оценивали в ИФА, применяя коммерческие тест-системы «VEGF – ИФА – БЕСТ» («Вектор-Бест»), Quantikine ELISA Human Angiopoietin-1 (R&D Systems), Platinum ELISA Human TGF- $\beta$ 1 (eBioscience) соответственно.

Математическая обработка полученных данных проводилась методами вариационной статистики с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2010, Statistica for Windows 2010, Biostat. Для описания результатов были рассчитаны медиана и интерквартильный размах – Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ). Для сравнения значений показателей были использованы методы непараметрической статистики: U-критерий Манна–

Уитни для оценки статистической значимости различий показателей 2 выборок; критерий Краскала–Уоллиса — для сравнения 3 и более групп по одному признаку; таблицы сопряженности ( $\chi^2$ , а также  $\chi^2$  с поправкой по Йейтсу для групп ниже 10). Различия между показателями считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Был проведен комплексный анализ содержания ангиогенных факторов в пуповинной крови серонегативных и серопозитивных к вирусу кори младенцев, рожденных женщинами с плацентарной недостаточностью (ПН), а также матерями с неосложненной беременностью (рис. 2).

Исследование выявило, что при плацентарной недостаточности у серопозитивных к вирусу кори новорожденных уровни ангиогенных факторов были следующими: VEGF 234,7 (39,4–711,2) пг/мл, Ang-1 1295 (1268–1515) пг/мл, TGF- $\beta$  337,5 (204–807,3) пг/мл. У младенцев, не имеющих протективных IgG-антител, значения показателей составляли: VEGF 157,8 (110–194,3) пг/мл, Ang-1 814,2 (738,7–1129) пг/мл, TGF- $\beta$  923,1 (808,6–966,1) пг/мл.

Изучение концентрации факторов ангиогенеза, проведенное в группе младенцев, рожденных матерями с физиологической беременностью, показало у серопозитивных к вирусу кори: VEGF 668,5 (459,9–1391,5) пг/мл, Ang-1 1045 (992,4–1366) пг/мл, TGF- $\beta$  440,7 (49,5–693,2) пг/мл; у серонегативных: VEGF 505,5 (410,3–1172,1) пг/мл, Ang-1 935,8 (857,3–990,9) пг/мл, TGF- $\beta$  268,8 (133–351) пг/мл (рис. 3).

Уровни проангиогенных (VEGF, Ang-1) и антиангиогенного (TGF- $\beta$ ) факторов у серонегативных и серопозитивных к вирусу кори младенцев, рожденных матерями с физиологическим течением беременности, статистически значимо не различались.

Аналогичный анализ, проведенный у детей, рожденных женщинами с плацентарной недостаточностью, а также сравнение пар мать — новорожденный с патологической и неосложненной беременностью между собой выявили некоторые отличия.

Уровень VEGF у серонегативных (157,8 (110,0–194,3) пг/мл) к вирусу кори новорожденных от матерей с плацентарной недостаточностью не отличался от такового у серопозитивных (234,7 (39,4–711,2) пг/мл) и в обоих случаях был значимо ниже, чем у аналогичных групп детей, рожденных матерями с физиологическим течением беременности (505,45 (410,3–1172,1) пг/мл и 668,5 (459,9–1391,5) пг/мл) ( $p < 0,05$ ).

Концентрация Ang-1 у серонегативных младенцев от матерей с ПН (814,2 (738,7–1129,0)

пг/мл) была ниже, чем у серопозитивных (1295 (1268,0–1515,0) пг/мл) ( $p < 0,05$ ). Сравнительный анализ данного параметра в группах с плацентарной недостаточностью и физиологической беременностью не выявил значимых различий ( $p > 0,05$ ).

Концентрация TGF- $\beta$  у серонегативных к вирусу кори младенцев из группы с ПН составляла 923,1 (808,6–966,1) пг/мл, что достоверно выше, чем у серопозитивных (337,5 (204,0–807,3) пг/мл), а также у аналогичной когорты новорожденных от матерей с неосложненной беременностью (268,8 (133–351) пг/мл) ( $p < 0,05$ ).

## Обсуждение

IgG-антитела — основной фактор гуморальной защиты ребенка первых месяцев жизни и единственный класс иммуноглобулинов, способный преодолевать плацентарный барьер [21]. Транспорт IgG-антител через плаценту осуществляется благодаря наличию неонатальных рецепторов FcRn, главная функция которых заключается в защите IgG от катаболизма после интернализации клеткой и обеспечении перехода через эпителиальный (синцитиотрофобласт) и эндотелиальный барьеры, вовлеченные в трансмиссию IgG от матери плоду во время беременности [16, 17, 22].

В ранее проведенных работах было показано, что наличие у матери во время беременности плацентарной недостаточности повышает риск рождение ребенка, серонегативного к вирусу кори, в 2,5 раза [1]. Однако механизмы, лежащие в основе данной закономерности, изучены не были.

Трансплацентарная передача IgG-антител, опосредованная деятельностью FcRn-рецептора, процесс активный, следовательно, можно предположить, что механизмы, приводящие к энергетическому дефициту, в том числе лежащие в основе плацентарной недостаточности, могут отразиться на уровне материнских антител у плода. Данные исследований свидетельствуют, что многие сосудистые нарушения фетоплацентарного комплекса обусловлены действием ангиогенных белков и цитокинов, в том числе VEGF, Ang-1, TGF- $\beta$  [9, 18]. Указанные факторы влияют на формирование, развитие и функционирование эндотелиальных клеток сосудов, входящих в структуру гистологического плацентарного барьера и участвующих в трансплацентарной передаче веществ, в том числе иммуноглобулинов класса G.

В ходе проведенного исследования установлено, что при плацентарной недостаточности регистрировалось снижение уровня VEGF в пуповинной крови как серонегативных, так и серопозитивных к вирусу кори новорожденных. Од-

нако в случае серопозитивных младенцев такой результат мог нивелироваться благодаря высоким значениям Ang-1 и адекватному, относительно результатов, полученных при неосложненной беременности, уровню TGF- $\beta$ . В то же время у серонегативных новорожденных уровень Ang-1 был достоверно ниже, чем у серопозитивных, а значения TGF- $\beta$  — выше.

Таким образом, у серонегативных новорожденных при плацентарной недостаточности наблюдался сдвиг баланса исследуемых белков: снижение показателей ангиогенеза (VEGF, Ang-1) и повышение секреции TGF- $\beta$ , обладающего мощным антиангиогенным и проапоптогенным действием, что могло приводить к более выраженным сосудистым нарушениям в системе фетоплацентарного комплекса и срыву защитных компенсаторных механизмов. Следовательно, такие процессы могут сопровождаться снижением энергетических ресурсов и нарушением механизмов активного трансплацентарного транспорта, в том числе IgG-антител.

Также, исходя из результатов исследования, можно предположить, что для трансплацентарной передачи IgG-антител от матери плоду имеет значение не секреция клетками плаценты конкретного сосудистого фактора, а совместное действие нескольких показателей. При этом, вероятно, у матерей с плацентарной недостаточностью во время беременности, родивших серопозитивных к вирусу кори новорожденных, отмечается действие механизмов, направленных на компенсацию патологического состояния, а у серонегативных — срыв механизмов компенсации, приводящий к дисбалансу сосудистых факторов и цитокинов.

Следовательно, несмотря на наличие в крови беременной IgG-антител к вирусу кори в защит-

ных количествах, в случае возникновения у женщины в период гестации плацентарной недостаточности даже доношенный ребенок, рожденный ею, может оказаться восприимчивым к указанной инфекции. Поэтому тактика вакцинации таких детей должна отличаться от общепринятой в детской популяции и соответствовать, например, ранее разработанным подходам по иммунизации пациентов с нарушенным состоянием здоровья [2, 4, 10].

## Заключение

В пуповинной крови младенцев, не имеющих протективных значений трансплацентарных IgG-антител к вирусу кори, рожденных матерями с плацентарной недостаточностью во время беременности, обнаружен дисбаланс в системе факторов, регулирующих ангиогенез, характеризующийся снижением концентраций проангиогенных факторов — VEGF, Ang-1 и, соответственно, увеличением содержания антиангиогенного фактора TGF- $\beta$ . В парах мать — новорожденный с физиологическим течением беременности у аналогичной группы младенцев, серонегативных к вирусу кори, уровень проангиогенных и антиангиогенных факторов не отличался от таковых у новорожденных, имеющих протективные антитела к указанной инфекции. Данный факт свидетельствует о том, что при неосложненном течении беременности трансплацентарная передача иммуноглобулинов класса G находится в прямой зависимости от наличия специфических антител у женщины, а при плацентарной недостаточности дисбаланс в системе факторов, регулирующих ангиогенез, может способствовать нарушению механизмов трансмиссии IgG-антител к вирусу кори от серопозитивных матерей плоду.

## Список литературы / References

1. Бочарова И.И., Костинов М.П., Новикова С.В., Шмитко А.Д., Обидина А.А., Цивцивадзе Е.Б. Трансплацентарные антитела к вирусу кори у новорожденных при различном течении беременности у их матерей // Российский вестник акушера-гинеколога, 2014. Т. 2, № 14. С. 14-18. [Bocharova I.I., Kostinov M.P., Novikova S.V., Shmitko A.D., Obidina A.A., Tsivtsivadze E.B. Transplacental antibodies to measles virus in neonatal infants during different pregnancies in their mothers. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin of Obstetrician-Gynaecologist*, 2014, Vol. 2, no. 14, pp. 14-18. (In Russ.)]
2. Зверев В.В., Хаитов Р.М. Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. Краткое издание / под ред. В.В. Зверева, Р.М. Хаитова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 640 с. [Zverev V.V., Khaitov R.M. Vaccines and vaccination. National leadership. Brief Edition. Ed. by V.V. Zverev, R.M. Khaitov]. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 640 p.
3. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь-апрель 2018 г. (по данным формы № 1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях») [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: [http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic\\_details.php?ELEMENT\\_ID=10158](http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=10158) (дата обращения: 18.02.19). [Infectious morbidity in the Russian Federation for January-April 2018 (according to form No. 1 "Information on infectious and parasitic diseases") [Electronic resource]. Access mode: [http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic\\_details.php?ELEMENT\\_ID=10158](http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=10158) (date of the application: 18.02.19)].

4. Костинов М.П. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья: практическое руководство для врачей. 4-е изд. М.: Медицина для всех, 2013. 431 с. [Kostinov M.P. Vaccination of children with impaired health: a practical guide for doctors. 4<sup>th</sup> edition]. Moscow: Medicine for All, 2013. 431 p.
5. Костинов М.П., Шмитко А.Д., Бочарова И.И., Черданцев А.П., Сависько А.А., Полищук В.Б. Уровень IgG-антител к вирусу кори в пуповинной крови новорожденных с учетом возраста матерей // Эпидемиология и инфекционные болезни, 2014. № 3. С. 30-34. [Kostinov M.P., Shmitko A.D., Bocharova I.I., Cherdantsev A.P., Savisko A.A., Polishchuk V.B. Measles virus-specific IgG-antibodies level in umbilical cord blood according to the maternal age. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni* = *Epidemiology and Infectious Diseases*, 2014, no. 3, pp. 30-34. (In Russ.)]
6. Костинов М.П., Шмитко А.Д., Соловьева И.Л., Сависько А.А., Полищук В.Б., Рыжов А.А., Черданцев А.П. Необходима ли третья доза вакцины против кори – взгляд иммунолога // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2016. № 5. С. 88-94. [Kostinov M.P., Shmitko A.D., Solovyeva I.L., Savisko A.A., Polishchuk V.B., Ryzhov A.A., Cherdantsev A.P. Is a third dose of measles vaccine necessary – an immunologist's view. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 5, pp. 88-94. (In Russ.)]
7. Костинов М.П., Шмитко А.Д., Соловьева И.Л., Сависько А.А., Черданцев А.П. Защищены ли от кори дети с аллергическими заболеваниями и часто болеющие после ревакцинации // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2017. Т. 4, № 96. С. 140-145. [Kostinov M.P., Shmitko A.D., Solovyeva I.L., Savisko A.A., Cherdantsev A.P. Are children with allergic diseases and sickly children resistant to measles after revaccination? *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo* = *Pediatrics. Speransky Journal*, 2017, Vol. 4, no. 96, pp. 140-145. (In Russ.)]
8. Соколов Д.И., Колобов А.В., Лесничная М.В., Костючек И.Н., Баля К.В., Аржанова О.Н., Кветной И.М., Сельков С.А. Роль проангиогенных и антиангиогенных факторов в развитии плаценты // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 4-5. С. 347-352. [Sokolov D.I., Kolobov A.V., Lesnichnaya M.V., Kostyuchek I.N., Balya K.V., Arzhanova O.N., Kvetnoy I.M., Selkov S.A. Role of pro-and antiangiogenic factors in placental development. *Meditinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 4-5, pp. 347-352. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-4-5-347-352.
9. Соколов Д.И., Сельков С.А. Иммунологический контроль формирования сосудистой сети плаценты: монография. СПб.: Н-Л, 2012. 208 с. [Sokolov D.I., Selkov S.A. Immunological control of the formation of vascular network of a placenta: monograph]. St. Petersburg: N-L, 2012. 208 p.
10. Соловьева И.Л., Костинов М.П., Кусельман А.И. Особенности вакцинации детей с измененным преморбидным фоном против гепатита В, кори, эпидемического паротита. Ульяновск: УлГУ, 2006. 295 с. [Solovyeva I.L., Kostinov M.P., Kuselman A.I. Features of vaccination of children with a modified premorbid background against hepatitis B, measles, and mumps]. Ulyanovsk: Ulyanovsk State University, 2006. 295 p.
11. Шмитко А.Д., Костинов М.П., Бочарова И.И., Сависько А.А., Магаршак О.О., Полищук В.Б. Трансплацентарные IgG к вирусу кори в пуповинной крови у новорожденных разных регионов Российской Федерации // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2015. № 1. С. 52-57. [Shmitko A.D., Kostinov M.P., Bocharova I.I., Savisko A.A., Magarshak O.O., Polishchuk V.B. Transplacental IgG against measles virus in umbilical blood of neonates from various regions of Russian Federation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 1, pp. 52-57. (In Russ.)]
12. Barut F., Barut A., Gun B.D., Ozdamamr S. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. *J. Diagn. Pathol.*, 2010, no. 5, p. 24.
13. Borrás D., Perales-Puchalt A., Ruiz Sacedón N., Perales A. Angiogenic growth factors in maternal and fetal serum in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction. *J. Obstet. Gynaecol.*, 2014, Vol. 34, no. 3, pp. 218-220.
14. Charnock-Jones D.S., Kaufmann P., Mayhew T.M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta*, 2004, Vol. 25, no. 2-3, pp. 103-113.
15. ECDC: Check your vaccination status before the holiday season [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/ecdc-check-your-vaccination-status-holiday-season> (дата обращения: 18.02.19). [ECDC: Check your vaccination status before the holiday season [Electronic resource]. Access mode: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/ecdc-check-your-vaccination-status-holiday-season> (date of the application: 18.02.19)].
16. Einarsdottir H.K., Selman M.H.J., Kapur R., Scherjon S., Koeleman C.A.M., Deelder A.M., van der Schoot C.E., Vidarsson G., Wuhrer M. Comparison of the Fc glycosylation of fetal and maternal immunoglobulin G. *Glycoconj. J.*, 2013, Vol. 30, no. 2, pp. 147-157.
17. Ellinger I., Fuchs R. hFcRn-mediated transplacental immunoglobulin G transport: Protection of and thrust to the human fetus and newborn. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 2012, Vol. 162, no. 9-10, pp. 207-213.
18. Enquobahrie D.A., Williams M.A., Qiu C., Woelk G.B., Mahomed Kassam. Maternal plasma transforming growth factor-beta1 concentrations in preeclamptic and normotensive pregnant Zimbabwean women. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, 2005, no. 17, pp. 343-348.
19. For Healthcare Professionals [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <https://www.cdc.gov/measles/hcp/index.html> (дата обращения: 18.02.19). [For Healthcare Professionals [Electronic resource]. Access mode: URL: <https://www.cdc.gov/measles/hcp/index.html> (date of the application: 18.02.19)].

20. Monthly measles and rubella monitoring report [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/measles-rubella-monthly-monitoring-report-november-2018.pdf> (дата обращения: 18.02.19). [Monthly measles and rubella monitoring report [Electronic resource]. Access mode: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/measles-rubella-monthly-monitoring-report-november-2018.pdf> (date of the application: 18.02.19)].
21. Palmeira P., Quinello C., Silveira-Lessa A.L., Zago C.A., Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies (review article). *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, 985646. doi: 10.1155/2012/985646.
22. Saji F., Samejima Y., Kamiura S., Koyama M. Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. *J. Rev. Reprod.*, 1999, Vol. 4, no. 2, pp. 81-89.
23. Semczuk-Sikora A., Krzyzanowski A., Stachowicz N., Robak J., Kraczkowski J., Kwiatek M., Semczuk M. Maternal serum concentration of angiogenic factors: PIGF, VEGF and VEGFR-1 and placental volume in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Ginekologia Polska*, 2007, Vol. 78, no. 10, pp. 783-786.
24. World Health Organization. Measles cases hit record high in the European Region [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <http://www.euro.who.int/en/media-centre/sections/press-releases/2018/measles-cases-hit-record-high-in-the-european-region> (дата обращения: 18.02.19). [World Health Organization. Measles cases hit record high in the European Region [Electronic resource]. Access mode: <http://www.euro.who.int/en/media-centre/sections/press-releases/2018/measles-cases-hit-record-high-in-the-european-region> (date of the application: 18.02.19)].

**Авторы:**

**Шмитко А.Д.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Костинов М.П.** — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры эпидемиологии ИПО ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Полищук В.Б.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Сависько А.А.** — к.м.н., доцент кафедры пропедевтики детских болезней ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на Дону, Россия

**Васильева Г.В.** — младший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Authors:**

**Shmitko A.D.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Kostinov M.P.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Science Worker of Russia, Head, Laboratory of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Department of Epidemiology, First Moscow State I. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

**Polyschuk V.B.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Savisko A.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Propedeutics of Pediatric Diseases, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Vasilyeva G.V.**, Junior Research Associate, Laboratory of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 22.02.2019  
Принята к печати 13.03.2019

Received 22.02.2019  
Accepted 13.03.2019

## ДИСФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ РАСЩЕЛИНАМИ ГУБЫ И НЕБА

Митропанова М.Н.<sup>1</sup>, Чудилова Г.А.<sup>1</sup>, Нестерова И.В.<sup>1,2</sup>,  
Ковалева С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Краснодар, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ, Москва,  
Россия

**Резюме.** Проблема реабилитации детей с врожденными расщелинами губы и неба (ВРГН) является сложнейшей задачей и не теряет своей актуальности. Дети с ВРГН часто страдают повторными острыми вирусными и бактериальными инфекциями респираторного тракта и ЛОР-органов, что приводит к вынужденной отсрочке проводимых хирургических, ортодонтических лечебных мероприятий, адекватной речевой терапии, осложнениям после проведенных этапных хирургических операций. Развитие воспалительных процессов у детей с ВРГН связано с анатомо-топографическими особенностями, облегчающими проникновение патогенной микрофлоры, нарушениями микробиоценоза слизистой ротовой полости и носа и, как следствие, с негативными изменениями в иммунной системе (ИС). Ключевыми клетками ИС в поддержании гомеостаза и обеспечения здоровья полости рта являются нейтрофильные гранулоциты (НГ). Дисфункции НГ при ВРГН препятствуют элиминации возбудителей и поддерживают их персистенцию. Это может возникать на фоне ранее имевшихся дефектов функционирования системы НГ и усугубляться значительным по патогенности и массивности воздействием различных инфекционных агентов. Полноценная диагностика дисфункций НГ необходима для дальнейшего осуществления их своевременной иммунокоррекции и предотвращения развития патологического хронического воспаления в ответ на длительно присутствующую на слизистой ротовой полости и носа патогенную микрофлору. С этой целью проведено изучение функциональной активности и фенотипических особенностей НГ при ВРГН у детей на разных этапах комплексной реабилитации. Проведено исследование образцов крови 56 детей с ВРГН: 1-3 лет (n = 20, группа 1), 4-6 лет (n = 20, группа 2) и 7-12 лет (n = 20, группа 3), находящихся на разных этапах комплексной реабилитации, и 30 условно здоровых детей (группы контроля) соответствующего возраста. Выявлено нарушение микробиоценоза слизистых ротовой и носовой полости, что может явиться причиной или следствием снижения антибактериального иммунитета, и прежде всего дисфункций НГ. Обнаружены общие для всех возрастных групп детей с ВРГН дисфункции НГ: появление НГ, экспрессирующих CD14-рецепторы, отсутствующие у детей всех трех контрольных групп, что свидетельствует о присутствии вирусной и бактериальной нагрузки; дефекты фагоцитоза, связанные со снижением количества активно фагоцитирующих НГ, нарушение функций захвата; напряженность NADPH-оксидаз с частичной или полной блокадой ответа на дополнительную антигенную нагрузку даже в период отсутствия острых клинических проявлений. Сравнительный анализ

### Адрес для переписки:

Митропанова Марина Николаевна  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения РФ  
350063, Россия, г. Краснодар, ул. Седина, 4.  
Тел.: 8 (918) 164-11-10.  
E-mail: kaf-detstom@yandex.ru

### Address for correspondence:

Mitropanova Marina N.  
Kuban State Medical University  
350063, Russian Federation, Krasnodar, Sedina str., 4.  
Phone: 7 (918) 164-11-10.  
E-mail: kaf-detstom@yandex.ru

### Образец цитирования:

М.Н. Митропанова, Г.А. Чудилова, И.В. Нестерова,  
С.В. Ковалева «Дисфункции нейтрофильных  
гранулоцитов у детей с врожденными расщелинами  
губы и неба» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21,  
№ 5. С. 885-894.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-885-894  
© Митропанова М.Н. и соавт., 2019

### For citation:

M.N. Mitropanova, G.A. Chudilova, I.V. Nesterova,  
S.V. Kovaleva "Dysfunctions of neutrophilic granulocytes  
in children with congenital cleft lip and palate", *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019,  
Vol. 21, no. 5, pp. 885-894.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-885-894  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-885-894

изучаемых показателей уровня экспрессии рецепторов CD64, CD16, CD32, CD14 НГ в группах детей с ВГРН демонстрирует разную оснащенность, предопределяющую несостоятельность фагоцитарной и микробицидной функции НГ в разные возрастные периоды. Так, увеличение экспрессии данных мембранных маркеров, особенно CD64 и CD14, в старших возрастных группах сопровождается более значимой дефектностью фагоцитарной и киллинговой функции НГ, что сопряжено не только с возвратными вирусными респираторными инфекциями, но и с высокой частотой ассоциированных бактериальных инфекций дыхательной системы и ЛОР-органов. Выявленные дисфункции НГ у детей с ВГРН различных возрастных групп свидетельствуют об их неспособности к реализации адекватной противoinфекционной защиты, что может приводить к нетипично протекающим вирусно-бактериальным инфекциям и возникновению различных, в том числе гнойных, осложнений в послеоперационном периоде, что требует разработки таргетной иммунотерапии, включаемой в программу комплексной реабилитации детей с ВГРН и направленной на восстановление нарушенных функций НГ.

*Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, врожденные расщелины губы и неба, дети*

## DYSFUNCTIONS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CHILDREN WITH CONGENITAL CLEFT LIP AND PALATE

Mitropanova M.N.<sup>a</sup>, Chudilova G.A.<sup>a</sup>, Nesterova I.V.<sup>a, b</sup>, Kovaleva S.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** The problem of rehabilitation of children with congenital cleft lip and palate (CCLP) is a difficult task and doesn't lose its relevance. Children with CCLP often suffer from repeated acute viral and bacterial infections of the respiratory tract and upper respiratory tract, which leads to a forced delay in surgical, orthodontic treatment, adequate speech therapy and complications after staged surgical operations. The development of inflammatory processes in children with CCLP is associated with anatomical and topographic features that facilitate the penetration of pathogenic microflora in oral and nose mucosa and, consequently, negative changes in the immune system (IS). The key cells of IS in maintaining homeostasis and ensuring oral health are neutrophil granulocytes (NG). NG dysfunctions in CCLP interfere with the elimination of pathogens and support their persistence. This can occur against the background of previously existing defects in the functioning of the NG system and is aggravated by the significant pathogenicity and massiveness of the impact of various infectious agents. Full diagnostics of NG dysfunctions is necessary for the further implementation of their timely immune correction and prevention of the development of pathological chronic inflammation in response to the pathogenic microflora long-term on the mucous membrane of the mouth and nose. For this purpose study was conducted of the functional activity and phenotypic characteristics of NG in children with CCLP at different stages of complex rehabilitation. Blood samples of 56 children with CCLP 1-3 years (n = 20, group 1), 4-6 years (n = 20, group 2), and 7-12 years (n = 20, group 3) at different stages of complex rehabilitation and 30 conditionally healthy children (control groups) of the corresponding age was studied. A violation of the microbiocenosis of the mucous membranes of the oral and nasal cavities was revealed, which may be a cause or a consequence of a decrease in antibacterial immunity, first of all NG dysfunctions. Common for all age groups children with CCLP NG dysfunction was found: the appearance of NG expressing CD14 receptors that are absent in children of all three control groups, which indicates the presence of viral and bacterial load; defects of phagocytosis associated with a decrease in the number of actively phagocytic NG, impaired NG capture functions; impaired NADPH oxidase release with partial or complete blockade of the response to additional antigenic load, even in the absence of acute clinical manifestations. Comparative analysis of the studied indicators of the expression level of the receptors CD64, CD16, CD32, CD14 NG in children with CCLP demonstrates different equipment, which determines the inconsistency of the phagocytic and microbicidal function of NG in different age periods. Thus, an increase in the expression of these membrane markers, especially CD64 and CD14, in older age groups is accompanied by more significant defects in phagocytic and killing functions of NG, which is associated not only with recurrent viral respiratory infections, but also with a high frequency of associated bacterial infections of the respiratory system and ENT –



organs. Revealed NG dysfunctions in children with CCLP of various age groups indicate their inability to implement adequate anti-infective protection, which can lead to atypically occurring viral – bacterial infections and the occurrence of various, including purulent complications in the postoperative period, which requires the development of targeted immunotherapy, included in the program of comprehensive rehabilitation in children with CCLP and aimed at restoring impaired NG functions.

*Keywords: neutrophilic granulocytes, congenital cleft lip and palate, children*

## Введение

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) являются основными клетками иммунной системы, которые в большом количестве рекрутируются в ответ на контакт с патогенами и отвечают за обеспечение здоровья полости рта. Ключевым фактором поддержания гомеостаза является взаимодействие между микробиотой полости рта и НГ [8, 9, 17]. Важнейшей функцией НГ является мгновенное реагирование на бактериальные, вирусные и грибковые патогены. Рецепторы поверхностной цитоплазматической мембраны НГ являются чувствительными сенсорами, которые способствуют реализации важных функций НГ и опосредуют взаимосвязь гранулоцитов с экстрацеллюлярным окружением [4-6]. У детей с пороками развития челюстно-лицевой области формирование воспалительного процесса связано с анатомо-топографическими особенностями при врожденной расщелине губы и неба (ВРГН), облегчающими проникновение патогенной микрофлоры с последующими нарушениями микробиоценоза слизистой ротовой полости и слизистой носа, и, как следствие, с негативными изменениями состояния иммунной системы [2, 3]. Необходимость использования антибактериальных препаратов приводит к появлению микроорганизмов с выраженными патогенными свойствами, обладающих высокой резистентностью к антибиотикам, что дополнительно усугубляет изменения микробного пейзажа при ВРГН [1]. Дисфункции НГ при ВРГН препятствуют элиминации возбудителей и поддерживают их персистенцию. С одной стороны, нарушение элиминации возбудителей может возникать на фоне ранее имевшихся дефектов функционирования системы НГ, с другой — несостоятельность НГ усугубляется значительным по патогенности и массивности воздействием различных инфекционных агентов.

Известно, что функциональная активность НГ, в частности их фагоцитарная функция и микробицидная активность, находится в непосредственной зависимости от фенотипических особенностей — количества и плотности экспрессируемых рецепторов [7]. Так, показано, что CD64(FCγRI), CD16(FCγRIII), CD32(FCγRII) — триггерные молекулы, запускающие иммунный фагоцитоз и процессы киллинга. Экспрессия на мембране НГ CD32, CD16 важна в осуществле-

нии как фагоцитарной функции, так и антитело-зависимой цитотоксичности (АЗКЦ), что ассоциируется с CD11b/CD18-зависимым повышением адгезии, дегрануляцией и киллингом [18]. Раннее распознавание микробных продуктов иммунной системой является необходимым условием для эффективного воспалительного ответа, приводящего к привлечению НГ к месту инфекции и бактериальному клиренсу. Рецепторы распознавания PAMP, включая TLR4, а также рецептор CD14, играют существенную роль в этом процессе [15]. CD14 представляет собой липополисахарид-связывающий белок (LPS) и функционирует как рецептор эндотоксина. CD14 и рецепторы распознавания образов Toll-подобного рецептора (TLR) участвуют в ответе на LPS и другие микробные продукты, компоненты грамотрицательных и грамположительных бактерий, микобактерий, спирохет и дрожжей [12]. Роль CD14 и TLR4 ранее была обнаружена при распознавании респираторно-синцитиального вируса (RSV) [14], что позволяет предположить, что эти рецепторы могут иметь более широкое участие в иммунном ответе, чем считалось ранее. CD14 слабо экспрессируется на НГ, однако после активации НГ экспрессия молекулы CD14 на поверхностной плазматической мембране увеличивается за счет транслокации из цитоплазматических гранул [16]. При длительной стимуляции НГ LPS молекулы CD14 синтезируются *de novo* [19]. НГ реагируют на комплексы LPS/LBP через CD14, высвобождая TNFα [10]. Определение особенностей функционирования НГ при ВРГН у детей имеет важное значение в мониторинге таких пациентов на разных этапах комплексной реабилитации. Полноценная диагностика дисфункций НГ необходима для дальнейшего осуществления их своевременной иммунокоррекции с целью предотвращения развития патологического хронического воспаления в ответ на длительно присутствующую на слизистой ротовой полости и носа патогенную микрофлору. Вместе с тем функциональная активность и фенотипические особенности НГ при ВРГН у детей на разных этапах комплексной реабилитации остаются малоизученными.

**Целью исследования** явилось изучение особенностей фенотипа и функциональной активности НГ у детей с врожденными расщелинами губы

и неба на различных этапах комплексной реабилитации.

## Материалы и методы

В исследование были включены 56 детей с ВРГН, находящихся на разных этапах комплексной реабилитации.

Группу 1 составили 20 детей от 1 года до 3 лет на этапе подготовки к хирургической операции по устранению дефекта мягкого неба (велопластики) или ранней щадящей операции по устранению дефектов твердого неба (уранопластики); в группу 2 вошло 20 детей от 4–6 лет перед хирургической операцией по устранению и коррекции дефектов твердого неба и закрытием остаточного дефекта неба (поздняя уранопластика), коррекции верхней губы и преддверия полости рта — ортодонтическая реабилитация; группу 3 составили 16 детей от 7 до 12 лет на этапе подготовки к ранней аутоостеопластике с коррекцией альвеолярного отростка верхней челюсти и хрящевого отдела носа, удалением временных и постоянных зубов по ортодонтическим показаниям, рассечением послеоперационных рубцов, устранением небно-глоточной недостаточности (компактостеотомия). Из ортодонтических мероприятий — применение лицевой маски, небных винтов для расширения верхней челюсти с одновременной протракцией, съемных и несъемных конструкций. Группы контроля составили условно здоровые дети соответствующих возрастных диапазонов (по 10 человек в каждой группе). Проводили микробиологические исследования полости рта, носоглотки и носовой полости у детей с ВРГН на наличие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов стандартными методами.

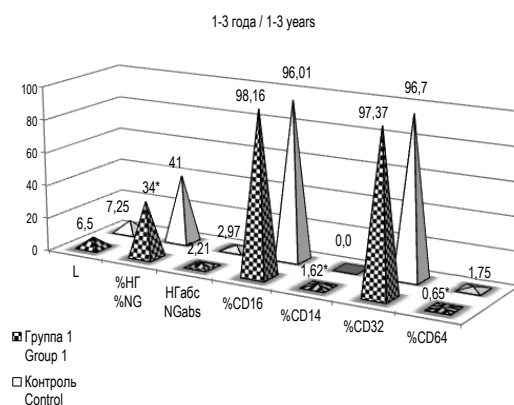
Проводилась оценка количества НГ, экспрессирующих CD64-, CD16-, CD32-, CD14-рецепторы (Becton Dickinson FACScan, США), и конъюгатов моноклональных антител CD64-FITC, CD16-FITC, CD32-PE, CD14-FITC (Beckman Coulter International S.A., Франция). Исследование фагоцитарной функции НГ проводили в соответствии с методическими рекомендациями [6], тестировали содержание активно фагоцитирующих НГ — относительное (% ФАН) и абсолютное количество (ФАН абс.); для характеристики объема захваченного бактериального материала (*S. aureus*, штамм 209) определяли фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ); для оценки киллинговой активности и переваривания определялся процент переваривания (% П), индекс переваривания (ИП). Активность микробицидных систем НГ, с оценкой их способности к реализации цитотоксического и цитолитического потенциала, тестировалась

с использованием нагрузочных тестов в системе *in vitro*. В зависимости от уровня активности NADPH-оксидазы в спонтанном и стимулированном NBT-тесте (индукция *S. aureus*, штамм 209) определялся средний цитохимический индекс — СЦИ, рассчитывался коэффициент мобилизации (КМ) — % ФПК<sub>ст</sub>/ % ФПК<sub>сп</sub>.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel, StatPlus 2009 с применением непараметрических тестов Вилкоксона и Манна—Уитни. Результаты представляли в виде медианы (верхний и нижний квартиль) — Ме ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ). Достоверность различия определяли при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

По результатам микробиологических и бактериологических исследований идентифицировано 10 культур грамположительных и грамотрицательных бактериальных микроорганизмов, а также *Candida albicans* и *Candida krusei*. Изучение микробного пейзажа у детей с ВРГН позволило выявить определенную закономерность — слизистые были заселены не монокультурами, а ассоциациями микроорганизмов, колонизирующими различные биотопы. Также выявлено, что с увеличением возраста во всех изученных биотопах наблюдаются значительные изменения как в качественном, так и в количественном составе микробов. Нарушение микробиоценоза слизи-



**Рисунок 1. Показатели рецепторной функции нейтрофильных гранулоцитов у детей 1-3 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы)**

Примечание. \* —  $p < 0,05$  (достоверность различий между исследуемой группой и соответствующим контролем).

Figure 1. Receptor function indicators of neutrophilic granulocytes in children 1-3 years of age with congenital cleft lip and palate as (as a percentage of the control group)

Note. \*,  $p < 0.05$  (the significance of differences between the study group and the corresponding control).

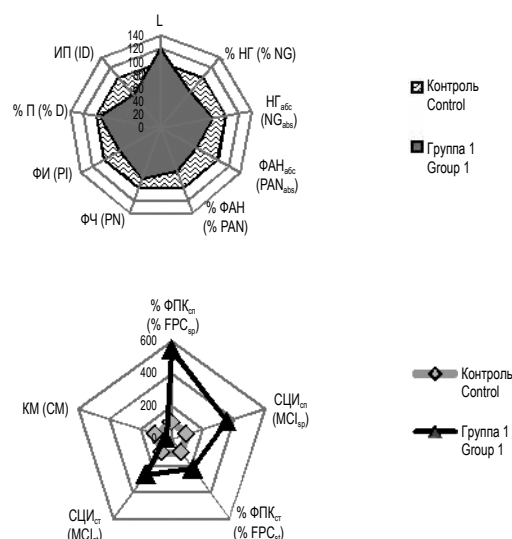
стных ротовой и носовой полости может явиться причиной или следствием снижения антибактериального иммунитета, и прежде всего дисфункций НГ.

Анализ показателей фагоцитарной и микробицидной активности, фенотипического профиля НГ у детей с ВГРН разных возрастных групп на различных этапах комплексной реабилитации продемонстрировал ряд особенностей.

Так, выявлено, что у детей группы 1, на фоне снижения относительного и абсолютного содержания НГ, отмечается незначительное увеличение количества НГ, экспрессирующих CD16- и CD32-рецепторы ( $p_1 > 0,05$ ;  $p_2 > 0,05$ ), достоверное снижение в 2,5 раза уровня CD64<sup>+</sup> НГ и появление НГ 0,97 (0,44-2,30) %, экспрессирующих на поверхности цитоплазматической мембраны CD14-антигены, в сравнении с показателями контрольной группы детей от 1-3 лет (рис. 1, табл. 1).

Анализ результатов исследования фагоцитарной функции у детей 1 группы, прежде всего, показал более низкий уровень активно фагоцитирующих НГ (% ФАН, ФАН абс.) относительно таковых у здоровых детей (рис. 2).

При этом и показатели поглотительной способности НГ (ФЧ, ФИ), и показатели, харак-



**Рисунок 2. Показатели фагоцитарной и NADPH-оксидазной микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов у детей 1-3 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы)**

Figure 2. Phagocytic and NADPH oxidase microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in children 1-3 years of age with congenital cleft lip and palate (as a percentage of the control group)

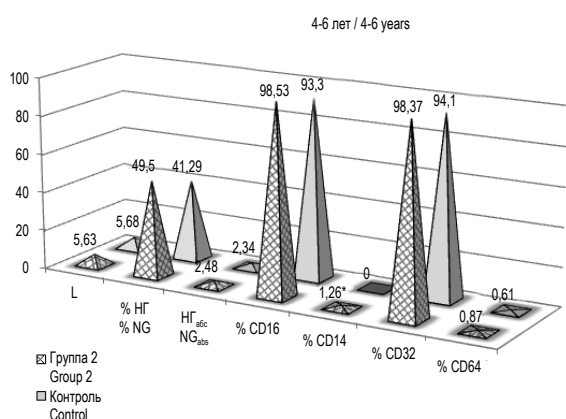
**ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ РЕЦЕПТОРНОЙ ФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННОЙ РАСЩЕЛИНОЙ ГУБЫ И НЕБА, Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

TABLE 1. INDICATORS OF THE RECEPTOR FUNCTION OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CHILDREN WITH CONGENITAL CLEFT LIP AND PALATE, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

| Показатели<br>Indicators                                    | 1-3 года<br>1-3 years   | Контроль<br>1-3 года<br>Control<br>1-3 years | 4-6 лет<br>4-6 years    | Контроль<br>4-6 лет<br>Control<br>4-6 years | 7-12 лет<br>7-12 years  | Контроль<br>7-12 лет<br>Control<br>7-12 years |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>Общее количество лейкоцитов</b><br>Total leukocyte count | 6,5<br>(6,45-7,00)      | 7,25<br>(6,15-7,40)                          | 5,63<br>(4,94-7,15)     | 5,68<br>(5,00-6,15)                         | 6,35*<br>(5,39-7,28)    | 4,57<br>(4,03-5,10)                           |
| <b>% НГ</b><br>% NG                                         | 34,00*<br>(28,00-38,00) | 41,00<br>(39,00-45,50)                       | 44,00<br>(36,50-53,75)  | 41,29<br>(35,00-45,00)                      | 52,00<br>(43,00-61,50)  | 57,83<br>(54,25-59,75)                        |
| <b>% CD16</b>                                               | 97,92<br>(97,88-98,4)   | 96,01<br>(96,00-99,20)                       | 98,53*<br>(98,28-99,27) | 93,30<br>(91,30-95,20)                      | 92,10*<br>(91,08-92,98) | 98,25<br>(96,84-99,36)                        |
| <b>% CD14</b>                                               | 0,97*<br>(0,44-2,30)    | 0,01                                         | 0,88*<br>(0,39-1,46)    | 0,01                                        | 1,07*<br>(0,96-1,17)    | 0,01                                          |
| <b>% CD32</b>                                               | 98,81<br>(97,17-98,30)  | 96,70<br>(93,87-99,80)                       | 98,11<br>(97,53-98,71)  | 94,10<br>(92,30-96,00)                      | 93,72<br>(92,70-94,25)  | 93,1<br>(91,06-96,60)                         |
| <b>% CD64</b>                                               | 0,58*<br>(0,48-0,70)    | 1,75<br>(1,40-1,93)                          | 0,62<br>(0,13-1,03)     | 0,61<br>(0,20-0,70)                         | 3,36*<br>(2,11-4,65)    | 0,50<br>(0,40-0,68)                           |

Примечание.\* – достоверность различий  $p < 0,05$  по отношению к соответствующему возрастному контролю.

Note. \*, significance of differences  $p < 0.05$  with respect to the corresponding age control.

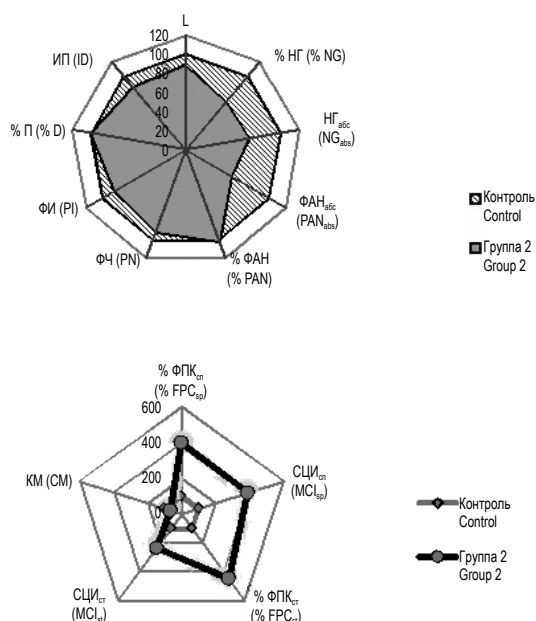


**Рисунок 3. Показатели рецепторной функции нейтрофильных гранулоцитов у детей 4-6 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы)**

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Receptor function indicators of neutrophilic granulocytes in children 4-6 years of age with congenital cleft lip and palate as (as a percentage of the control group)

Note. As for Figure 1.



**Рисунок 4. Показатели фагоцитарной и NADPH-оксидазной микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов у детей 4-6 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы)**

Figure 4. Phagocytic and NADPH oxidase microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in children 4-6 years of age with congenital cleft lip and palate (as a percentage of the control group)

теризующие переваривающую способность НГ, были на уровне контрольных значений (рис. 2). В то же время наблюдалась напряженность NADPH-оксидазной микробицидной активности НГ в спонтанном NBT-тесте ( $\text{СЦИ}_{\text{сп}} = 0,32$  (0,25-0,40), %  $\text{ФПК}_{\text{сп}} = 11,00$  (8,00-13,00) против  $\text{СЦИ}_{\text{сп}} = 0,09$  (0,05-0,12), %  $\text{ФПК}_{\text{сп}} = 2,00$  (1,00-3,00) в контроле). При дополнительной антигенной нагрузке отмечался срыв резервных возможностей НГ, что отразилось в снижении КМ — 0,88 (0,88-1,33) против 2,5 (1,50-3,50) у здоровых детей соответствующей возрастной группы (рис. 2).

Выявленные изменения у детей этой группы характеризуют, с одной стороны, дефектность и напряженность врожденного иммунитета на фоне состояния физиологического воспаления слизистой десен при прорезывании временных зубов, характерного для этого возраста, с другой стороны и, как следствие, формирование неадекватного иммунного ответа, связанного с постоянной вирусной нагрузкой (персистенция респираторных и герпес-вирусов, острые герпетические стоматиты), бактериальной нагрузки, представленной наиболее часто регистрируемыми ассоциациями стрептококков (*Str. viridans*, *Str. pneumoniae*), *Ent. durans*, *Ent. faecium*, *S. epidermidis*, *Haemophilus influenza*, при обилии мягкого зубного налета, грибковые стоматиты, вызванные *Candida albicans*, несмотря на отсутствие острых клинических проявлений заболеваний.

Показано, что у детей исследуемой группы 2 (4-6 лет) общее количество лейкоцитов и НГ имело тенденцию к снижению, но достоверно не отличалось от значений контрольной группы условно здоровых детей, сопоставимой по возрасту ( $p_1 > 0,05$ ;  $p_2 > 0,05$ ). При анализе показателей, характеризующих фенотип НГ, отмечено достоверное увеличение относительного количества НГ, экспрессирующих CD32- и CD14-рецепторы ( $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ), при неизменном уровне  $\text{CD64}^+\text{НГ}$ ,  $\text{CD16}^+\text{НГ}$  по отношению к показателям контроля ( $p_1 > 0,05$ ;  $p_2 > 0,05$ ) (рис. 3, табл. 1).

При этом количество активно работающих НГ (% ФАН, ФАН абс.), способность захвата бактериального антигена (ФЧ и ФИ) и переваривающая активность НГ были в пределах контрольных значений ( $p > 0,05$ ) (рис. 5). Однако выявлена активация спонтанных NADPH-оксидаз с низким ответом на дополнительную антигенную нагрузку (КМ — 1,13 (1,00-1,25) против 1,67 (1,55-2,00) в контроле) (рис. 4).

Анализ показателей, определяющих состояние НГ у детей с ВРГН данной возрастной группы, выявил неадекватно низкий ответ на вирусные инфекции и блокаду — на бактериальные. Для этой группы детей характерны хронические

герпетические стоматиты, разной степени тяжести с афтозными высыпаниями на слизистой оболочке полости рта, катаральным воспалением десен. Появляется сменный прикус (смена временных зубов на постоянные) слизистая десен в состоянии физиологического воспаления, которая является входными воротами для вирусной и бактериальной инфекции. Ухудшается гигиеническое состояние полости рта, активно появляется кариес и осложненный кариес зубов, наличие в полости рта несанируемых зубов увеличивает штаммы микроорганизмов *S. mutans*, *S. aureus*, значительно усиливается колонизация *Str. viridans*, *Str. pneumoniae*, *Ent. Durans*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*. Дети этого возраста с ВГРН болеют детскими инфекциями, которые проявляются воспалением в полости рта (корь, ветряная оспа, скарлатина и т.д.) — эрозиями, афтами, язвами, страдают рецидивирующими бактериальными стоматитами, катаральными и гнойными воспалениями миндалин, ринитами.

Анализ показателей группы 3 детей 7-12 лет позволил выявить следующие закономерности: на фоне тенденции снижения общего количества лейкоцитов выявлено достоверное снижение относительного и абсолютного количества НГ (рис. 5).

При этом отмечено повышение в 6,7 раза уровня  $CD64^+НГ$  до 3,36 (2,11-4,65) % против 0,50 (0,40-0,68) % в контроле, появление  $CD14^+НГ$  в 1,07 (0,96-1,17) % на фоне снижения уровня  $CD16^+НГ$  до 92,10 (91,08-92,00) % против 98,25 (96,84-99,36) % в контроле (рис. 5).

При оценке фагоцитарной активности у детей 3 группы, на фоне снижения абсолютного количества НГ до 2,11 (1,67-3,17) против 4,3 (4,27-4,64) в контроле, выявлено снижение и доли среди них активно фагоцитирующих НГ до 44,0 (42,50-45,50) % против 54,67 (51,00-57,00) %, что особенно показательно при оценке абсолютных показателей  $ΦАН$  ( $0,87$  ( $0,44-1,30$ )  $\times 10^9/л$  против  $2,35$  ( $2,17-4,64$ )  $\times 10^9/л$ ) (рис. 6).

Процессы захвата ( $ΦИ$ ,  $ΦЧ$ ) также имели тенденцию к снижению ( $p_1 > 0,05$ ;  $p_2 > 0,05$ ), а показатели переваривания (% П, ИП) не отличались от контрольных значений. При этом выявлено повышение спонтанной активности NADPH-оксидаз как по %  $ΦПК$  — 4,00 (3,00-5,00) против 1,00 (1,00-1,75) ( $p < 0,05$ ), так и по СЦИ — 0,15 (0,13-0,18) против 0,05 (0,04; 0,11) ( $p < 0,05$ ) в контроле. При дополнительной антигенной нагрузке в NBT-тесте сохранялся резервный микробицидный потенциал НГ — КМ 1,34 (1,26-1,42) (рис. 6). Данные изменения можно оценить как неадекватную реакцию НГ. Синтез *de novo*  $CD14$ , усиление экспрессии  $CD64$  при сниже-

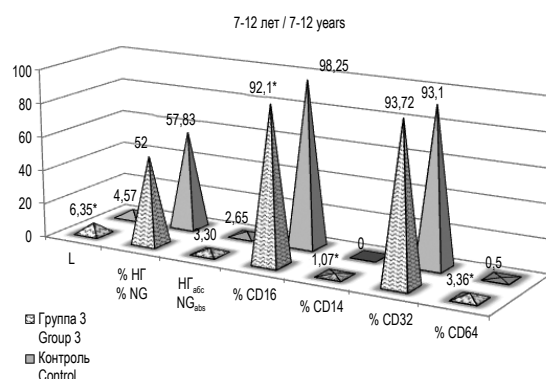


Рисунок 5. Показатели рецепторной функции нейтрофильных гранулоцитов у детей 7-12 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 5. Receptor function indicators of neutrophilic granulocytes in children 7-12 years of age with congenital cleft lip and palate as (as a percentage of the control group)

Note. As for Figure 1.

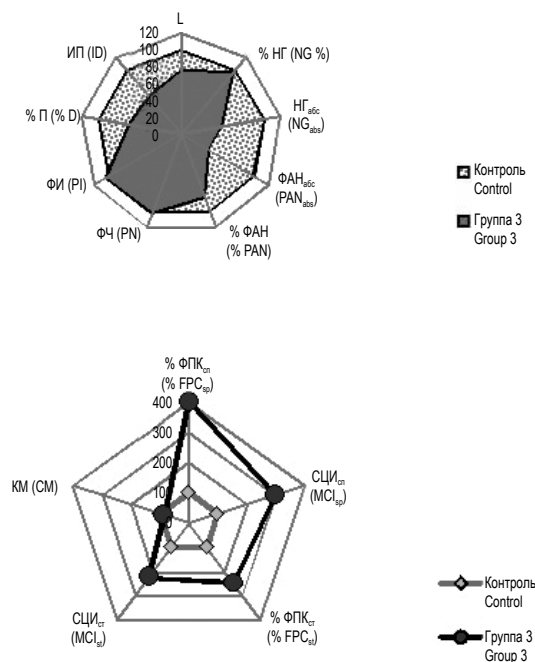


Рисунок 6. Показатели фагоцитарной и NADPH-оксидазной микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов у детей 7-12 лет с врожденной расщелиной губы и неба (в процентах от контрольной группы)

Figure 6. Phagocytic and NADPH oxidase microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in children 7-12 years of age with congenital cleft lip and palate (as a percentage of the control group)

нии экспрессии CD16 демонстрируют фенотип НГ, характерный для наличия инфекции [19]. В 3 группе детей также выявлен неэффективный ответ НГ на постоянную микробную нагрузку, преимущественно бактериальную, так как выявленный количественный дефицит НГ, в том числе активно фагоцитирующих НГ, недостаточен для элиминации патогена. У детей группы 3 увеличивается частота встречаемости микроорганизмов и их видовое разнообразие, кроме обнаруженных в других группах ассоциаций стрептококков, стафилококков появляются в большом количестве *C. krusei* и *C. albicans*, *Ent. durans*, *Kl. pneumoniae*. В этот возрастной период у детей отмечается склонность к пролиферативным и гипертрофическим воспалительным процессам в области десневого сосочка и маргинальной десны (отечно-воспалительные и фиброзные формы гипертрофического гингивита), а также аллергические риниты, аллергические стоматиты.

Таким образом, сравнительный анализ уровня экспрессии рецепторов CD64, CD16, CD32, CD14 НГ в изучаемых группах детей с ВГРН и детей разных возрастных контрольных групп демонстрирует разную оснащенность, предопределяющую несостоятельность фагоцитарной и микробицидной функции НГ во все изучаемые возрастные периоды. Несмотря на появление корецепторных молекул CD14 на НГ, свидетельствующих об активации паттернраспознающих рецепторов TLR2 и TLR4 в целях обеспечения процессов адекватной элиминации микроорганизмов, по всей вероятности, высокая микробная нагрузка и ее увеличение в различных группах

с ВГРН вызывает блокаду взаимодействия CD16-CR3 под действием Mac-1-подобного белка GAS [11], продуцируемого микроорганизмами, в частности стрептококками, что приводит к нарушению передачи сигналов и ингибированию антимикробного ответа НГ.

Обнаружены общие для всех возрастных групп детей с ВГРН дисфункции НГ:

- появление НГ, экспрессирующих CD14-рецепторы, отсутствующие у детей всех трех контрольных групп условно здоровых детей и свидетельствует о высокой вирусной и бактериальной нагрузке на слизистых даже в период отсутствия острых клинических проявлений;

- дефекты фагоцитоза, выраженные в той или иной степени, в первую очередь связанные со снижением количества активно фагоцитирующих НГ, нарушением функций захвата;

- напряженность NADPH-оксидаз с частичной или полной блокадой ответа на дополнительную антигенную нагрузку.

Выявленные особенности нарушений функционирования НГ у детей различных возрастных групп с ВГРН свидетельствуют об их неспособности к реализации адекватной противомикробной защиты, что может приводить к нетипично протекающим вирусно-бактериальным инфекциям и возникновению различных, в том числе гнойных, осложнений в послеоперационном периоде. Очевидна необходимость разработки таргетной иммунотерапии, направленной на восстановление нарушенных функций НГ и включаемой в программу комплексной реабилитации детей с ВГРН.

## Список литературы / References

1. Леонтьев В.К., Воронин В.Ф., Шестаков В.Т. Микрофлора полости рта. М., 2000. 21 с. [Leontyev V.K., Voronin V.F., Shestakov V.T. Microflora of the oral cavity]. Moscow, 2000. 21 p.
2. Митропанова М.Н., Гайворонская Т.В., Любомирская Е.О. Цитокины крови у детей с врожденными расщелинами губы и неба // Кубанский научный медицинский вестник, 2016. № 4 (159). С. 79-82. [Mitropanova M.N., Gaivoronskaya T.V., Lyubomirskaya E.O. Blood cytokines in children with congenital cleft lip and palate. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik* = *Kuban Scientific Medical Journal*, 2016, no. 4 (159), pp. 79-82. (In Russ.)]
3. Мусаходжаева Д.А., Инояттов А.Ш., Якубов Ш.Н. Некоторые показатели иммунной системы детей с врожденной расщелиной губы и неба // Проблемы биологии и медицины, 2011. № 4 (67). С. 33. [Musakhodzhaeva D.A., Inoyatov A.Sh., Yakubov Sh.N. Some indicators of the immune system of children with congenital cleft lip and palate. *Problemy biologii i meditsiny* = *Problems of Biology and Medicine*, 2011, no. 4 (67), p. 33. (In Russ.)]
4. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евлевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм (Часть 1) // Инфекция и иммунитет, 2017. Т. 7, № 3. С. 219-230. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Yevlevsky A.A., Nguyen T.Z.L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1. *Infektsiya i immunitet* = *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 219-230. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.
5. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евлевский 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., Yevlevsky A.A., Nguyen T.Z.L. A 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.

6. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Евглевский А.А. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии (методические рекомендации). Краснодар, 2017. 52 с. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Lomtadze L.V., Kolesnikova N.V., Yevlevsky A.A. Methods for comprehensive assessment of the functional activity of neutrophil granulocytes in health and disease (guidelines)]. Krasnodar, 2017. 52 p.

7. Elghetany M.T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002, Vol. 28, no. 2, pp. 260-274.

8. Fine N., Hassanpour S., Borenstein A., Sima C., Oveisi M., Scholey J., Cherney D., Glogauer M. Distinct Oral neutrophil subsets define health and periodontal disease states. *J. Dent. Res.*, 2016, Vol. 95, no. 8, pp. 931-938.

9. Gao L., Xu, T., Huang G., Jiang S., Gu Y., Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell*, 2018, Vol. 9, no. 5, pp. 488-500.

10. Haziot A.I., Tsuberi B.Z., Goyert S.M.. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 1993, Vol. 150, no. 12, pp. 5556-5565.

11. Hajishengallis G., Lambris J.D. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 3, pp. 187-200.

12. Imler J.L., Hoffmann J.A. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, Vol. 3, pp. 16-22.

13. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2007, no. 297, pp. 353-363.

14. Kurt-Jones E.A., Popova L., Kwinn L., Haynes L.M., Jones L.P., Tripp R.A., Walsh E.E., Freeman M.W., Golenbock D.T., Anderson L.J., Finberg R.W. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.*, 2000, Vol. 1, no. 5, pp. 398-401.

15. McAvoy E.F., McDonald B., Parsons S.A., Wong C.H., Landmann R., Kubers P. The Role of CD14 in neutrophil recruitment within the liver microcirculation during endotoxemia. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 4, pp. 2592-2601.

16. Rodeberg D.A., Morris R.E., Babcock G.F. Azurophilic granules of human neutrophils contain CD14. *Infect. Immun.*, 1997, Vol. 65, pp. 4747-4753.

17. Uriarte S.M., Edmisson J.S., Jimenez-Flores E. Human neutrophils and oral microbiota: a constant tug-of-war between a harmonious and a discordant coexistence. *Immunol. Rev.*, 2016, Vol. 273, no. 1, pp. 282-298.

18. van Spriel A.B., Leusen J.H., van Egmond M., Dijkman H.B., Assmann K.J., Mayadas T.N., van de Winkel J.G. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 8, pp. 2478-2486.

19. Wagner C., Deppisch R., Denefleh B., Hug F., Andrassy K., Hänsch M. Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the Fc receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells. *Shock*, 2003, Vol. 19, pp. 5-12.

---

#### Авторы:

**Митропанова М.Н.** — к.м.н., доцент, заведующая кафедрой детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

#### Authors:

**Mitropanova M.N.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Dentofacial Surgery, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

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

**Ковалева С.В.** — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Nesterova I.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Allergology and Immunology FPM of the Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

**Kovaleva S.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 11.03.2019  
Отправлена на доработку 15.03.2019  
Принята к печати 22.03.2019

Received 11.03.2019  
Revision received 15.03.2019  
Accepted 22.03.2019



## ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНОГО ИММУНИТЕТА У ЖЕНЩИН С ЭНДОМЕТРИОЗОМ И ГЕНИТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Зайнетдинова Л.Ф., Телешева Л.Ф., Коряушкина А.В.,  
Квятковская С.В., Мезенцева Е.А., Никушкина К.В.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения  
РФ, г. Челябинск, Россия

**Резюме.** Наружный генитальный эндометриоз – воспалительное, эстрогензависимое заболевание, которое развивается преимущественно у женщин репродуктивного возраста и характеризуется наличием болевого синдрома и бесплодия. На сегодняшний день эндометриоз является одним из наиболее часто встречающихся гинекологических заболеваний у женщин репродуктивного возраста, однако этиология и патогенез его полностью не ясны. Нарушения системного иммунитета наиболее важны в патогенезе эндометриоза. Данные литературы об особенностях иммунного реагирования при эндометриозе в сочетании с генитальной инфекцией немногочисленны и противоречивы. Цель – изучить особенности системного иммунитета у женщин с наружным генитальным эндометриозом и возбудителями генитальной инфекции.

Было обследовано 159 женщин с наружным генитальным эндометриозом. Исследованы основные субпопуляции лимфоцитов, функциональная активность нейтрофилов и моноцитов периферической крови, содержание цитокинов в сыворотке крови. Исследование системного иммунитета проводили у женщин с 1-2 и 3-4 стадиями эндометриоза, а также в зависимости от наличия возбудителей генитальной инфекции. Наличие *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma genitalium*, *HSV1*, *2/CMV*, *HPV* в эндометрии, перитонеальной жидкости и эндометриоидных гетеротопиях определяли методом ПЦР. Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ статистического анализа IBM SPSS Statistics Version 22.2.

По результатам проведенного исследования установлено, что у женщин с эндометриозом 1-2 стадий наблюдаются признаки системного воспаления с преобладанием Th2-типа иммунного ответа и угнетением клеточного иммунитета. Особенностью при *HPV* было повышение Т-НК-лимфоцитов, снижение IL-2 и функциональной активности нейтрофилов. Наличие *Ureaplasma* spp./*Mycoplasma genitalium* характеризовалось снижением показателей клеточного иммунитета и повышением Т-НК-клеток. Только при *HPV* и *Ureaplasma* spp./*Mycoplasma genitalium* снижался синтез IL-2, IL-6. При 3-4 стадиях наиболее значимые изменения иммунитета установлены в группах женщин с генитальной инфекцией. При *HPV* – высокий уровень IgA, повышение IgM, IL-8. При *Ureaplasma* spp./*Mycoplasma genitalium* – угнетение клеточного иммунитета, высокий уровень IgA, снижение фагоцитарной активности нейтрофилов.

Таким образом, у женщин с эндометриозом при наличии возбудителей генитальной инфекции выявлены особенности, которые могут способствовать развитию и прогрессированию заболевания.

**Ключевые слова:** наружный генитальный эндометриоз, системный иммунитет, вирус папилломы человека высокого онкогенного риска, уреаплазменная инфекция

### Адрес для переписки:

Коряушкина Анна Владимировна  
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.  
Тел.: 8 (908) 047-62-67.  
Факс: 8 (351) 721-82-44.  
E-mail: koryaushkinaanna@yandex.ru

### Address for correspondence:

Koryaushkina Anna V.  
South Ural State Medical University  
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.  
Phone: 8 (908) 047-62-67.  
Fax: 8 (351) 721-82-44.  
E-mail: koryaushkinaanna@yandex.ru

### Образец цитирования:

Л.Ф. Зайнетдинова, Л.Ф. Телешева, А.В. Коряушкина,  
С.В. Квятковская, Е.А. Мезенцева, К.В. Никушкина  
«Особенности системного иммунитета у женщин  
с эндометриозом и генитальной инфекцией»  
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5.  
С. 895-910. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-895-910  
© Зайнетдинова Л.Ф. и соавт., 2019

### For citation:

L.F. Zaynetdinova, L.F. Telesheva, A.V. Koryaushkina,  
S.V. Kvyatkovskaya, E.A. Mezentseva, K.V. Nikushkina  
“Features of system immunity in women with endometriosis  
and genital infection”, Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5,  
pp. 895-910. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-895-910  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-895-910

## FEATURES OF SYSTEM IMMUNITY IN WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS AND GENITAL INFECTION

Zaynetdinova L.F., Telesheva L.F., Koryaushkina A.V.,  
Kvyatkovskaya S.V., Mezentseva E.A., Nikushkina K.V.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Abstract.** External genital endometriosis is an inflammatory, estrogen-dependent disease that develops predominantly in women of reproductive age and is characterized by the presence of pain syndrome and infertility. Today, endometriosis is one of the most common gynecological diseases in women of reproductive age, however, the etiology and pathogenesis of it are not completely clear. Violations of systemic immunity are most important in the pathogenesis of endometriosis. The literature data on the features of the immune response in endometriosis in combination with genital infection are few and contradictory. Purpose – to study the features of systemic immunity in women with external genital endometriosis and pathogens of genital infection.

A total of 159 women with external genital endometriosis were examined. The main lymphocyte subpopulations, the functional activity of neutrophils and peripheral blood monocytes, and the content of cytokines in the blood serum were studied. A study of systemic immunity was performed in women with 1-2 and 3-4 stages of endometriosis, as well as depending on the presence of pathogens of genital infection. The presence of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma genitalium*, *HSV1*, *2/CMV*, *HPV* in the endometrium, peritoneal fluid, and endometrioid heterotopies was determined. Statistical processing was performed using the IBM SPSS Statistics Version 22.2 statistical analysis software package.

According to the results of the study, it was found that women with endometriosis of stages 1-2 show signs of systemic inflammation with a predominance of the Th2 type of immune response and inhibition of cellular immunity. A particular feature of *HPV* was an increase in T-NK lymphocytes, a decrease in IL-2 and neutrophil functional activity. The presence of *Ureaplasma* spp./*Mycoplasma genitalium* was characterized by a decrease in cellular immunity and an increase in T-NK cells. Only with *HPV* and *Ureaplasma* spp./*Mycoplasma genitalium* decreased synthesis of IL-2, IL-6. With 3-4 stages, the most significant changes in immunity were found in groups of women with genital infection. When *HPV* – a high level of IgA, increased IgM, IL-8. With *Ureaplasma* spp./*Mycoplasma genitalium* – inhibition of cellular immunity, high levels of IgA, reduction of neutrophil phagocytic activity.

Thus, in women with endometriosis in the presence of pathogens of genital infection revealed features that may contribute to the development and progression of the disease.

**Keywords:** external genital endometriosis, systemic immunity, human papillomavirus of high oncogenic risk, ureaplasma infection

### Введение

Эндометриоз – воспалительное, эстрогензависимое заболевание, которое развивается преимущественно у женщин репродуктивного возраста и характеризуется наличием болевого синдрома и бесплодия. В последние десятилетия, эндометриоз рассматривают в качестве новой болезни цивилизации [11]. При наружном генитальном эндометриозе (НГЭ) наблюдается имплантация и разрастание эндометриальной ткани вне полости матки. Это сопровождается повышенной продукцией провоспалительных цитокинов, простагландинов, компонентов комплемента, гидролитических ферментов, усилением процессов ангиогенеза, аномалиями эктопического эндометрия и нарушением функции клеточно-опосредованного иммунитета [20]. На сегодняшний день НГЭ является одним из наиболее часто встречающихся гинекологических заболеваний

у женщин репродуктивного возраста, однако этиология и патогенез его полностью не ясны [1, 3, 10, 13, 17, 22, 28]. Было высказано предположение, что внутриматочная инфекция может инициировать развитие эндометриоза путем активации врожденного иммунитета [16]. В научной литературе обсуждается возможное участие вируса папилломы человека при эндометриозе. Oppelt P. и соавт. в очагах эндометриоза находили ВПЧ высокого и среднего канцерогенного риска в 11,3% случаев [23]. По данным Vestergaard A.L. и соавт., ВПЧ был обнаружен в эндометрии у 3% женщин с эндометриозом. При этом в эктопическом эндометрии вирусы не выявлялись [29]. В исследовании Heidarpour M. и соавт. у женщин с эндометриозом яичников ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) был идентифицирован в 26% случаев [15].

Нарушения системного и местного иммунитета наиболее важны в патогенезе эндометриоза [12]. Предположительно, недостаточность клеточного иммунитета при НГЭ обусловлена в основном недостаточностью противовирусного иммунитета и приводит к утрате контроля над персистирующими вирусами и их активации [6]. Данные литературы об особенностях иммунного реагирования при эндометриозе в сочетании с генитальной инфекцией немногочисленны и противоречивы. По данным Л.Н. Луд, в 70% случаев клиническому проявлению эндометриоза предшествует генитальная инфекция, при которой снижается содержание в крови IgA и IgG, но не изменяются показатели клеточного иммунитета [7]. По мнению Н.Ю. Сотниковой и соавт., высокое содержание клеток с фенотипом CD16<sup>+</sup>, выявляемое у женщин с эндометриозом, характерно для инфекционных процессов [9]. В экспериментальном исследовании Khan и соавт. установлена более значительная продукция HGF, VEGF, IL-6, TNF $\alpha$  перитонеальными макрофагами, обработанными липополисахаридами у женщин с эндометриозом [18]. При наличии *Mycoplasma genitalium* у женщин с эндометриозом повышается продукция IFN $\gamma$  и IL-1 $\beta$  [14].

Наличие ВПЧ вызывает изменения в иммунной системе. А.А. Савченко, В.Б. Цхай и др. установили, что у женщин с папилломавирусной инфекцией снижено содержание CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, NK-клеток, повышено количество  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, а также увеличена функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов крови [8]. Активация инфекционными агентами иммунных клеток может усиливать ангиогенез, нейрогенез и лимфоангиогенез, что способствует росту эктопической эндометриальной ткани.

До сегодняшнего времени механизмы первоначального развития и прогрессирования НГЭ окончательно не известны. Остается неясным, имеются ли нарушения иммунитета изначально у женщин с эндометриозом или развиваются при прогрессировании заболевания.

**Цель исследования** — изучить особенности системного иммунитета у женщин с наружным генитальным эндометриозом и возбудителями генитальной инфекции.

## Материалы и методы

За период с 2015 по 2018 г. было обследовано 159 женщин с НГЭ, поступивших в гинекологическое отделение Клиники ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России для проведения оперативного лечения. Были изучены данные анамнеза, проведено физикальное обследование, гинекологический осмотр, УЗИ органов малого таза, клинико-лабораторное исследование. Во всех

случаях диагноз был установлен во время лечебно-диагностической лапароскопии, с обязательным гистологическим подтверждением (материал для гистологического исследования — капсулы эндометриоидных кист яичников, инфильтраты, «малые» формы эндометриоза). Лечебно-диагностическую лапароскопию выполняли под эндотрахеальным наркозом с использованием эндовидеохирургического оборудования фирмы Karl Storz (Германия). Во время операции осматривали органы брюшной полости и малого таза, производили забор перитонеальной жидкости для ПЦР диагностики возбудителей генитальной инфекции. Степень тяжести НГЭ определяли по классификации Американского общества по репродуктивной медицине (R-AFS, 1996) [11]. Оперативное лечение проводилось в пролиферативную фазу менструального цикла. Пайпель-биопсию эндометрия для гистологического исследования и ПЦР диагностики проводили во время лапароскопии.

Забор периферической крови для исследования показателей системного иммунитета производили утром в день операции.

Основные субпопуляции лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии (проточный цитометр FC-500, производитель Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител к поверхностным дифференцировочным антигенам (Beckman Coulter, США).

Функциональную активность нейтрофилов и моноцитов периферической крови изучали по способности клеток к захвату частиц полистерольного латекса по методу И.С. Фрейдлин (1986).

Исследование внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов осуществляли с использованием НСТ-теста в модификации А.Н. Маянского и М.Е. Виксмана (1979). Параллельно с помощью НСТ-теста определяли способность нейтрофилов и моноцитов крови отвечать повышением метаболической активности на стимуляцию частицами латекса.

Лизосомальную активность фагоцитов определяли по числу лизосом и интенсивности люминисценции лизосом в цитоплазме клеток, окрашенных акридиновым оранжевым.

Содержание цитокинов в сыворотке крови определяли с использованием наборов «Цитокин-Стимул-Бест», с помощью автоматического ИФА-анализатора PersonalLab (ADALTIS, Италия). Исследование системного иммунитета проводили у женщин с начальными стадиями и с распространенным инфильтративным НГЭ, а также в зависимости от наличия воз-

будителей генитальной инфекции в эндометрии, перитонеальной жидкости и эндометриоидных гетеротопиях.

Экстракция ДНК из клинического материала осуществлялась с помощью наборов «ДНК-сорб-АМ» и «ДНК-сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификационная часть исследования проводилась с помощью тест-систем «АмплиСенс® C. trachomatis/Ureaplasma/M. Genitalium – МУЛЬТИПРАЙМ-FL», «АмплиСенс® HSV/CMV – МУЛЬТИПРАЙМ-FL», «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) на детектирующих амплификаторах ДТ-96 (НПФ «ДНК-технология», Россия) и Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Австралия) в режиме реального времени.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета программ прикладного статистического анализа IBM SPSS Statistics 22.2. Для оценки достоверности полученных значений применяли непараметрические методы статистического анализа с расчетом медианы, минимальной и максимальной величины. Различия показателей определяли с помощью критерия Манна–Уитни и признавали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Критерии включения в исследование: информированное согласие пациентки, оформленное в письменном виде, наружный генитальный эндометриоз, подтвержденный гистологическим исследованием операционного материала, репродуктивный возраст пациенток (18–45 лет), наличие возбудителей генитальной инфекции.

Критерии исключения: отказ от участия в исследовании, беременность, тяжелая соматическая патология в стадии суб- и декомпенсации, онкологические заболевания, наличие инфекционных заболеваний, туберкулез, ВИЧ-инфекция, воспалительные заболевания в стадии обострения.

## Результаты

Средний возраст обследованных пациенток в основной группе составил  $31,23 \pm 0,42$  года: с 1–2 стадиями –  $31,16 \pm 0,6$  год, с 3–4 стадиями –  $31,28 \pm 0,59$  года. В группе контроля средний возраст женщин был  $30,79 \pm 1,54$  лет. Достоверных отличий между группами не было.

У женщин с 1–2 стадиями НГЭ в исследуемом материале микроорганизмы были выделены в 27 (39,1%) случаях, с 3–4 стадией – в 46 (51,1%) случаях. Данные представлены в таблице 1.

Наиболее часто среди изучаемых микроорганизмов были обнаружены ВПЧ ВКР и уреаплазмы.

Для проведения анализа иммунологических показателей среди пациенток с 1–2 стадиями НГЭ было выделено 3 группы: 1 группа – пациентки с НГЭ, у которых не выделены возбудители генитальной инфекции ( $n = 16$ ), 2 группа – пациентки с НГЭ и ВПЧ ВКР ( $n = 13$ ), 3 группа – пациентки с НГЭ и уреаплазменной инфекцией ( $n = 13$ ); контрольную группу составили здоровые женщины репродуктивного возраста – 4 группа ( $n = 14$ ).

Во всех исследуемых группах уровень лейкоцитов периферической крови достоверно не отличался. При сравнении с контрольной группой у пациенток 1 группы показатели клеточного иммунитета характеризовались снижением абсолютного количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD19^-$ ) и Т-лимфоцитов ранней активации ( $CD3^+CD25^+$ ). Во 2 группе наблюдалось повышение относительного количества Т-NK-лимфоцитов ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ). В 3 группе выявлено повышение абсолютного ( $p = 0,026$ ) и относительного ( $p = 0,006$ ) количества Т-NK-лимфоцитов ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ).

Сравнительный анализ результатов исследования у пациенток 2, 3 групп с результатами в 1 группе показал при ВПЧ ВКР повышение относительного количества Т-NK-лимфоцитов ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ), а при уреаплазменной инфекции – повышение относительного количества лимфоцитов, абсолютного количества Т-лимфоцитов ранней активации ( $CD3^+CD25^+$ ) (табл. 2).

При изучении гуморального иммунитета у женщин с 1–2 стадиями НГЭ в сравнении с группой контроля выявлено повышение IgA во всех группах (1 группа –  $p = 0,022$ , 2 группа –  $p < 0,001$ , 3 группа –  $p = 0,027$ ).

Сравнительный анализ результатов исследования между пациентками с НГЭ отличий не выявил (табл. 2).

Функциональное состояние нейтрофилов сыворотки крови изменялось при наличии ВПЧ ВКР в сравнении с контрольной группой: наблюдалось снижение лизосомальной активности нейтрофилов.

Сравнительный анализ результатов исследования между группами пациенток с 1–2 стадиями НГЭ отличий не показал (табл. 2).

При оценке цитокинового статуса пациенток с 1–2 стадиями НГЭ по сравнению с контролем в 1 группе выявлено повышение уровня IL-4, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ , во 2-й группе – снижение IL-2, IL-6 и повышение IL-4, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , в 3 группе – снижение IL-2 и повышение TNF $\alpha$ .

Сравнительный анализ результатов исследования между пациентками с 1–2 стадиями НГЭ выявил значительно более низкий уровень IL-6

в сыворотке крови при наличии ВПЧ ВКР при сравнении с результатами в 1 группе (табл. 2).

Для анализа иммунологических показателей у пациенток с распространенным эндометриозом (3-4 стадии) также были сформированы группы: 1а группа — пациентки с 3-4 стадиями НГЭ, у которых не выделены возбудители генитальной инфекции (n = 25), 2а группа — пациентки с 3-4 стадиями НГЭ и ВПЧ ВКР (n = 22), 3а группа — пациентки с 3-4 стадиями НГЭ и уреамикоплазменной инфекцией (n = 27).

У пациенток 1а группы при сравнении с контрольной группой состояние клеточного иммунитета достоверно не изменялось. У пациенток 2а группы выявлено снижение относительного количества лимфоцитов, повышение Т-НК-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). Данные представлены в таблице 3.

У пациенток 3а группы было снижено абсолютное и относительное количество лимфоцитов, абсолютное количество Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и Т-цитотоксических (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) (табл. 3).

Функциональная активность нейтрофилов периферической крови у пациенток с 3-4 стадиями НГЭ в сравнении с контролем не отличалась.

При межгрупповом анализе результатов у женщин с 3-4 стадиями НГЭ установлено в 3а группе при сравнении с 1а группой повышение НСТ спонтанной и индуцированной интенсивности нейтрофилов, а также снижение фагоцитарной активности и фагоцитарного числа нейтрофилов периферической крови (табл. 3).

При оценке гуморального иммунитета по сравнению с контролем в 1а группе достоверных отличий не обнаружено. Во 2а и 3а группах наблюдалось повышение IgA.

При сравнительном анализе групп пациенток с 3-4 стадиями НГЭ установлено повышение

IgM и снижение C5-компонента комплемента у пациенток с ВПЧ ВКР в сравнении с результатами в 1а группе (табл. 3).

Уровень изучаемых цитокинов в сыворотке крови у женщин с 3-4 стадиями НГЭ изменялся. При сравнении с контролем в 1а группе установлено снижение IL-2, IFN $\alpha$  и повышение IL-4, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ . Во 2а группе наблюдалось повышение IL-4, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ . В 3а группе наблюдалось снижение IL-2, повышение IL-4, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ . При сравнении результатов среди пациенток с 3-4 стадиями НГЭ выявлено более значительное снижение IL-6 и повышение IL-8, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  во 2а группе в сравнении с 1а группой, а в 3а группе — более низкий уровень IL-6 и более высокий IL-8 в сравнении с 1а группой (табл. 3).

## Обсуждение

Наиболее важными в патогенезе эндометриоза являются нарушения гормонального и иммунного гомеостаза [12]. Известно, что НГЭ развивается на фоне Т-клеточного иммунодефицита при одновременной активации В-лимфоцитарной системы и снижении функции НК-клеток [26]. Состояние системного иммунитета у женщин с 1-2 стадиями НГЭ, у которых мы не выявили возбудителей генитальной инфекции, характеризовалось недостаточностью клеточного звена за счет снижения абсолютного количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-лимфоцитов ранней активации. Полученные результаты подтверждают данные литературы [2, 19, 26]. Особенностью клеточного иммунитета при наличии у женщин с 1-2 стадиями НГЭ ВПЧ ВКР было перераспределение лимфоцитов с повышением относительного количества Т-НК-клеток, участвующих в реализации противовирусного и противоопухолевого иммунитета. На фоне уреамикоплаз-

**ТАБЛИЦА 1. ВОЗБУДИТЕЛИ ГЕНИТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ ПРИ ПЦР-ДИАГНОСТИКЕ ИЗ ОБСЛЕДОВАННЫХ ПОКАЛИЗАЦИЙ**

TABLE 1. CAUSATIVE AGENTS OF GENITAL INFECTION IDENTIFIED BY PCR DIAGNOSIS OF THE EXAMINED SITES

| Возбудители генитальной инфекции<br>Causative agents of genital infection                                    | 1-2 стадии НГЭ<br>1-2 stages<br>of endometriosis<br>n = 69 | 3-4 стадии НГЭ<br>3-4 stages<br>of endometriosis<br>n = 90 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
|                                                                                                              | n (%)                                                      | n (%)                                                      |
| <b>Возбудители генитальной инфекции обнаружены (всего)</b><br>Causative agents of genital infection detected | 27,0 (39,1%)                                               | 46,0 (51,1%)                                               |
| <i>Chlamydia trachomatis</i>                                                                                 | —                                                          | 2,0 (2,2%)                                                 |
| <i>Ureaplasma/Mycoplasma</i> spp.                                                                            | 16,0 (23,2%)                                               | 27,0 (30,0%)                                               |
| HPV ВКР                                                                                                      | 13,0 (18,8%)                                               | 22,0 (24,4%)                                               |
| HSV-1, 2                                                                                                     | 3,0 (4,3%)                                                 | 3,0 (3,3%)                                                 |
| CMV                                                                                                          | 11,0 (15,9%)                                               | 13,0 (14,4%)                                               |

ТАБЛИЦА 2. СИСТЕМНЫЙ ИММУНИТЕТ У ЖЕНЩИН С 1-2 СТАДИЯМИ НАРУЖНОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

TABLE 2. SYSTEMIC IMMUNITY IN WOMEN WITH 1-2 STAGES OF EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

| Показатели периферической крови<br>Peripheral blood indicators                                      | 1 группа<br>Пациентки с 1-2 стадиями эндометриоза, у которых возбудители генитальной инфекции не выделены<br>1 group<br>Patients with 1-2 stages of endometriosis, in which the causative agents of genital infection are not isolated<br>n = 16 | 2 группа<br>Пациентки с 1-2 стадиями эндометриоза и ВПЧ ВКР<br>2 group<br>Patients with stage 1-2 endometriosis and HPV<br>n = 13 | 3 группа<br>Пациентки с 1-2 стадиями эндометриоза и <i>Ureaplasma spp./Mycoplasma genitalium</i><br>3 group<br>Patients with 1-2 stages of endometriosis and <i>Ureaplasma spp./Mycoplasma genitalium</i><br>n = 13 | 4 группа<br>Контрольная группа здоровых женщин<br>4 group<br>Control group of healthy women<br>n = 11 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Количество лейкоцитов, × 10 <sup>9</sup> /л<br>Number of leukocytes, × 10 <sup>9</sup> /l           | 6,2<br>(4,90-7,75)                                                                                                                                                                                                                               | 7,2<br>(6,3-9,0)                                                                                                                  | 7,4<br>(6,65-15,60)                                                                                                                                                                                                 | 6,8<br>(6,0-10,1)                                                                                     |
| Количество лимфоцитов, × 10 <sup>9</sup> /л<br>Number of lymphocytes, × 10 <sup>9</sup> /l          | 1,9*<br>(1,325-2,575)<br>p <sup>1/к</sup> = 0,020                                                                                                                                                                                                | 2,5<br>(1,95-3,45)                                                                                                                | 2,7<br>(2,3-3,2)                                                                                                                                                                                                    | 2,7*<br>(2,2-3,6)<br>p <sup>1/к</sup> = 0,020                                                         |
| Количество лимфоцитов, %<br>Number of lymphocytes, %                                                | 27,9<br>(20,80-37,65)                                                                                                                                                                                                                            | 36,5<br>(22,000-47,150)                                                                                                           | 36,2*<br>(22,40-46,95)<br>p <sup>3/к</sup> = 0,012                                                                                                                                                                  | 40,5*<br>(33,0-46,8)<br>p <sup>3/к</sup> = 0,012                                                      |
| CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l                   | 1543*<br>(1174,75-2120,00)<br>p <sup>1/к</sup> = 0,044                                                                                                                                                                                           | 1735<br>(1553-2401)                                                                                                               | 1869,5<br>(1636,5-2145,0)                                                                                                                                                                                           | 2204*<br>(1655-2637)<br>p <sup>1/к</sup> = 0,044                                                      |
| CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , %                                                              | 76,505<br>(69,3950-80,4125)                                                                                                                                                                                                                      | 75,6<br>(68,3-80,6)                                                                                                               | 70,1<br>(61,35-77,75)                                                                                                                                                                                               | 73,8<br>(72,30-81,25)                                                                                 |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l                    | 834,5<br>(592,00-1324,75)                                                                                                                                                                                                                        | 1027<br>(863,5-1309,0)                                                                                                            | 939<br>(785,0-1293,5)                                                                                                                                                                                               | 1051<br>(954-1721)                                                                                    |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %                                                               | 43,49<br>(35,51-50,74)                                                                                                                                                                                                                           | 43,7<br>(39,46-50,95)                                                                                                             | 39,6***<br>(31,500-43,495)<br>p <sup>1-2/3-4</sup> = 0,023                                                                                                                                                          | 41,43<br>(39,25-47,87)                                                                                |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l                    | 529,1<br>(327,25-731,25)                                                                                                                                                                                                                         | 550<br>(450-740)                                                                                                                  | 665<br>(489,0-754,5)                                                                                                                                                                                                | 788<br>(574-957)                                                                                      |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %                                                               | 23,95<br>(19,300-32,325)                                                                                                                                                                                                                         | 23<br>(17,1-27,3)                                                                                                                 | 21,7<br>(18,850-27,225)                                                                                                                                                                                             | 25,6<br>(21,92-32,18)                                                                                 |
| CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l                   | 173,5<br>(89,00-258,25)                                                                                                                                                                                                                          | 242<br>(201-329)                                                                                                                  | 197<br>(156-291)                                                                                                                                                                                                    | 202<br>(146-297)                                                                                      |
| CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , %                                                              | 7,595<br>(6,38-6,68)                                                                                                                                                                                                                             | 8,7<br>(7,05-12,15)                                                                                                               | 7<br>(6,785-8,800)                                                                                                                                                                                                  | 7,65<br>(7,05-9,17)                                                                                   |
| CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>                                                                  | 1,75<br>(1,28-2,20)                                                                                                                                                                                                                              | 1,8<br>(1,58-2,90)                                                                                                                | 1,6<br>(1,250-2,275)                                                                                                                                                                                                | 1,79<br>(1,51-2,18)                                                                                   |
| CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l | 74,5<br>(44,00-159,25)                                                                                                                                                                                                                           | 163<br>(63,5-230,5)                                                                                                               | 179* ***<br>(120,5-244,0)<br>p <sup>3/к</sup> = 0,026<br>p <sup>1-2/3-4</sup> = 0,005                                                                                                                               | 75*<br>(41-104)<br>p <sup>3/к</sup> = 0,026                                                           |

Таблица 2 (продолжение)  
Table 2 (continued)

| Показатели<br>периферической<br>крови<br>Peripheral blood<br>indicators                                | 1 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза,<br>у которых<br>возбудители<br>генитальной<br>инфекции<br>не выделены<br>1 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis, in<br>which the causative<br>agents of genital<br>infection are not<br>isolated<br>n = 16 | 2 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза<br>и ВПЧ ВКР<br>2 group<br>Patients with stage<br>1-2 endometriosis<br>and HPV<br>n = 13 | 3 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза<br>и <i>Ureaplasma</i> spp./<br><i>Mycoplasma</i><br><i>genitalium</i><br>3 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis and<br><i>Ureaplasma</i> spp./<br><i>Mycoplasma</i><br><i>genitalium</i><br>n = 13 | 4 группа<br>Контрольная<br>группа здоровых<br>женщин<br>4 group<br>Control group of<br>healthy women<br>n = 11 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> , %                                               | 3,175**<br>(2,025-5,093)<br>p <sup>1/2</sup> = 0,038                                                                                                                                                                                                                                    | 5,78***<br>(3,35-7,45)<br>p <sup>2/к</sup> = 0,006<br>p <sup>1/2</sup> = 0,038                                                                   | 5,64*<br>(3,375-9,250)<br>p <sup>3/к</sup> = 0,006<br>p <sup>1-2/3-4</sup> = 0,006                                                                                                                                                                                              | 2,45*<br>(0,96-4,60)<br>p <sup>2/к</sup> = 0,006<br>p <sup>3/к</sup> = 0,006                                   |
| CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ,<br>× 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l | 149<br>(106,25-304,25)                                                                                                                                                                                                                                                                  | 198<br>(88-695)                                                                                                                                  | 430<br>(126-749)                                                                                                                                                                                                                                                                | 333<br>(111-402)                                                                                               |
| CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> , %                                               | 8,195<br>(6,145-13,535)                                                                                                                                                                                                                                                                 | 8,6<br>(3,950-20,755)                                                                                                                            | 16,3<br>(6,09-22,60)                                                                                                                                                                                                                                                            | 10,89<br>(3,01-15,80)                                                                                          |
| CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l                      | 27,5***<br>(12,25-78,50)<br>p <sup>1/к</sup> = 0,030<br>p <sup>1/3</sup> = 0,026                                                                                                                                                                                                        | 57,5<br>(30,5-87,5)                                                                                                                              | 64**<br>(30-122)<br>p <sup>1/3</sup> = 0,026                                                                                                                                                                                                                                    | 49,5*<br>(43,00-161,75)<br>p <sup>1/к</sup> = 0,030                                                            |
| CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , %                                                                 | 1,535<br>(0,750-3,458)                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1,95<br>(1,5-3,8)                                                                                                                                | 3,16<br>(1,070-5,585)                                                                                                                                                                                                                                                           | 2,19<br>(1,575-5,240)                                                                                          |
| CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l                    | 24<br>(10,00-48,25)                                                                                                                                                                                                                                                                     | 30,5<br>(18,0-64,5)                                                                                                                              | 41<br>(20,5-94,5)                                                                                                                                                                                                                                                               | 37,5<br>(20,00-81,75)                                                                                          |
| CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %                                                               | 1,09<br>(0,625-1,690)                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1,5<br>(0,845-1,880)                                                                                                                             | 1,4<br>(1,0-2,9)                                                                                                                                                                                                                                                                | 1,385<br>(0,8325-2,6675)                                                                                       |
| ЦИК, у. е.<br>Circulating immune<br>complexes, c. u.                                                   | 77,5<br>(70,5-106,5)                                                                                                                                                                                                                                                                    | 90<br>(74-117)                                                                                                                                   | 96<br>(77,75-131,00)                                                                                                                                                                                                                                                            | 126<br>(48,75-170,75)                                                                                          |
| IgA, г/л<br>g/l                                                                                        | 1,99*<br>(1,63-4,15)<br>p <sup>1/к</sup> = 0,022                                                                                                                                                                                                                                        | 2,78*<br>(2,19-3,46)<br>p <sup>2/к</sup> < 0,001                                                                                                 | 3,41*<br>(1,50-4,98)<br>p <sup>3/к</sup> = 0,027                                                                                                                                                                                                                                | 1,43*<br>(1,23-1,95)<br>p <sup>1/к</sup> = 0,022<br>p <sup>2/к</sup> < 0,001<br>p <sup>3/к</sup> = 0,027       |
| IgM, г/л<br>g/l                                                                                        | 1,87<br>(1,595-2,585)                                                                                                                                                                                                                                                                   | 2,52<br>(1,68-3,17)                                                                                                                              | 2,04<br>(1,78-3,67)                                                                                                                                                                                                                                                             | 1,74<br>(1,22-2,73)                                                                                            |
| IgG, г/л<br>g/l                                                                                        | 16,7<br>(14,725-17,880)                                                                                                                                                                                                                                                                 | 11,47<br>(9,58-16,40)                                                                                                                            | 16,82<br>(15,61-17,40)                                                                                                                                                                                                                                                          | 12,59<br>(8,99-18,47)                                                                                          |
| С3-компонент<br>комплемента, г/л<br>C3 complement<br>component, g/l                                    | 0,845<br>(0,73-0,96)                                                                                                                                                                                                                                                                    | 0,775<br>(0,64-0,97)                                                                                                                             | 0,83<br>(0,74-0,96)                                                                                                                                                                                                                                                             | 0,845<br>(0,76-0,96)                                                                                           |
| С5-компонент<br>комплемента, г/л<br>C5 complement<br>component, g/l                                    | 0,101<br>(0,0810-0,1165)                                                                                                                                                                                                                                                                | 0,081<br>(0,070-0,102)                                                                                                                           | 0,091<br>(0,081-0,131)                                                                                                                                                                                                                                                          | 0,085<br>(0,073-0,098)                                                                                         |

Таблица 2 (продолжение)  
Table 2 (continued)

| Показатели<br>периферической<br>крови<br>Peripheral blood<br>indicators                          | 1 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза,<br>у которых<br>возбудители<br>генитальной<br>инфекции<br>не выделены<br>1 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis, in<br>which the causative<br>agents of genital<br>infection are not<br>isolated<br>n = 16 | 2 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза<br>и ВПЧ ВКР<br>2 group<br>Patients with stage<br>1-2 endometriosis<br>and HPV<br>n = 13 | 3 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза<br>и <i>Ureaplasma</i> spp./<br><i>Mycoplasma</i><br><i>genitalium</i><br>3 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis and<br><i>Ureaplasma</i> spp./<br><i>Mycoplasma</i><br><i>genitalium</i><br>n = 13 | 4 группа<br>Контрольная<br>группа здоровых<br>женщин<br>4 group<br>Control group of<br>healthy women<br>n = 11 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$<br>Neutrophils, $\times 10^9/\text{l}$                        | 5,25<br>(2,65-6,75)                                                                                                                                                                                                                                                                     | 4,33<br>(3,50-6,95)                                                                                                                              | 5,15<br>(4,35-7,18)                                                                                                                                                                                                                                                             | 5,45<br>(4,025-6,450)                                                                                          |
| Нейтрофилы, %<br>Neutrophils, %                                                                  | 79,5**<br>(75,75-81,00)<br>$p^{1/3} = 0,030$                                                                                                                                                                                                                                            | 71,5<br>(64,25-75,25)                                                                                                                            | 74**<br>(61,75-77,75)<br>$p^{1/3} = 0,030$                                                                                                                                                                                                                                      | 77,5<br>(69,25-79,50)                                                                                          |
| Лизосомальная<br>активность<br>нейтрофилов, у. е.<br>Lysosomal activity of<br>neutrophils, c. u. | 280<br>(212-359)                                                                                                                                                                                                                                                                        | 263*<br>(143,50-313,25)<br>$p^{2/\kappa} = 0,043$                                                                                                | 280<br>(256-305)                                                                                                                                                                                                                                                                | 334,5*<br>(217,25-411,50)<br>$p^{2/\kappa} = 0,043$                                                            |
| НВТ-тест<br>спонтанный, %<br>NST test<br>spontaneous, %                                          | 20,5<br>(14-47)                                                                                                                                                                                                                                                                         | 19,5<br>(13,5-30,0)                                                                                                                              | 22<br>(13,5-26,0)                                                                                                                                                                                                                                                               | 25<br>(17,0-39,5)                                                                                              |
| НВТ-тест<br>спонтанный, у. е.<br>NST test<br>spontaneous, c. u.                                  | 0,28<br>(0,18-0,85)                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0,31<br>(0,225-0,510)                                                                                                                            | 0,38<br>(0,18-0,54)                                                                                                                                                                                                                                                             | 0,44<br>(0,21-0,83)                                                                                            |
| НВТ-тест<br>индуцированный, %<br>NST test induced, %                                             | 28<br>(24-44)                                                                                                                                                                                                                                                                           | 26<br>(11,5-35,0)                                                                                                                                | 28<br>(10,5-42,0)                                                                                                                                                                                                                                                               | 26<br>(22-49)                                                                                                  |
| НВТ-тест<br>индуцированный, у. е.<br>NST-test induced, c. u.                                     | 0,44<br>(0,365-0,735)                                                                                                                                                                                                                                                                   | 0,42<br>(0,140-0,655)                                                                                                                            | 0,45<br>(0,14-0,63)                                                                                                                                                                                                                                                             | 0,4<br>(0,335-0,855)                                                                                           |
| Фагоцитарная<br>активность<br>нейтрофилов, %<br>Phagocytic activity of<br>neutrophils, %         | 40<br>(32,5-48,5)                                                                                                                                                                                                                                                                       | 47<br>(38-57)                                                                                                                                    | 47<br>(34,5-56,0)                                                                                                                                                                                                                                                               | 39<br>(23,5-58,5)                                                                                              |
| Фагоцитарное число,<br>у. е.<br>Phagocytic number, c. u.                                         | 3,1<br>(2,20-3,38)                                                                                                                                                                                                                                                                      | 3,4<br>(2,18-4,30)                                                                                                                               | 2,32<br>(1,8-4,1)                                                                                                                                                                                                                                                               | 2,9<br>(2,65-4,40)                                                                                             |
| Интенсивность<br>фагоцитоза, у. е.<br>Intensity<br>of phagocytosis, c. u.                        | 1,25<br>(0,80-1,71)                                                                                                                                                                                                                                                                     | 1,65<br>(0,84-2,58)                                                                                                                              | 0,9<br>(0,63-2,23)                                                                                                                                                                                                                                                              | 1,29<br>(0,655-2,520)                                                                                          |
| IL-2, пг/мл<br>pg/ml                                                                             | 11,48<br>(11,01-12,81)<br>$p^{1-2/3-4} = 0,029$                                                                                                                                                                                                                                         | 11,2*<br>(7,87-11,61)<br>$p^{2/\kappa} = 0,007$                                                                                                  | 10,94*<br>(5,60-12,25)<br>$p^{3/\kappa} = 0,031$                                                                                                                                                                                                                                | 12,01*<br>(11,47-13,09)<br>$p^{2/\kappa} = 0,007$<br>$p^{3/\kappa} = 0,031$                                    |



Таблица 2 (окончание)  
Table 2 (continued)

| Показатели<br>периферической<br>крови<br>Peripheral blood<br>indicators | 1 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза,<br>у которых<br>возбудители<br>генитальной<br>инфекции<br>не выделены<br>1 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis, in<br>which the causative<br>agents of genital<br>infection are not<br>isolated<br>n = 16 | 2 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза<br>и ВПЧ ВКР<br>2 group<br>Patients with stage<br>1-2 endometriosis<br>and HPV<br>n = 13 | 3 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза<br>и <i>Ureaplasma</i> spp./<br><i>Mycoplasma</i><br><i>genitalium</i><br>3 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis and<br><i>Ureaplasma</i> spp./<br><i>Mycoplasma</i><br><i>genitalium</i><br>n = 13 | 4 группа<br>Контрольная<br>группа здоровых<br>женщин<br>4 group<br>Control group of<br>healthy women<br>n = 11 |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IL-4, пг/мл<br>pg/ml                                                    | 3,72*<br>(3,53-4,10)<br>$p^{1/k} = 0,006$                                                                                                                                                                                                                                               | 3,69*<br>(3,43-3,94)<br>$p^{2/k} = 0,017$                                                                                                        | 3,88<br>(3,10-4,24)                                                                                                                                                                                                                                                             | 3,33*<br>(3,28-3,41)<br>$p^{1/k} = 0,006$<br>$p^{2/k} = 0,017$                                                 |
| IL-6, пг/мл<br>pg/ml                                                    | 5,41**<br>(4,36-69,40)<br>$p^{1/2} = 0,016$                                                                                                                                                                                                                                             | 3,55***<br>(2,66-3,63)<br>$p^{2/k} = 0,003$<br>$p^{1/2} = 0,016$                                                                                 | 5,13***<br>(1,49-53,00)<br>$p^{1-2/3-4} = 0,027$                                                                                                                                                                                                                                | 4,77*<br>(4,41-18,97)<br>$p^{2/k} = 0,003$                                                                     |
| IL-8, пг/мл<br>pg/ml                                                    | 72,02<br>(29,99-344,58)                                                                                                                                                                                                                                                                 | 88,46<br>(45,03-410,62)                                                                                                                          | 226,1***<br>(1,94-272,90)<br>$p^{1-2/3-4} = 0,005$                                                                                                                                                                                                                              | 81,54<br>(34,90-114,63)                                                                                        |
| IL-10, пг/мл<br>pg/ml                                                   | 8<br>(3,00-25,72)                                                                                                                                                                                                                                                                       | 4,34<br>(3,69-4,56)                                                                                                                              | 3,48<br>(2,28-36,75)                                                                                                                                                                                                                                                            | 3,48<br>(2,88-8,95)                                                                                            |
| IL-12, пг/мл<br>pg/ml                                                   | 2,81<br>(1,99-3,07)                                                                                                                                                                                                                                                                     | 2,5<br>(2,37-2,76)                                                                                                                               | 2,68<br>(2,49-3,21)                                                                                                                                                                                                                                                             | 2,5<br>(2,34-3,13)                                                                                             |
| TNF $\alpha$ , пг/мл<br>pg/ml                                           | 2,47***<br>(2,32-3,17)<br>$p^{1/k} = 0,017$<br>$p^{1-2/3-4} = 0,008$                                                                                                                                                                                                                    | 2,68*<br>(2,39-3,31)<br>$p^{2/k} = 0,017$                                                                                                        | 2,96*<br>(2,33-3,10)<br>$p^{3/k} = 0,003$                                                                                                                                                                                                                                       | 2,18*<br>(1,90-2,38)<br>$p^{1/k} = 0,017$<br>$p^{2/k} = 0,017$<br>$p^{3/k} = 0,003$                            |
| IFN $\alpha$ , пг/мл<br>pg/ml                                           | 16,96<br>(14,64-18,48)                                                                                                                                                                                                                                                                  | 16,07<br>(15,71-18,04)                                                                                                                           | 12,86<br>(11,16-16,96)                                                                                                                                                                                                                                                          | 16,25<br>(15,71-17,86)                                                                                         |
| IFN $\gamma$ , пг/мл<br>pg/ml                                           | 6,48*<br>(5,28-26,02)<br>$p^{1/k} = 0,017$                                                                                                                                                                                                                                              | 8,87***<br>(6,13-9,01)<br>$p^{2/k} = 0,017$<br>$p^{1-2/3-4} = 0,038$                                                                             | 9,58<br>(1,97-121,27)                                                                                                                                                                                                                                                           | 5,49*<br>(4,29-5,70)<br>$p^{1/k} = 0,017$<br>$p^{2/k} = 0,017$                                                 |

Примечание. \* p – сравнение между группами с перитонеальным эндометриозом и контрольной группой; \*\* p – сравнение между группой без генитальной инфекции и группами с инфекцией; \*\*\* p – сравнение между 1-2 и 3-4 стадиями наружного генитального эндометриоза.

Note. \*, p, comparison between groups with peritoneal endometriosis and the control group; \*\*, p, comparison between a group without genital infection and groups with infection; \*\*\*, p, comparison between 1-2 and 3-4 stages of external genital endometriosis.

менной инфекции снижалось относительное количество лимфоцитов и, как при ВПЧ ВКР, наблюдалось увеличение Т-НК-клеток.

Ранее проведенными исследованиями Е.В. Еньковой, К.Х. Стрыгиной установлено, что содержание нейтрофилов в периферической крови не изменяется у пациенток с эндометри-

озом, но нарушается фагоцитарная способность нейтрофилов [4]. В нашем исследовании не установлено изменения количества и функциональной активности нейтрофилов сыворотки крови у женщин с 1-2 стадиями НГЭ при отсутствии возбудителей генитальной инфекции. Однако при наличии ВПЧ ВКР наблюдалось снижение

ТАБЛИЦА 3. СИСТЕМНЫЙ ИММУНИТЕТ У ЖЕНЩИН С 3-4 СТАДИЯМИ НАРУЖНОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

TABLE 3. SYSTEMIC IMMUNITY IN WOMEN WITH 3-4 STAGES OF EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

| Показатели периферической крови<br>Peripheral blood indicators                            | 1 группа<br>Пациентки с 1-2 стадиями эндометриоза, у которых возбудители генитальной инфекции не выделены<br>1 group<br>Patients with 1-2 stages of endometriosis, in which the causative agents of genital infection are not isolated<br>n = 25 | 2 группа<br>Пациентки с 1-2 стадиями эндометриоза и ВПЧ ВКР<br>2 group<br>Patients with 1-2 stages of endometriosis and HPV<br>n = 22 | 3 группа<br>Пациентки с 1-2 стадиями эндометриоза и <i>Ureaplasma spp./Mycoplasma genitalium</i><br>3 group<br>Patients with 1-2 stages of endometriosis and <i>Ureaplasma spp./Mycoplasma genitalium</i><br>n = 27 | 4 группа<br>Контрольная группа здоровых женщин<br>4 group<br>Control group of healthy women<br>n = 11 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Количество лейкоцитов, × 10 <sup>9</sup> /л<br>Number of leukocytes, × 10 <sup>9</sup> /l | 8,8<br>(5,95-9,85)                                                                                                                                                                                                                               | 9,15<br>(6,55-12,85)                                                                                                                  | 6,9<br>(6,2-10,4)                                                                                                                                                                                                   | 6,8<br>(6,0-10,1)                                                                                     |
| Количество лимфоцитов × 10 <sup>9</sup> /л<br>Number of lymphocytes, × 10 <sup>9</sup> /l | 2,2<br>(1,65-3,40)                                                                                                                                                                                                                               | 2,8*<br>(1,550-3,465)<br>p <sup>2a/k</sup> = 0,005                                                                                    | 2,15*<br>(1,500-2,625)<br>p <sup>3a/k</sup> = 0,021                                                                                                                                                                 | 2,7*<br>(2,2-3,6)<br>p <sup>2a/k</sup> = 0,005<br>p <sup>3a/k</sup> = 0,021                           |
| Количество лимфоцитов, %<br>Number of lymphocytes, %                                      | 34,7<br>(27,9-40,8)                                                                                                                                                                                                                              | 30,5*<br>(21,600-36,775)<br>p <sup>2a/k</sup> = 0,005                                                                                 | 31*<br>(22,0-37,8)<br>p <sup>3a/k</sup> = 0,009                                                                                                                                                                     | 40,5*<br>(31,4-46,8)<br>p <sup>2a/k</sup> = 0,005<br>p <sup>3a/k</sup> = 0,009                        |
| CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l         | 1513<br>(1260-2427)                                                                                                                                                                                                                              | 1672<br>(1067,0-2479,5)                                                                                                               | 1512,5*<br>(1255,50-1911,75)<br>p <sup>3a/k</sup> = 0,014                                                                                                                                                           | 2204*<br>(1655-2637)<br>p <sup>3a/k</sup> = 0,014                                                     |
| CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , %                                                    | 73,1<br>(69,55-76,05)                                                                                                                                                                                                                            | 75,6<br>(68,600-78,115)                                                                                                               | 75,45<br>(71,8725-79,6250)                                                                                                                                                                                          | 73,8<br>(72,30-81,25)                                                                                 |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l          | 980<br>(702-1329)                                                                                                                                                                                                                                | 751<br>(652,0-1272,5)                                                                                                                 | 830*<br>(707,50-1080,75)<br>p <sup>3a/k</sup> = 0,017                                                                                                                                                               | 1051*<br>(954-1721)<br>p <sup>3a/k</sup> = 0,017                                                      |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %                                                     | 43,53<br>(35,75-48,75)                                                                                                                                                                                                                           | 38,9<br>(36,400-44,625)                                                                                                               | 42,2***<br>(40,05-49,98)<br>p <sup>1-2/3-4</sup> = 0,023                                                                                                                                                            | 41,43<br>(39,25-47,87)                                                                                |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l          | 525<br>(348,0-821,5)                                                                                                                                                                                                                             | 554<br>(378-828)                                                                                                                      | 543,5*<br>(385,75-662,75)<br>p <sup>3a/k</sup> = 0,021                                                                                                                                                              | 788*<br>(574-957)<br>p <sup>3a/k</sup> = 0,021                                                        |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %                                                     | 22,51**<br>(19,37-30,45)<br>p <sup>1a/3a</sup> = 0,022                                                                                                                                                                                           | 25<br>(21,5-30,9)                                                                                                                     | 24,9**<br>(21,2375-29,3000)<br>p <sup>1a/3a</sup> = 0,022                                                                                                                                                           | 25,6<br>(21,92-32,18)                                                                                 |
| CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l         | 223<br>(159-282)                                                                                                                                                                                                                                 | 167<br>(123,00-256,25)                                                                                                                | 151,5<br>(114-227)                                                                                                                                                                                                  | 202<br>(146-297)                                                                                      |
| CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , %                                                    | 10,1<br>(7,7-11,9)                                                                                                                                                                                                                               | 8,715<br>(6,500-11,625)                                                                                                               | 8,46<br>(5,3850-11,2675)                                                                                                                                                                                            | 7,65<br>(7,05-9,17)                                                                                   |
| CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>                                                        | 1,86<br>(1,30-2,56)                                                                                                                                                                                                                              | 1,6<br>(1,205-1,910)                                                                                                                  | 1,685<br>(0,8-3,4)                                                                                                                                                                                                  | 1,79<br>(1,51-2,18)                                                                                   |

Таблица 3 (продолжение)  
Table 3 (continued)

| Показатели<br>периферической крови<br>Peripheral blood indicators                                   | 1 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза,<br>у которых<br>возбудители<br>генитальной<br>инфекции<br>не выделены<br>1 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis, in<br>which the causative<br>agents of genital<br>infection are not<br>isolated<br>n = 25 | 2 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза<br>и ВПЧ ВКР<br>2 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis and<br>HPV<br>n = 22 | 3 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза и<br><i>Ureaplasma spp./</i><br><i>Mycoplasma</i><br><i>genitalium</i><br>3 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis and<br><i>Ureaplasma spp./</i><br><i>Mycoplasma</i><br><i>genitalium</i><br>n = 27 | 4 группа<br>Контрольная<br>группа здоровых<br>женщин<br>4 group<br>Control group of<br>healthy women<br>n = 11 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l | 76<br>(26,5-209,0)                                                                                                                                                                                                                                                                      | 113*<br>(63-229)<br>p <sup>2a/k</sup> = 0,022                                                                                                           | 58,5***<br>(37,75-100,50)<br>p <sup>1-2/3-4</sup> = 0,005                                                                                                                                                                                                                       | 75*<br>(41-104)<br>p <sup>2a/k</sup> = 0,022                                                                   |
| CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> , %                                            | 3,5<br>(1,89-9,58)                                                                                                                                                                                                                                                                      | 4,5<br>(2,895-11,350)                                                                                                                                   | 2,4***<br>(1,9675-4,8125)<br>p <sup>1-2/3-4</sup> = 0,006                                                                                                                                                                                                                       | 2,45<br>(0,96-4,60)                                                                                            |
| CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l | 221<br>(131-359)                                                                                                                                                                                                                                                                        | 233<br>(134,00-275,75)                                                                                                                                  | 184,5<br>(98,50-244,25)                                                                                                                                                                                                                                                         | 333<br>(111-402)                                                                                               |
| CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> , %                                            | 8,9<br>(6,95-12,40)                                                                                                                                                                                                                                                                     | 9,3<br>(7,045-12,565)                                                                                                                                   | 9,05<br>(5,8075-11,8500)                                                                                                                                                                                                                                                        | 10,89<br>(3,01-15,80)                                                                                          |
| CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l                   | 36<br>(20-87)                                                                                                                                                                                                                                                                           | 55<br>(33,25-141,50)                                                                                                                                    | 57<br>(36-96)                                                                                                                                                                                                                                                                   | 49,5<br>(43,00-161,75)                                                                                         |
| CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , %                                                              | 2,3<br>(1,1-3,3)                                                                                                                                                                                                                                                                        | 3,42<br>(2,1900-5,0825)                                                                                                                                 | 3,17<br>(1,68-4,50)                                                                                                                                                                                                                                                             | 2,19<br>(1,575-5,240)                                                                                          |
| CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л<br>× 10 <sup>9</sup> /l                 | 20,5<br>(16,0-42,5)                                                                                                                                                                                                                                                                     | 40,5<br>(19,25-59,50)                                                                                                                                   | 39<br>(23-56)                                                                                                                                                                                                                                                                   | 37,5<br>(20,00-81,75)                                                                                          |
| CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %                                                            | 1,3<br>(0,6-1,9)                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1,85<br>(0,8875-3,0250)                                                                                                                                 | 1,73<br>(1,1-2,8)                                                                                                                                                                                                                                                               | 1,385<br>(0,8325-2,6675)                                                                                       |
| ЦИК, у. е.<br>Circulating immune<br>complexes, c. u.                                                | 74<br>(52-82)                                                                                                                                                                                                                                                                           | 91<br>(71-120)                                                                                                                                          | 71,5<br>(50,5-113,5)                                                                                                                                                                                                                                                            | 126<br>(48,75-170,75)                                                                                          |
| IgA, г/л<br>g/l                                                                                     | 1,8<br>(0,98-2,44)                                                                                                                                                                                                                                                                      | 2,38*<br>(1,59-3,92)<br>p <sup>2a/k</sup> = 0,011                                                                                                       | 2,64*<br>(1,47-4,27)<br>p <sup>3a/k</sup> = 0,004                                                                                                                                                                                                                               | 1,43*<br>(1,23-1,95)<br>p <sup>2a/k</sup> = 0,011<br>p <sup>3a/k</sup> = 0,004                                 |
| IgM, г/л<br>g/l                                                                                     | 1,7**<br>(1,31-2,24)<br>p <sup>1a/2a</sup> = 0,046                                                                                                                                                                                                                                      | 2,9**<br>(1,28-3,70)<br>p <sup>1a/2a</sup> = 0,046                                                                                                      | 2,27<br>(1,14-3,50)                                                                                                                                                                                                                                                             | 1,74<br>(1,22-2,73)                                                                                            |
| IgG, г/л<br>g/l                                                                                     | 15,39<br>(13,75-16,95)                                                                                                                                                                                                                                                                  | 13,43<br>(10,50-17,64)                                                                                                                                  | 15,84<br>(11,87-19,54)                                                                                                                                                                                                                                                          | 12,59<br>(8,99-18,47)                                                                                          |
| С3-компонент<br>комплемента, г/л<br>C3 complement<br>component, g/l                                 | 0,935<br>(0,804-0,993)                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,74<br>(0,90-0,98)                                                                                                                                     | 0,855<br>(0,683-1,019)                                                                                                                                                                                                                                                          | 0,845<br>(0,76-0,96)                                                                                           |
| С5-компонент<br>комплемента, г/л<br>C5 complement<br>component, g/l                                 | 0,106**<br>(0,086-0,140)<br>p <sup>1a/2a</sup> = 0,016                                                                                                                                                                                                                                  | 0,081**<br>(0,069-0,088)<br>p <sup>1a/2a</sup> = 0,016                                                                                                  | 0,099<br>(0,0800-0,1173)                                                                                                                                                                                                                                                        | 0,085<br>(0,073-0,098)                                                                                         |

Таблица 3 (продолжение)  
Table 3 (continued)

| Показатели<br>периферической крови<br>Peripheral blood indicators                                | 1 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза,<br>у которых<br>возбудители<br>генитальной<br>инфекции<br>не выделены<br>1 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis, in<br>which the causative<br>agents of genital<br>infection are not<br>isolated<br>n = 25 | 2 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза<br>и ВПЧ ВКР<br>2 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis and<br>HPV<br>n = 22 | 3 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза и<br><i>Ureaplasma spp./</i><br><i>Mycoplasma</i><br><i>genitalium</i><br>3 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis and<br><i>Ureaplasma spp./</i><br><i>Mycoplasma</i><br><i>genitalium</i><br>n = 27 | 4 группа<br>Контрольная<br>группа здоровых<br>женщин<br>4 group<br>Control group of<br>healthy women<br>n = 11 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$<br>Neutrophils, $\times 10^9/\text{l}$                        | 6,5<br>(5,1-9,7)                                                                                                                                                                                                                                                                        | 7,35<br>(5,55-9,53)                                                                                                                                     | 7,2<br>(4,8-8,5)                                                                                                                                                                                                                                                                | 5,45<br>(4,025-6,450)                                                                                          |
| Нейтрофилы, %<br>Neutrophils, %                                                                  | 75<br>(69-80)                                                                                                                                                                                                                                                                           | 80<br>(71,50-82,75)                                                                                                                                     | 79<br>(72,5-83,5)                                                                                                                                                                                                                                                               | 77,5<br>(69,25-79,50)                                                                                          |
| Лизосомальная<br>активность<br>нейтрофилов, у. е.<br>Lysosomal activity of<br>neutrophils, c. u. | 280<br>(229-314)                                                                                                                                                                                                                                                                        | 290<br>(244,5-333,5)                                                                                                                                    | 274<br>(231-303)                                                                                                                                                                                                                                                                | 334,5<br>(217,25-411,50)                                                                                       |
| НВТ-тест спонтанный, %<br>NST test spontaneous, %                                                | 20<br>(18-32)                                                                                                                                                                                                                                                                           | 21<br>(18-30)                                                                                                                                           | 24<br>(18-34)                                                                                                                                                                                                                                                                   | 25<br>(17-39,5)                                                                                                |
| НВТ-тест спонтанный, у. е.<br>NST test spontaneous, c. u.                                        | 0,28**<br>(0,23-0,42)<br>$p^{1a/3a} = 0,039$                                                                                                                                                                                                                                            | 0,32<br>(0,26-0,52)                                                                                                                                     | 0,4**<br>(0,30-0,59)<br>$p^{1a/3a} = 0,039$                                                                                                                                                                                                                                     | 0,44<br>(0,21-0,83)                                                                                            |
| НВТ-тест<br>индуцированный, %<br>NST test induced, %                                             | 22<br>(18-32)                                                                                                                                                                                                                                                                           | 26<br>(20-38)                                                                                                                                           | 30<br>(22-49)                                                                                                                                                                                                                                                                   | 26<br>(22-49)                                                                                                  |
| НВТ-тест<br>индуцированный, у. е.<br>NST test induced, c. u.                                     | 0,36**<br>(0,22-0,46)<br>$p^{1a/3a} = 0,044$                                                                                                                                                                                                                                            | 0,4<br>(0,28-0,68)                                                                                                                                      | 0,46**<br>(0,31-0,77)<br>$p^{1a/3a} = 0,044$                                                                                                                                                                                                                                    | 0,4<br>(0,335-0,855)                                                                                           |
| Фагоцитарная активность<br>нейтрофилов, %<br>Phagocytic activity of<br>neutrophils, %            | 48**<br>(42-56)<br>$p^{1a/3a} = 0,025$                                                                                                                                                                                                                                                  | 44<br>(30,0-50,5)                                                                                                                                       | 40**<br>(28-49)<br>$p^{1a/3a} = 0,025$                                                                                                                                                                                                                                          | 39<br>(23,5-58,5)                                                                                              |
| Фагоцитарное число, у. е.<br>Phagocytic number, c. u.                                            | 3,63**<br>(2,5-4,2)<br>$p^{1a/3a} = 0,019$                                                                                                                                                                                                                                              | 3,2<br>(2,75-3,88)                                                                                                                                      | 2,8**<br>(2,50-3,25)<br>$p^{1a/3a} = 0,019$                                                                                                                                                                                                                                     | 2,9<br>(2,65-4,40)                                                                                             |
| Интенсивность<br>фагоцитоза, у. е.<br>Intensity of phagocytosis, c. u.                           | 1,76<br>(1,16-2,15)                                                                                                                                                                                                                                                                     | 1,27<br>(0,87-1,90)                                                                                                                                     | 1,02<br>(0,78-1,45)                                                                                                                                                                                                                                                             | 1,29<br>(0,655-2,520)                                                                                          |
| IL-2, пг/мл<br>pg/ml                                                                             | 10,94* ***<br>(10,80-11,08)<br>$p^{1a/k} < 0,001$<br>$p^{1-2/3-4} = 0,029$                                                                                                                                                                                                              | 11,87<br>(10,67-12,28)                                                                                                                                  | 11,34*<br>(10,71-11,75)<br>$p^{3a/k} = 0,004$                                                                                                                                                                                                                                   | 12,01*<br>(11,4-13,1)<br>$p^{1a/k} < 0,001$<br>$p^{3a/k} = 0,004$                                              |
| IL-4, пг/мл<br>pg/ml                                                                             | 3,77*<br>(3,50-4,07)<br>$p^{1a/k} = 0,028$                                                                                                                                                                                                                                              | 3,71*<br>(3,40-3,88)<br>$p^{2a/k} = 0,021$                                                                                                              | 3,72*<br>(3,40-4,71)<br>$p^{3a/k} = 0,014$                                                                                                                                                                                                                                      | 3,33<br>(3,26-3,46)<br>$p^{1a/k} = 0,028$<br>$p^{2a/k} = 0,021$<br>$p^{3a/k} = 0,014$                          |

Таблица 3 (окончание)  
Table 3 (continued)

| Показатели<br>периферической крови<br>Peripheral blood indicators | 1 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза,<br>у которых<br>возбудители<br>генитальной<br>инфекции<br>не выделены<br>1 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis, in<br>which the causative<br>agents of genital<br>infection are not<br>isolated<br>n = 25 | 2 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза<br>и ВПЧ ВКР<br>2 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis and<br>HPV<br>n = 22 | 3 группа<br>Пациентки<br>с 1-2 стадиями<br>эндометриоза и<br><i>Ureaplasma spp./</i><br><i>Mycoplasma</i><br><i>genitalium</i><br>3 group<br>Patients with<br>1-2 stages of<br>endometriosis and<br><i>Ureaplasma spp./</i><br><i>Mycoplasma</i><br><i>genitalium</i><br>n = 27 | 4 группа<br>Контрольная<br>группа здоровых<br>женщин<br>4 group<br>Control group of<br>healthy women<br>n = 11 |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IL-6, пг/мл<br>pg/ml                                              | 33,04***<br>(14,0-55,5)<br>$p^{1a/k} = 0,002$<br>$p^{1a/2a} = 0,041$<br>$p^{1a/3a} = 0,027$                                                                                                                                                                                             | 6,21**<br>(3,27-55,74)<br>$p^{1a/2a} = 0,041$                                                                                                           | 7,14* ****<br>(4,20-53,55)<br>$p^{3a/k} = 0,003$<br>$p^{1a/3a} = 0,027$<br>$p^{1-2/3-4} = 0,027$                                                                                                                                                                                | 4,76*<br>(4,15-30,18)<br>$p^{1a/k} = 0,002$<br>$p^{3a/k} = 0,003$                                              |
| IL-8, пг/мл<br>pg/ml                                              | 28,08**<br>(8,25-81,76)<br>$p^{1a/2a} = 0,008$<br>$p^{1a/3a} = 0,005$                                                                                                                                                                                                                   | 101,66***<br>(49,80-116,26)<br>$p^{2a/k} = 0,003$<br>$p^{1a/2a} = 0,008$                                                                                | 101,66***<br>(59,32-191,93)<br>$p^{1a/3a} = 0,005$<br>$p^{1-2/3-4} = 0,005$                                                                                                                                                                                                     | 81,54*<br>(33,65-147,14)<br>$p^{2a/k} = 0,003$                                                                 |
| IL-10, пг/мл<br>pg/ml                                             | 5,21<br>(3,45-21,09)                                                                                                                                                                                                                                                                    | 7,25*<br>(4,02-48,83)<br>$p^{2a/k} = 0,031$                                                                                                             | 4,46<br>(3,91-9,50)                                                                                                                                                                                                                                                             | 3,48*<br>(2,82-12,89)<br>$p^{2a/k} = 0,031$                                                                    |
| IL-12, пг/мл<br>pg/ml                                             | 2,53<br>(2,19-3,15)                                                                                                                                                                                                                                                                     | 2,71<br>(2,47-3,24)                                                                                                                                     | 2,66<br>(2,10-2,91)                                                                                                                                                                                                                                                             | 2,5<br>(2,32-3,16)                                                                                             |
| TNF $\alpha$ , пг/мл<br>pg/ml                                     | 2,36* ****<br>(2,27-2,09)<br>$p^{1a/k} = 0,014$<br>$p^{1a/2a} = 0,004$<br>$p^{1-2/3-4} = 0,008$                                                                                                                                                                                         | 3,1***<br>(2,47-3,24)<br>$p^{2a/k} < 0,001$<br>$p^{1a/2a} = 0,004$                                                                                      | 2,61*<br>(2,32-2,89)<br>$p^{3a/k} = 0,005$                                                                                                                                                                                                                                      | 2,18*<br>(1,83-2,57)<br>$p^{1a/k} = 0,014$<br>$p^{2a/k} < 0,001$<br>$p^{3a/4a} = 0,005$                        |
| IFN $\alpha$ , пг/мл<br>pg/ml                                     | 13,93*<br>(12,86-15,71)<br>$p^{1a/k} = 0,020$                                                                                                                                                                                                                                           | 14,29<br>(14,27-16,43)                                                                                                                                  | 14,64<br>(13,75-16,43)                                                                                                                                                                                                                                                          | 16,25*<br>(14,91-18,04)<br>$p^{1a/k} = 0,020$                                                                  |
| IFN $\gamma$ , пг/мл<br>pg/ml                                     | 7,32***<br>(5,28-10,32)<br>$p^{1a/k} = 0,023$<br>$p^{1a/2a} = 0,041$                                                                                                                                                                                                                    | 7,74* ****<br>(7,33-17,18)<br>$p^{2a/k} < 0,001$<br>$p^{1a/2a} = 0,041$<br>$p^{1-2/3-4} = 0,038$                                                        | 7,04*<br>(6,48-7,75)<br>$p^{3a/k} = 0,001$                                                                                                                                                                                                                                      | 5,49*<br>(3,80-5,77)<br>$p^{1a/k} = 0,023$<br>$p^{2a/k} < 0,001$<br>$p^{3a/k} = 0,001$                         |

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

лизосомальной активности нейтрофилов. Полученные данные согласуются с приведенными ранее в научной литературе [8].

Изменения гуморального иммунитета характеризовались повышением во всех группах женщин с 1-2 стадиями НГЭ IgA. Полученные результаты, вероятно, отражают наличие хронического воспалительного процесса слизистых оболочек, при котором повышается синтез секреторного IgA.

В развитии эндометриоза важную роль играет дисбаланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. По данным литературы, в периферической крови женщин с эндометриозом повышен синтез фагоцитами провоспалительных цитокинов [21, 24, 25]. По результатам нашего исследования, у женщин с 1-2 стадиями НГЭ во всех группах наблюдалось повышение TNF $\alpha$ , который вызывает и поддерживает воспалительный процесс, стимулируя продукцию

IL-1, IL-6, IL-8, IFN $\gamma$ . Кроме этого, при отсутствии инфекционных патогенов, а также при наличии ВПЧ ВКР были повышены IL-4, IFN $\gamma$ . IL-4 – основной цитокин Th2-иммунного ответа, играет значительную роль в хронизации воспалительного процесса. Однако IFN $\gamma$  ингибирует пролиферацию Th2-клеток и повышает активность Th1-лимфоцитов, усиливая неспецифическую и специфическую защиту организма [17]. Кроме этого, при ВПЧ ВКР наблюдалось снижение IL-2 и IL-6. У женщин с уреамикоплазменной инфекцией изменения в системе цитокинов при 1-2 стадиях НГЭ не имели отличительных особенностей в сравнении с результатами у женщин 1 и 2 групп; так же как в 1 и 2 группах, повышался TNF $\alpha$  и, как у женщин с ВПЧ ВКР, снижался IL-2.

Таким образом, особенностью системного иммунитета у женщин с 1-2 стадиями НГЭ и ВПЧ ВКР было относительное увеличение Т-НК-лимфоцитов, обладающих противовирусной и противоопухолевой активностью, а также подавление клеточного иммунитета, за счет снижения синтеза IL-2 и IL-6. При наличии уреамикоплазменной инфекции наблюдалось увеличение количества Т-НК-клеток и снижение IL-2.

При инфильтративном НГЭ (3-4 стадии) в группе, где не были обнаружены возбудители генитальной инфекции, не установлено значительных изменений клеточного и гуморального иммунитета. Уровень цитокинов характеризовался преобладанием провоспалительных цитокинов: наблюдался высокий уровень в сыворотке крови IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, а также противовоспалительного IL-4. Данные цитокины участвуют в регуляции процессов воспаления, апоптоза, активации макрофагов, NK-клеток. Кроме этого, снижался уровень IL-2 и IFN $\alpha$ . Снижение IL-2 было более значительным, чем при 1-2 стадиях, а уровень TNF $\alpha$ , хотя и повышался, но был ниже, чем при 1-2 стадиях. Наши результаты подтверждают исследования других авторов [21, 24].

При распространенном НГЭ (3-4 стадии) и ВПЧ ВКР состояние иммунитета характеризовалось усилением воспалительного ответа за счет повышения Т-НК-лимфоцитов, IgA, IgM, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-8. Однако значения IFN $\gamma$  были ниже, чем при 1-2 стадиях. Наряду с этим наблюдалось повышение противовоспалительных IL-4 и IL-10 и снижение C5-компонента комплемента и IL-6, что, вероятно, создает условия для персистенции вируса в эпителии. При сравнении с 1-2 стадиями возросло относительное количество

Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и снизилось относительное и абсолютное количество Т-НК-клеток (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>).

При 3-4 стадиях НГЭ и уреамикоплазменной инфекции установлено наиболее выраженное угнетение клеточного иммунитета: снижение абсолютного и относительного количества лимфоцитов, абсолютного количества CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток, снижение IL-2. Уровень IL-6 и IL-8 в периферической крови был ниже, чем при 1-2 стадиях.

Наблюдалось значительное снижение фагоцитарной активности и повышение НСТ активности нейтрофилов периферической крови.

## Заключение

У женщин с НГЭ уже на ранних стадиях (1-2 стадии) наблюдаются признаки системного воспаления с преобладанием Th2-типа иммунного ответа (повышение IgA, IL-4) и угнетением клеточного иммунитета. Особенностью при ВПЧ ВКР было повышение Т-НК-лимфоцитов, снижение IL-2, активирующего Th1-лимфоциты, снижение функциональной активности сыровоточных нейтрофилов. Наличие уреамикоплазменной инфекции также характеризовалось снижением показателей клеточного иммунитета и повышением Т-НК-клеток. Только при наличии возбудителей генитальной инфекции (ВПЧ ВКР, уреамикоплазмы) снижался синтез IL-2, IL-6, вероятно, создавая условия для персистенции микроорганизмов.

При распространенном эндометриозе (3-4 стадии) наиболее значимые изменения иммунитета установлены в группах женщин с генитальной инфекцией, что подтверждается высоким уровнем IgA в сыворотке крови и повышением IgM при ВПЧ ВКР. Это может указывать на активацию персистирующей инфекции. Кроме этого, при ВПЧ ВКР повышался уровень провоспалительного IL-8, усиливающего миграцию лейкоцитов к патологическому очагу; при уреамикоплазменной инфекции наблюдалось еще большее угнетение клеточного иммунитета и снижение фагоцитарной активности нейтрофилов.

Таким образом, при исследовании системного иммунитета у женщин с НГЭ при наличии возбудителей генитальной инфекции выявлены особенности, которые могут способствовать развитию и прогрессированию заболевания.

## Список литературы / References

1. Адамян Л.В., Азнаурова Я.Б. Молекулярные аспекты патогенеза эндометриоза // Проблемы репродукции, 2015. Т. 21, № 2. С. 66-77. [Adamyant L.V., Aznaurova Ya.B. Molecular aspects of the pathogenesis of endometriosis. *Problemy reproduksii = Reproduction Problems*, 2015, Vol. 21, no. 2, pp. 66-77. (In Russ.)]
2. Адамян Л.В., Кулаков В.И., Андреева Е.Н. Эндометриозы. М.: Медицина, 2006. 411 с. [Adamyant L.V., Kulakov V.I., Andreeva E.N. Endometriosis]. Moscow: Medicine, 2006. 411 p.

3. Адамян Л.В., Фархат К.Н., Макиян З.Н., Савилова А.М. Молекулярно-биологическая характеристика эутопического и эктопического эндометрия (обзор литературы) // Проблемы репродукции, 2015. Т. 21, № 5. С. 8-16. [Adamyan L.V., Farkhat K.N., Makiyan Z.N., Savilova A.M. Molecular and biological characteristics of eutopic and ectopic endometrium (literature review). *Problemy reproduksii = Reproduction Problems*, 2015, Vol. 21, no. 5, pp. 8-16. (In Russ.)]
4. Енькова Е.В., Стрыгина К.Х. Характеристика показателей иммунного гомеостаза пациенток с наружным генитальным эндометриозом // Прикладные информационные аспекты медицины, 2014. Т. 17, № 2. С. 78-86. [Enkova E.V., Strygina K.Kh. Characteristic indicators of immune homeostasis of patients with external genital endometriosis. *Prikladnye informatsionnye aspekty meditsiny = Applied Information Aspects of Medicine*, 2014, Vol. 17, no. 2, pp. 78-86. (In Russ.)]
5. Кетлинский С.А. Роль Т-хелперов типов 1 и 2 в регуляции клеточного и гуморального иммунитета // Иммунология, 2002. Т. 23, № 2. С. 77-79. [Ketlinsky S.A. The role of T-helper types 1 and 2 in the regulation of cellular and humoral immunity. *Immunologiya = Immunology*, 2002, Vol. 23, no. 2, pp. 77-79. (In Russ.)]
6. Лесков В.П., Гаврилова Е.Ф., Пищулин А.А. Изменения иммунной системы при внутреннем эндометриозе // Проблемы репродукции, 1998. № 4. С. 26-30. [Leskov V.P., Gavrilova E.F., Pishchulin A.A. Changes in the immune system with internal endometriosis. *Problemy reproduksii = Reproduction Problems*, 1998, no. 4, pp. 26-30. (In Russ.)]
7. Луд Л.Н. Роль инфекции, передающейся половым путем, в патогенезе эндометриоза гениталий // Охрана материнства и детства, 2002. № 3. С. 37-42. [Lud L.N. The role of sexually transmitted infections in the pathogenesis of genital endometriosis. *Okhrana materinstva i detstva = Protection of Motherhood and Childhood*, 2002, no. 3, pp. 37-42. (In Russ.)]
8. Савченко А.А., Цхай В.Б., Круглова Д.Ю., Борисов А.Г. Иммунологические показатели при моноинфекции вирусом папилломы человека и сочетанной папилломавирусной и урогенитальной инфекции // Инфекция и иммунитет, 2014. Т. 4, № 3. С. 241-248. [Savchenko A.A., Tskhay V.B., Kruglova D.Yu., Borisov A.G. Immunological indicators during mono-infection with human papillomavirus and combined human papillomavirus and urogenital infections. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, Vol. 4, no. 3, pp. 241-248. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2014-3-241-248.
9. Сотникова Н.Ю., Анциферова Ю.С., Малышкина А.И., Красильникова А.К. Нарушения системных реакций врожденного иммунитета у пациенток с бесплодием и эндометриозом I-II стадии и возможность их коррекции препаратом ликолипид // Иммунология, 2016. Т. 37, № 1. С. 17-21. [Sotnikova N.Yu., Antsiferova Yu.S., Malysheva A.I., Krasilnikova A.K. Disorders of systemic reactions of innate immunity in patients with infertility and endometriosis stage I-II and the possibility of their correction by the drug licopid. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 1, pp. 17-21. (In Russ.)]
10. Тихончук Е.Ю., Непша О.С., Адамян Л.В., Кузнецова М.В. Омиксные технологии в исследовании патогенеза эндометриоза (обзор литературы) // Проблемы репродукции, 2016. Т. 22, № 5. С. 110-122. [Tikhonchuk E.Yu., Nepsha O.S., Adamyan L.V., Kuznetsova M.V. Omix technology in the study of the pathogenesis of endometriosis (literature review). *Problemy reproduksii = Reproduction Problems*, 2016, Vol. 22, no. 5, pp. 110-122. (In Russ.)]
11. Эндометриоз: диагностика, лечение и реабилитация. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных. М., 2016. 66 с. [Endometriosis: diagnosis, treatment and rehabilitation. Federal clinical guidelines for the management of patients]. Moscow, 2016. 66 p.
12. Ярмолинская М.И., Молотков А.С., Беженарь В.Ф., Кветной И.М. Эффективность ингибиторов ароматазы в комбинированном лечении наружного генитального эндометриоза // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева, 2014. Т. 1, № 1. С. 36-40. [Yarmolinskaya M.I., Molotkov A.S., Bezhenar V.F., Kvetnoy I.M. The effectiveness of aromatase inhibitors in the combined treatment of external genital endometriosis. *Arkhiv akusherstva i ginekologii im. V.F. Snegireva = V. Snegirev Archive of Obstetrics and Gynecology*, 2014, Vol. 1, no. 1, pp. 36-40. (In Russ.)]
13. Ahn S.H., Monsanto S.P., Miller C., Singh S.S., Thomas R., Tayade C. Pathophysiology and immune dysfunction in endometriosis. *Biomed Res. Int.*, 2015, Vol. 2015, 795976. doi: 10.1155/2015/795976.
14. Campos G.B., Marques L.M., Rezende I.S., Barbosa M.S., Abrão M.S., Timenetsky J. Mycoplasma genitalium can modulate the local immune response in patients with endometriosis. *Fertil. Steril.*, 2018, Vol. 109, no. 3, pp. 549-560.e4.
15. Heidarpour M., Derakhshan M., Derakhshan-Horeh M., Kheirollahi M., Dashti S. Prevalence of high-risk human papillomavirus infection in women with ovarian endometriosis. *J. Obstet. Gynaecol.*, 2017, Vol. 43, no. 1, pp. 135-139.
16. Kobayashi H., Higashiura Y., Shigetomi H., Kajihara H. Pathogenesis of endometriosis: the role of initial infection and subsequent sterile inflammation (Review). *Mol. Med. Rep.*, 2014, Vol. 9, no. 1, pp. 9-15.
17. Kajihara H., Yamada Y., Kanayama S., Furukawa N., Noguchi T., Haruta S., Yoshida S., Sado T., Oi H., Kobayashi H. New insights into the pathophysiology of endometriosis: from chronic inflammation to danger signal. *Gynecol. Endocrinol.*, 2011, Vol. 27, no. 2, pp. 73-79.
18. Khan K.N., Kitajima M., Hiraki K., Fujishita A., Sekine I., Ishimaru T., Masuzaki H. Toll-like receptors in innate immunity: role of bacterial endotoxin and toll-like receptor 4 in endometrium and endometriosis. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 2009, Vol. 68, no. 1, pp. 40-52.

19. Khoufache K., Michaud N., Harir N., Kibangu Bondza P., Akoum A. Anomalies in the inflammatory response in endometriosis and possible consequences: a review. *Minerva Endocrinol.*, 2012, Vol. 37, no. 1, pp. 75-92.
20. Macer M.L., Taylor H.S. Endometriosis and infertility: A review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, 2012, Vol. 39, pp. 535-549.
21. Mălutan A.M., Drugan T., Ciortea R., Bucuri C., Rada M.P., Miha D. Endometriosis-associated changes in serum levels of interferons and chemokines. *Turk. J. Med. Sci.*, 2017, Vol. 47, no. 1, pp. 115-122.
22. Matarese G., de Placido G., Nicas Y., Alviggi C. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease. *Trends Mol. Med.*, 2003, Vol. 9, no. 5, pp. 223-228.
23. Oppelt P., Renner S.P., Strick R., Valletta D., Mehlhorn G., Fasching P.A., Beckmann M.W., Strissel P.L. Correlation of high-risk human papilloma viruses but not of herpes viruses or Chlamydia trachomatis with endometriosis lesions. *Fertil. Steril.*, 2010, Vol. 93, no. 6, pp. 1778-1786.
24. Othman E.R., Hornung D., Hussein M., Abdelaal I.I., Sayed A.A., Fetih A.N., Al-Hendy A. Soluble tumor necrosis factor- $\alpha$  receptors in the serum of endometriosis patients. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2016, Vol. 200, pp. 1-5.
25. Santulli P., Borghese B., Chouzenoux S., Vaiman D., Borderie D., Streuli I., Goffinet F., de Ziegler D., Weill B., Batteux F., Chapron C. Serum and peritoneal interleukin-33 levels are elevated in deeply infiltrating endometriosis. *Hum. Reprod.*, 2012, Vol. 27, no. 7, pp. 2001-2009.
26. Signorile P. G., Baldi A. Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2010, Vol. 42, no. 6, pp. 778-780.
27. Sikora J., Mielczarek-Palacz A., Kondera-Anasz Z. Role of natural killer cell activity in the pathogenesis of endometriosis. *Curr. Med. Chem.*, 2011, Vol. 18, no. 2, pp. 200-208.
28. Sourial S., Tempest N., Hapangama D.K. Theories on the pathogenesis of endometriosis. *Int. J. Reprod. Med.*, 2014, Vol. 2014, 179515. doi: 10.1155/2014/179515.
29. Vestergaard A.L., Knudsen U.B., Munk T., Rosbach H., Bialasiewicz S., Sloots T.P., Martensen P.M., Antonsson A. Low prevalence of DNA viruses in the human endometrium and endometriosis. *Arch. Virol.*, 2010, Vol. 155, no. 5, pp. 695-703.

**Авторы:**

**Зайнетдинова Л.Ф.** — д.м.н., доцент, профессор кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Телешева Л.Ф.** — д.м.н., профессор, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Коряушкина А.В.** — врач акушер-гинеколог клиники ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Квятковская С.В.** — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики, заведующая иммунологической лабораторией клиники ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Мезенцева Е.А.** — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, старший научный сотрудник НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Никушкина К.В.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Authors:**

**Zaynetdinova L.F.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor of Department of Obstetrics and Gynecology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Telesheva L.F.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of Department of Microbiology, Virology, Immunology and Laboratory Diagnostics, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Koryaushkina A.V.**, Obstetrician-gynecologist, Clinic, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Kvyatkovskaya S.V.**, PhD (Medicine), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Head, Immunological Laboratory, Clinic, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Mezentseva E.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, Senior Research Associate, Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Nikushkina K.V.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 15.05.2019  
Отправлена на доработку 27.05.2019  
Принята к печати 04.06.2019

Received 15.05.2019  
Revision received 27.05.2019  
Accepted 04.06.2019



## ХАРАКТЕРИСТИКА АУТОИММУННОГО ВОСПАЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Старшинова А.А.<sup>1</sup>, Малкова А.М.<sup>1,3</sup>, Зинченко Ю.С.<sup>1,2</sup>,  
Басанцова Н.Ю.<sup>1,2</sup>, Павлова М.В.<sup>2</sup>, Беляева Е.Н.<sup>2,4</sup>, Лапин С.В.<sup>3</sup>,  
Мазинг А.В.<sup>3</sup>, Суркова Е.А.<sup>3</sup>, Яблонский П.К.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> СПбГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2», Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Туберкулез является гранулематозным заболеванием, вызываемым *Mycobacterium tuberculosis* и характеризующимся образованием казеозных гранул в различных органах, преимущественно в легких. Известно, что *M. tuberculosis* может быть триггером развития аутоиммунного воспаления за счет возможной мимикрии белков бактерии с аутоантигенами. В последнее время активно обсуждается роль мезенхимального белка виментина в качестве аутоантигена при микобактериальных инфекциях. Целью исследования является определение аутоантител к различным модификациям виментина у пациентов с туберкулезом.

Исследование проводилось за период 2014-2017 гг. с включением 28 больных туберкулезом легких (группа I), 30 больных с неспецифическими заболеваниями легких (II группа): 15 — с гранулематозным полиангиитом и 15 — с различными альвеолитами. Контрольную группу составили здоровые субъекты (n = 40).

Концентрация антител к мутированному цитруллинированному виментину (анти-MCV) была измерена в сыворотке крови всех участников исследования с применением ELISA (ORGENTEC, Германия). Пациенты с повышенным уровнем анти-MCV были протестированы на наличие антител к циклическому цитруллинированному пептиду (анти-CCP) с применением ELISA (EUROIMMUN, Германия). Статистический анализ был проведен с использованием GraphPad Prism 6 (Graph Pad Software, США), Statistica 10 (Statsoft, США) с применением методов анализа непараметрических выборок Манна-Уитни и хи-квадрат, а также корреляционного анализа по методу Спирмена. Различия считались статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

Концентрации антител к MCV были значительно выше у пациентов с туберкулезом (группа I, 60,7% случаев, 17/28) по сравнению с группой II и контрольной группой (23,6 и 25,0% случаев соответственно). Статистически значимой разницы между результатами уровня анти-MCV и анти-CCP в группе сравнения с контрольной группой обнаружено не было ( $p = 0,18$ ).

### Адрес для переписки:

Старшинова Анна Андреевна  
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»  
199034, Россия, Санкт-Петербург,  
Университетская наб., 7/9.  
Тел.: 8 (905) 204-38-61.  
Факс: 8 (812) 579-25-73.  
E-mail: starshinova\_777@mail.ru

### Address for correspondence:

Starshinova Anna A.  
St. Petersburg State University  
199034, Russian Federation, St. Petersburg,  
Universitetskaya emb., 7/9.  
Phone: 7 (905) 204-38-61.  
Fax: 7 (812) 579-25-73.  
E-mail: starshinova\_777@mail.ru

### Образец цитирования:

А.А. Старшинова, А.М. Малкова, Ю.С. Зинченко,  
Н.Ю. Басанцова, М.В. Павлова, Е.Н. Беляева,  
С.В. Лапин, А.В. Мазинг, Е.А. Суркова, П.К. Яблонский  
«Характеристика аутоиммунного воспаления  
у больных туберкулезом легких» // Медицинская  
иммунология, 2019. Т. 21, № 5. С. 911-918.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-911-918  
© Старшинова А.А. и соавт., 2019

### For citation:

A.A. Starshinova, A.M. Malkova, Yu.S. Zinchenko,  
N.Yu. Basantsova, M.V. Pavlova, E.N. Belyaeva, S.V. Lapin,  
A.V. Masing, E.A. Surkova, P.K. Yablonsky "Characteristics  
of autoimmune inflammation in the patients with lung  
tuberculosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 911-918.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-911-918  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-911-918

Высокий уровень анти-MCV антител у пациентов с туберкулезом легких отражает возможность развития аутоиммунного процесса в патогенезе заболевания. Измерение концентрации в плазме крови анти-MCV антител может иметь значение для коррекции назначаемой терапии, в особенности при назначении иммуносупрессивных и кортикостероидных гормональных лекарственных средств. Было показано, что наличие анти-CCP не характерно для заболеваний легких.

**Ключевые слова:** туберкулез, виментин, модифицированный цитруллинированный виментин, аутоантитела, анти-MCV

## CHARACTERISTICS OF AUTOIMMUNE INFLAMMATION IN THE PATIENTS WITH LUNG TUBERCULOSIS

Starshinova A.A.<sup>a</sup>, Malkova A.M.<sup>a</sup>, Zinchenko Yu.S.<sup>a, b</sup>,  
Basantsova N.Yu.<sup>a, b</sup>, Pavlova M.V.<sup>b</sup>, Belyaeva E.N.<sup>b, d</sup>, Lapin S.V.<sup>c</sup>,  
Masing A.V.<sup>c</sup>, Surkova E.A.<sup>c</sup>, Yablonsky P.K.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup> St. Petersburg City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Tuberculosis is a granulomatous disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, being characterized by the development of caseous granulomas in various organs, mainly in lungs. *M. tuberculosis* is known to be a trigger for autoimmune inflammation, due to the possible mimicry of bacterial proteins as autoantigens. Recently, a significance of mesenchymal vimentin as an autoantigen in mycobacterial infections has been actively discussed. The aim of the present study was to determine autoantibodies for various vimentin modifications in the patients with tuberculosis.

The study was performed in 2014-2017 and included 28 patients with pulmonary tuberculosis (group I), 30 patients with nonspecific lung diseases (group II): 15 with granulomatous polyangiitis, and 15 with different alveolites. Control group consisted of healthy subjects (n = 40). Concentration of antibodies to mutated citrullinated vimentin (anti-MCV) was measured using ELISA (ORGENTEC, Germany). The patients with elevated anti-MCV levels were tested for antibodies to cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) using ELISA technique (EUROIMMUN, Germany). Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA), Statistica 10 (Statsoft, USA) using nonparametric analysis of samples with Mann-Whitney and Chi-square criteria, and Spearman method for correlation analysis. The differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

The anti-MCV concentrations were significantly higher in patients with tuberculosis (group I, 60.7% of cases, 17/28) than in group II, and control group (23.6 and 25.0% of cases, respectively). No statistically significant differences were revealed between the results of anti-MVC and anti-CCP levels in comparison group with the control group ( $p = 0.18$ ).

High levels of anti-MCV antibodies in the patients with pulmonary tuberculosis reflect an opportunity of developing autoimmune process in the disease pathogenesis. Measurement of plasma anti-MCV antibody concentrations may be important for correction of the therapy, especially upon administration of immunosuppressive and hormonal corticosteroid drugs. It has been shown that anti-CCP are not characteristic to the lung diseases.

**Keywords:** tuberculosis, vimentin, modified citrullinated vimentin, autoantibodies

Работа поддержана грантом Правительства РФ (договор № 14.W03.31.0009 от 13.02.2017 г.) о выделении гранта для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых.

## Введение

Туберкулез (ТБ) является одним из гранулематозных заболеваний с известным этиологическим фактором. Связь туберкулеза легких с воз-

можным развитием аутоиммунного процесса остается малоизученным вопросом [1, 3].

В 1986 году Y. Shoenfeld высказал предположение, что среди всех триггерных факторов, приводящих к развитию аутоиммунных реакций, именно инфекционные факторы и непосредственно *M. tuberculosis* заслуживают наибольшего внимания, однако научных работ, посвященных клиническому и лабораторному изучению данного вопроса, по-прежнему недостаточно [6, 15]. В настоящее время имеются данные о возможной провоцирующей роли *M. tuberculosis* в развитии таких заболеваний, как саркоидоз, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, первичный билиарный цирроз печени и многие другие [5, 13, 16].

Одним из возможных механизмов развития аутоиммунной реакции на фоне туберкулезной инфекции является молекулярная мимикрия. Важная роль отводится белкам теплового шока (БТШ, heat-shock protein, HSP), в норме активирующимся при повышении температуры и других стрессовых воздействиях на клеточном уровне. БТШ существенно различаются у человека и микроорганизмов, что обеспечивает возможность возникновения перекрестной реактивности. Показано, что такие подтипы БТШ, как HSP65 и HSP70, могут влиять на дифференцировку Т-хелперов 1 и 2 типа, способствуя экспрессии костимулирующих молекул и молекул адгезии. Также нельзя исключить, что при персистенции *M. tuberculosis* в организме человека происходит значительное высвобождение провоспалительных цитокинов и более выраженная активация аутореактивных Т-клеток [3, 8].

При туберкулезе у пациентов нередко наблюдаются различные клинические симптомы, характерные для системных заболеваний [11]. К наиболее ярким примерам можно отнести ревматоид Понсе, реактивный неспецифический артрит, возникающий на фоне туберкулезной инфекции, при котором *M. tuberculosis* не выявляется непосредственно в ткани суставов. Чаще всего для пациентов, страдающих ТБ, характерен моноартрит, однако в редких случаях также регистрируются различные формы полиартрита. Помимо этого, у пациентов с активным туберкулезным процессом может выявляться увеит и узловатая эритема, также являющиеся характерными признаками системных заболеваний [6, 8].

Клинические наблюдения подтверждают-ся при проведении лабораторной диагностики. Аутоантитела, характерные для гранулематоза с полиангиитом и системной красной волчанки, в ряде исследований встречались у 40% пациентов с ТБ [5]. В некоторых исследованиях указывают на статистически значимое повышение концен-

траций в плазме крови антител к двухцепочечной ДНК (32% обследованных пациентов), антинуклеарных антител (38%), антител к рибонуклеопротеинам (15%), анти-SSA (64%) и анти-ACA-IgM антител (59%) у больных туберкулезом [7, 9]. В редких случаях регистрируются антитела к цитоплазме нейтрофилов (ANCA), антитела к бета-2-гликопротеиду (anti- $\beta$ 2 GPI) и антикардиолипиновые антитела, однако результаты научных работ, связанные с ними, противоречивы и требуют дальнейших исследований [6, 8].

В последние несколько лет внимание исследователей привлекал аутоантиген виментин, филаментный белок мезенхимальных клеток. Группа Кристиана Эберхардта в 2017 году продемонстрировала повышение выработки интерферона гамма (IFN $\gamma$ ) и фактора некроза опухолей альфа (TNF $\alpha$ ) моноцитами после инкубации с виментином, а также с реагентом Квейма (обработанной тканью селезенки, пораженной саркоидными гранулемами) [10], что связано с генотипом HLA-DRB1\*03 и предрасположенностью к выработке повышенного уровня антител к виментину [2].

Виментин — пептид, который присутствует в клетках соединительной ткани и участвует в межклеточных взаимодействиях и функционировании иммунной системы [4]. Возникновение аутоантител к данному белку описано в патогенезе ревматоидного артрита, системной красной волчанки и многих других заболеваний соединительной ткани [16].

В 2007 году группа Wahlström описала возможные аутоантигены, связанные с молекулами HLA-DR в клетках бронхоальвеолярной жидкости у пациентов с саркоидозом [15]. Также был продемонстрирован выраженный ответ Т-клеток бронхоальвеолярной жидкости на виментин и цитруллинированного виментина у пациентов с генотипом HLA DR-B1\*0301 и остро протекающим заболеванием [2].

В современной литературе недостаточно данных об аутоиммунных нарушениях у больных туберкулезом, что послужило причиной данного исследования — определение уровня аутоантител к различным модификациям виментина у пациентов с туберкулезом легких и с другими неспецифическими гранулематозными заболеваниями легких.

## Материалы и методы

Ретроспективно-проспективное сравнительное исследование было проведено за период с 2014 по 2017 год с набором пациентов на базе ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава РФ и СПбГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2».

Лабораторная часть исследования проводилась в лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний СПб ГМУ им. И.П. Павлова.

Исследование одобрено независимым этическим комитетом ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России (выписка из протокола № 34.2 от 19.01.2017) и Локальным этическим комитетом Санкт-Петербургского государственного университета (протокол № 01-126 30.06.17). Все участники исследования подписали информированное согласие на обработку индивидуальных данных.

Согласно дизайну исследования, было включено 28 пациентов с бактериологически верифицированным туберкулезом легких (I группа), 30 больных с неспецифическими заболеваниями легких (II группа) (15 с гранулематозным полиангиитом и 15 с экзогенным аллергическим альвеолитом). Контрольная группа была представлена здоровыми добровольцами ( $n = 40$ ), которые не имели хронических заболеваний, в том числе онкологических, контактов с больными туберкулезом; отмечалось отсутствие изменений по лабораторным показателям.

Группы были сопоставимы по полу и возрасту. Критериями исключения являлись: срок более 2 лет с выявления рентгенологических изменений в легких, прием иммуносупрессивной и противотуберкулезной терапии, проведение курса плазмафереза сроком менее 2 месяцев с момента включения, наличие ВИЧ-инфекции, сифилиса, опухолевых заболеваний, декомпенсированного сахарного диабета, аутоиммунной патологии.

Все пациенты прошли комплекс обследования, включавший клиническую оценку заболевания, мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) органов грудной клетки, лабораторные исследования крови, стандартный комплекс обследования на туберкулез, гистологическую верификацию изменений в легких и внутригрудных лимфатических узлах по показаниям (с применением чрезбронхиальной и видеоторакоскопической биопсии).

Диагноз «туберкулез легких» верифицировался на основании характерных рентгенологических изменений (лимфаденопатии средостения, очаговых и инфильтративных изменений с деструкцией или без нее); положительных результатов обследования на туберкулез (выявление в анализах мокроты *M. tuberculosis* (МВТ) и/или МТВ ДНК по данным молекулярно-генетических и бактериологических методов) [1].

В сыворотке всех включенных в исследование участников был определен уровень антител к модифицированному цитруллинированному виментину (modified citrullinated vimentin, anti-MCV). Сыворотка пациентов с повышенным

уровнем anti-MCV была исследована на антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (cyclic citrullinated peptide, anti-CCP) и цитруллинированному виментину (citrullinated vimentin, anti-Sa). Антитела к anti-MCV определялись с применением ELISA (ORGENTEC, Germany), к anti-CCP и anti-Sa – с применением ELISA (EUROIMMUN, Germany). Все измерения были выполнены с помощью планшетного ИФА-спектрофотометра BIO-TEK ELx800. Положительным результатом является обнаружение уровня указанных антител более 19,5 Ед/мл.

#### Статистические методы

Статистический анализ полученных данных осуществлялся с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6 с использованием теста Манна–Уитни для непараметрических выборок, при значениях переменных меньше 5 применяли точный тест Фишера. Количественные данные рассчитывались в виде  $M \pm SD$ . Степени ассоциаций между пропорциями оценивались с помощью доверительных интервалов, а также критерия  $\chi^2$  с коррекцией Йейтса. Для определения взаимосвязи между признаками был использован корреляционный анализ Спирмена. Различия или показатели связи считались статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

## Результаты

Результаты определения уровня anti-MCV и anti-CCP в сыворотке крови представлены в таблице 1.

Согласно представленным в таблице 1 данным, у больных туберкулезом (I группа) был диагностирован в 60,7% (17/28), что достоверно чаще, чем в группе контроля (25,0%). У больных туберкулезом высокого уровня anti-CCP не было выявлено ни у одного пациента.

Результаты сравнения уровня anti-MCV у пациентов с туберкулезом (I), неспецифическими заболеваниями легких (II) и контрольной группой (III) представлены на рисунке 1.

Как представлено на рисунке 1, по уровню anti-MCV выявлены статистически значимые различия у больных туберкулезом и у здоровых лиц ( $p = 0,0002$ ), а также у больных туберкулезом (I) и неспецифическими заболеваниями легких (II) ( $p = 0,0003$ ). Статистически значимой разницы между результатами уровня anti-MCV во II группе и контрольной группе выявлено не было ( $p = 0,17$ ).

В таблице 2 приведены результаты расчета чувствительности и специфичности определения anti-MCV в исследуемых группах. Из представленных в таблице 2 данных видно, что показатели диагностической значимости составляют 63,0 и 73,0%, соответственно, для туберкулеза

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИ-MCV В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 1. RESULTS OF THE ANTI-MCV DETERMINATION IN THE STUDIED GROUPS

| Исследуемые группы пациентов<br>Group of patients                                                | Данные по anti-MCV<br>anti-MCV data     |                                                | CI 95%      | Данные по anti-CCP<br>anti-CCP data     |                                                | CI 95%    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|-----------|
|                                                                                                  | Повышенный уровень<br>High level<br>n/% | Абсолютное значение<br>Absolute value<br>(M±m) |             | Повышенный уровень<br>High level<br>n/% | Абсолютное значение<br>Absolute value<br>(M±m) |           |
| I группа (туберкулез)<br>Group I (tuberculosis)<br>n = 28                                        | 60,7*<br>(17/28)                        | 23,39±10,65                                    | 19,17-27,61 | 0<br>0/17                               | 2,26±1,36                                      | 0,96-4,55 |
| II группа (неспецифические заболевания легких)<br>Group II (nonspecific lung diseases)<br>n = 30 | 26,7<br>(8/30)                          | 33,94±31,47                                    | 10,53-19,12 | 25<br>2/8                               | 2,43±1,45                                      | 0,69-9,76 |
| Здоровые лица (группа контроля)<br>Healthy subjects (control group)<br>n = 40                    | 25,0<br>(10/40)                         | 14,75±12,47                                    | 11,52-17,99 | 0<br>(0/10)                             | 0,55±0,37                                      | 0,87-2,10 |

Примечание. \*  $p < 0,01$  – достоверные различия между значениями в группе II и III и IV группах.

Note. \*  $p < 0.01$ , significant differences between the values in the II and III and IV groups.

и 44,4 и 57,7% – для неспецифических заболеваний легких.

## Обсуждение

Согласно данным исследования, получены статистически значимые результаты по высоким показателям уровня антител к anti-MCV у больных с туберкулезом по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,0002$ ), что характерно для аутоиммунных процессов [6, 13]. В то же время не было выявлено повышения концентрации anti-CCP антител.

Вероятно, причиной появления аутоантител может являться молекулярная мимикрия, которая описана при хронической инфекции на фоне гиперреактивного иммунного ответа. Согласно литературным данным, возможным аутоантигеном является виментин [6, 8], что было выявлено в нашем исследовании. В качестве микобактериальных антигенов, участвующих в перекрестной реакции, могут быть белки теплового шока Mtb-HsP60, Mtb-HsP65, каталаза (mKatG) [13].

Наличие антител у больных туберкулезом может отражать возможную перекрестную реактивность иммунной системы против виментина и пептидов *M. tuberculosis*, что отмечалось во многих исследованиях по изучению роли микобактериальных антигенов при саркоидозе и возмож-

ной роли *M. tuberculosis* в качестве триггерного фактора [5, 12, 13].

Полученные данные позволяют предположить, что цитруллинирование виментина не играет важной роли в формировании им-

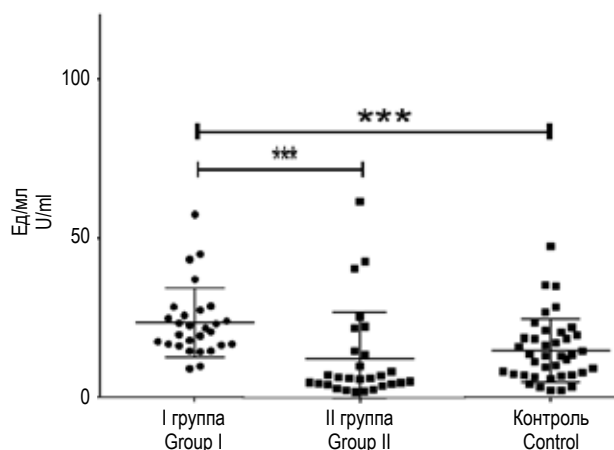


Рисунок 1. Уровень Anti-MCV в исследуемых группах

Примечание. \*\*\*  $p < 0,0001$  – достоверные различия при сравнении результатов I, II группы и группы контроля.

Figure 1. Level of anti-MCV in the groups of patients with tuberculosis (I), nonspecific lung diseases (II) and healthy subjects (III)

Note. \*\*\*,  $p < 0.0001$ , significant differences in comparison with the results of I, II and control groups.

ТАБЛИЦА 2. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ANTI-MCV В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 2. SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF ANTI-MCV IN THE STUDIED GROUPS

| Группы пациентов<br>Group of patients                                                                                                          | Значение<br>Р точного<br>критерия<br>Фишера<br>P value of Fisher<br>test | Значение Р $\chi^2$<br>с коррекцией<br>Йейтса<br>P $\chi^2$ value with<br>Yates's correction | Чувствительность<br>Sensitivity | Специфичность<br>Specificity |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| <b>I группа (туберкулез)</b><br>Group I (tuberculosis)<br>n = 28                                                                               | 0,0052                                                                   | 0,007                                                                                        | 63,0%                           | 73,0%                        |
| <b>II группа<br/>(аутоиммунные<br/>неспецифические<br/>заболевания легких)</b><br>Group II (autoimmune<br>nonspecific lung diseases)<br>n = 30 | 0,158                                                                    | 0,236                                                                                        | 44,4%                           | 57,7%                        |

мунного ответа против этого белка, что также не может служить значимым диагностическим критерием. Диагностическая чувствительность и специфичность данных показателей для туберкулеза низкая. Однако выявление аутоиммунного компонента является значимым при ведении больных туберкулезом для коррекции лечения и назначения иммуносупрессивной терапии.

## Заключение

В данном исследовании впервые были получены данные о концентрации в плазме крови аутоантител к виментину у больных туберкулезом легких.

Антитела к модифицированному цитруллинированному виментину были обнаружены во всех исследованных группах, но для туберкулеза этот маркер имел большее значение, чем для других

заболеваний легких. При этом выявление анти-MCV антител не может служить диагностическим критерием для туберкулеза, так как они связаны с фундаментальными аспектами патогенеза данного заболевания. Однако наличие аутоиммунного компонента является значимым для коррекции терапии данных пациентов и повышение уровня анти-MCV антител может служить маркером для назначения иммуносупрессивной и кортикостероидной терапии.

Впервые было показано, что антитела к цитруллинированному циклическим пептидам не значимы в патогенезе туберкулеза и других исследуемых заболеваний легких (гранулематоз с полиангиитом, альвеолиты). Отсутствие анти-ССР позволяет предположить, что цитруллинирование виментина не является ключевым фактором в формировании аутоиммунного ответа к данному пептиду.

## Список литературы / References

1. Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации / под ред. П.К. Яблонского. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 240 с. [Phthisiatry. National clinical guidelines / ed. P.K. Yablonsky]. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 240 p.
2. Arango M., Perricone C., Kivity S., Cipriano E., Ceccarelli F., Valesini G., Shoenfeld Y. HLA-DRB1 the notorious gene in the mosaic of autoimmunity. *Immunol. Res.*, 2017, Vol. 65, no. 1, pp. 82-98.
3. Ang S.C., Moscovici E.A. Cross-reactive and species specific *Mycobacterium tuberculosis* antigens in the immunoprofile of Schaumann bodies: a major clue to the etiology of sarcoidosis. *Histol. Histopathol.*, 1996, Vol. 11, no. 1, pp. 125-134.
4. Cain H., Kraus B. Immunofluorescence microscopic demonstration of vimentin filaments in asteroid bodies of sarcoidosis. A comparison with electron microscopic findings. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, 1983, Vol. 42, no. 2, pp. 213-226.
5. Chen E.S., Wahlström J., Song Z., Willett M.H., Wikén M., Yung R.C., West E.E., McDyer J.F., Zhang Y., Eklund A., Grunewald J., Moller D.R. T Cell responses to mycobacterial catalase-peroxidase profile a pathogenic antigen in systemic sarcoidosis. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 12, pp. 8784-8796.
6. Elkington P., Tebruegge M., Mansour S. Tuberculosis: an infection-initiated autoimmune disease? *Trends Immunol.*, 2016, Vol. 37, no. 12, pp. 815-818.

7. Elkayam O., Caspi D., Lidgi M., Segal R. Auto-antibody profiles in patients with active pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2007, Vol. 11, no. 3, pp. 306-310.
8. Ribeiro F.M., Goldenberg T. Mycobacteria and autoimmunity. *Lupus*, 2015, Vol. 24, pp. 374-381.
9. Fagan E.A., Moore-Gillon J.C., Turner-Warwick M. Multiorgan granulomas and mitochondrial antibodies. *J. Med.*, 1983, Vol. 308, pp. 572-575.
10. Musaelyan A., Lapin S., Nazarov V., Tkachenko O., Gilburd B., Mazing A., Mikhailova L., Shoenfeld Y. Vimentin as antigenic target in autoimmunity: a comprehensive review. *Autoimmun. Rev.*, 2018, Vol. 17, no. 9, pp. 926-934.
11. Samsonova M.V., Chernyaev A.L. Granulomatous lung diseases. *Pulmonology*, 2017, Vol. 27, no. 2, pp. 250-261.
12. Scadding JG. *Mycobacterium tuberculosis* in the aetiology of sarcoidosis. *BMJ*, 1960, Vol. 2, pp. 1617-1623.
13. Sester M., Kampmann B. What defines latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in patients with autoimmune diseases? *Thorax*, 2016, Vol. 71, pp. 64-72.
14. Shapira Y., Agmon-Levin N., Shoenfeld Y. *Mycobacterium tuberculosis*, autoimmunity, and vitamin D. *Clin. Rev. Allerg. Immunol.*, 2010, Vol. 38, pp. 169-177.
15. Shoenfeld Y., Vilner Y., Coates A.R.M., Rauch J., Lavie G., Shaul D., Pinkhas J. Monoclonal anti-tuberculosis antibodies react with DNA, and monoclonal anti-DNA autoantibodies react with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Exp. Immunol.*, 1986, Vol. 66, pp. 255-261.
16. Valesini G., Gerardi M.C., Iannuccelli C., Pacucci V.A., Pendolino M., Shoenfeld Y. Citrullination and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2015, Vol. 14, no. 6, pp. 490-497.

---

**Авторы:**

**Старшинова А.А.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории мозаики аутоиммунитета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

**Малкова А.М.** — младший научный сотрудник лаборатории аутоиммунитета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

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

**Басанцова Н.Ю.** — младший научный сотрудник лаборатории мозаики аутоиммунитета, ассистент кафедры факультетской терапии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; младший научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Павлова М.В.** — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник, руководитель направления «Фтизиопульмонология» ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Беляева Е.Н.** — к.м.н., младший научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ; заведующая отделением СПбГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2», Санкт-Петербург, Россия

---

**Authors:**

**Starshinova A.A.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Autoimmunity Mosaics Laboratory, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Malkova A.M.**, Junior Research Associate, Autoimmunity Mosaics Laboratory, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Zinchenko Yu.S.**, Junior Research Associate, Autoimmunity Mosaics Laboratory, St. Petersburg State University; Junior Research Associate, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

**Basantsova N.Yu.**, Junior Research Associate, Autoimmunity Mosaics Laboratory, Assistant Professor, Department of Faculty Therapy, St. Petersburg State University; Junior Research Associate, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

**Pavlova M.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Head of Phthisiopulmonology, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

**Belyaeva E.N.**, PhD (Medicine), Junior Research Associate, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology; Head of Department, St. Petersburg City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

**Лапин С.В.** — к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний, Научно-методический центр Министерства здравоохранения РФ по молекулярной медицине ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Lapin S.V.**, PhD (Medicine), Head, Laboratory for Autoimmune Diagnostics at the Research Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Мазинг А.В.** — ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики, Научно-методический центр Министерства здравоохранения РФ по молекулярной медицине ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Mazing A.V.**, Leading Research Associate, Laboratory for Autoimmune Diagnostics at the Research Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Суркова Е.А.** — старший научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний, Научно-методический центр Министерства здравоохранения РФ по молекулярной медицине ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Surkova E.A.**, Senior Research Associate, Laboratory for Autoimmune Diagnostics at the Research Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Поступила 10.02.2019  
Отправлена на доработку 07.03.2019  
Принята к печати 09.10.2019

Received 10.02.2019  
Revision received 07.03.2019  
Accepted 09.10.2019



## ТЕСТ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МИКОГЕННОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

Козлова Я.И.<sup>1</sup>, Фролова Е.В.<sup>1</sup>, Учеваткина А.Е.<sup>1</sup>, Филиппова Л.В.<sup>1</sup>,  
Аак О.В.<sup>1</sup>, Богомолова Т.С.<sup>1</sup>, Борзова Ю.В.<sup>1</sup>, Махмутова В.Р.<sup>2</sup>,  
Степаненко Т.А.<sup>2</sup>, Кузнецов В.Д.<sup>1</sup>, Васильева Н.В.<sup>1</sup>, Шульгина М.В.<sup>1</sup>,  
Климко Н.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Колонизация *Aspergillus fumigatus* у больных муковисцидозом (МВ) может вызвать сенсibilизацию к *A. fumigatus* и/или аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА), что значительно ухудшает течение основного заболевания. В настоящее время идет поиск новых диагностических тестов, которые позволят выявить микогенную сенсibilизацию у данной категории больных. Целью настоящей работы явилась оценка возможности применения теста активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* в условиях *in vitro* с использованием проточной цитометрии для выявления микогенной сенсibilизации у больных МВ. Обследовали 190 больных МВ в возрасте от 1 до 37 лет. Всем пациентам провели аллергологическое (кожные тесты с грибковыми аллергенами, определение в сыворотке уровня общего IgE и специфических IgE (sIgE) к грибковым аллергенам) и микологическое (микроскопия и посев респираторных субстратов) обследование. По показаниям выполняли компьютерную томографию органов грудной клетки. Тест активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* выполнили 10 больным МВ с АБЛА и 10 больным МВ без АБЛА в дополнение к стандартному аллергологическому обследованию. У больных муковисцидозом частота сенсibilизации к *A. fumigatus* составила 27%, частота развития аллергического бронхолегочного аспергиллеза — 5,7%. Количество эозинофилов, уровни общего IgE и sIgE к *A. fumigatus* у больных МВ с АБЛА достоверно превышали значения пациентов с МВ без АБЛА. В крови больных МВ с АБЛА определено 68,5 (52,5-81,5) % базофилов, активированных аллергеном *A. fumigatus*, индекс стимуляции составил 17,07 (10,30-27,70). В группе сравнения индекс стимуляции не превышал значения 1,5 ( $p = 0,000$ ). Установлена прямая положительная корреляционная связь между уровнями sIgE к *A. fumigatus* и количеством базофилов, активированных аллергеном *A. fumigatus* ( $r = 0,77$ ; при  $p < 0,05$ ). У больных МВ с АБЛА достоверно ниже показатели ФЖЕЛ и индекса массы тела по сравнению с пациентами без микогенной сенсibilизации. Использование теста активации базофилов, наряду с традиционными показателями, по-

### Адрес для переписки:

Козлова Яна Игоревна  
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный  
медицинский университет имени И.И. Мечникова»  
194291, Россия, Санкт-Петербург,  
ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28.  
Тел.: 8 (812) 303-51-40.  
Факс: 8 (812) 510-62-77.  
E-mail: kozlova510@mail.ru

### Address for correspondence:

Kozlova Yana I.  
I. Mechnikov North-Western State Medical University  
194291, Russian Federation, St. Petersburg,  
Santiago de Cuba str., 1/28.  
Phone: 7 (812) 303-51-40.  
Fax: 7 (812) 510-62-77.  
E-mail: kozlova510@mail.ru

### Образец цитирования:

Я.И. Козлова, Е.В. Фролова, А.Е. Учеваткина,  
Л.В. Филиппова, О.В. Аак, Т.С. Богомолова,  
Ю.В. Борзова, В.Р. Махмутова, Т.А. Степаненко,  
В.Д. Кузнецов, Н.В. Васильева, М.В. Шульгина,  
Н.Н. Климко «Тест активации базофилов  
для диагностики микогенной сенсibilизации у больных  
муковисцидозом» // Медицинская иммунология, 2019.  
Т. 21, № 5. С. 919-928.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-919-928  
© Козлова Я.И. и соавт., 2019

### For citation:

Ya.I. Kozlova, E.V. Frolova, A.E. Uchevatkina,  
L.V. Filippova, O.V. Aak, T.S. Bogomolova, Yu.V. Borzova,  
V.R. Makhmutova, T.A. Stepanenko, V.D. Kuznetsov,  
N.V. Vasilyeva, M.V. Shulgina, N.N. Klimko "Basophile  
activation test for the diagnostics of fungal sensitization in the  
patients with cystic fibrosis", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5,  
pp. 919-928.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-919-928  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-919-928

зволит более дифференцированно подходить к оценке развития АБЛА у больных МВ. Своевременная идентификация ассоциированного с грибами рода *Aspergillus* клинического статуса больных МВ будет способствовать раннему и эффективному назначению специфической терапии.

**Ключевые слова:** тест активации базофилов, *Aspergillus spp.*, *Aspergillus fumigatus*, аллергический бронхолегочный аспергиллез, муковисцидоз, микогенная сенсибилизация

## BASOPHILE ACTIVATION TEST FOR THE DIAGNOSTICS OF FUNGAL SENSITIZATION IN THE PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

Kozlova Ya.I.<sup>a</sup>, Frolova E.V.<sup>a</sup>, Uchevatkina A.E.<sup>a</sup>, Filippova L.V.<sup>a</sup>,  
Aak O.V.<sup>a</sup>, Bogomolova T.S.<sup>a</sup>, Borzova Yu.V.<sup>a</sup>, Makhmutova V.R.<sup>b</sup>,  
Stepanenko T.A.<sup>b</sup>, Kuznetsov V.D.<sup>a</sup>, Vasilyeva N.V.<sup>a</sup>, Shulgina M.V.<sup>a</sup>,  
Klimko N.N.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Multidisciplinary City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** *Aspergillus fumigatus* colonization in the patients with cystic fibrosis (CF) may cause sensitization against *A. fumigatus* and/or allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), which significantly worsens the course of underlying disease. At the present time, new diagnostic tests are searched for detection of fungal sensitization in these patients. The aim of this work was to evaluate an opportunity of application of basophile activation test with *A. fumigatus* allergen *in vitro* using flow cytometry, aiming for identification of fungal sensitization in the CF patients. The study included 190 patients with CF aged 1 to 37 years. All the patients underwent common allergy screening (skin tests with fungal allergens, determination of serum levels of total IgE and specific IgE for the fungal allergens), and mycological examination (microscopy and culture of respiratory substrates). Computed tomography of the chest was performed upon clinical indications. The basophil activation test with the *A. fumigatus* allergen was performed in 10 CF patients with ABPA, and 10 CF patients without ABPA, in addition to the standard allergological examination. Frequency of sensitization to *A. fumigatus* in the patients with cystic fibrosis was 27%, the incidence of allergic bronchopulmonary aspergillosis was 5.7%. The number of eosinophils, total IgE and specific IgE levels in CF patients with ABPA were significantly higher than in CF patients without ABPA. In blood of the ABPA patients we have identified 68.5 (52.5–81.5%) of basophilic leukocytes activated by *A. fumigatus* allergen, with a stimulation index of 17.07 (10.30–27.70). In appropriate comparison group, the stimulation index did not exceed 1.5 ( $p = 0.000$ ). Direct positive correlation between the levels of specific IgE to *A. fumigatus* and the number of basophils activated by *A. fumigatus* allergens was revealed ( $r = 0.77$ ;  $p < 0.05$ ). FVC values and the body mass index in CF patients with ABPA were significantly lower when compared with the patients without fungal sensitization. Introduction of the basophil activation test, along with standard techniques, may enable a more differentiated assessment of ABPA development in CF patients. Timely detection of associations between *A. fumigatus* sensitization and clinical status of CF patients will facilitate early and effective administration of specific therapy.

**Keywords:** basophil activation test, *Aspergillus spp.*, *Aspergillus fumigatus*, allergic bronchopulmonary aspergillosis, cystic fibrosis, fungal sensitization

## Введение

Муковисцидоз (МВ) — частое моногенное заболевание, обусловленное мутацией гена трансмембранного регулятора МВ (МВТР), который является каналом для активного перемещения ионов хлора, а также регулятором обратного всасывания ионов натрия, и характеризующееся поражением экзокринных желез жизненно важных органов и систем [2, 13].

Больные МВ представляют одну из самых тяжелых категорий пульмонологических пациентов. Поражение легких при МВ, в основе которого лежит хронический инфекционный процесс, по-прежнему остается основной причиной смертности больных. Отсутствие или недостаточность МВТР в бронхолегочном эпителии способствует продукции большого количества вязкого слизистого секрета. Это обеспечивает

благоприятные условия для колонизации дыхательных путей различными патогенными микроорганизмами, в том числе и плесневыми микроорганизмами [8, 11].

Роль бактериальных патогенов при МВ довольно хорошо изучена. Наряду с распространенными возбудителями, такими как *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* и *Pseudomonas aeruginosa*, в последние годы все большее клиническое значение приобретают плесневые микроорганизмы. Частота выделения микроорганизмов из респираторных субстратов больных МВ варьирует от 6 до 57% [26]. Особое внимание исследователи уделяют широкому спектру заболеваний, ассоциированных с грибами рода *Aspergillus*.

Аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА) — наиболее часто встречающаяся форма аспергиллеза у больных муковисцидозом [13, 15, 24]. АБЛА поражает от 2 до 15% больных МВ и существенно отягощает основное заболевание [4, 19]. Для классической клинической картины АБЛА характерно наличие транзиторных или персистирующих инфильтратов в легких, болей в грудной клетке, бронхоэктазов, формирование легочного фиброза и дыхательной недостаточности. Заболевание обычно протекает хронически, с периодическими обострениями бронхообструктивного синдрома и/или эозинофильной пневмонии [3].

Диагностика АБЛА при муковисцидозе сложна, поскольку многие диагностические критерии пересекаются с типичными проявлениями основного заболевания. Недавние исследования показывают, что сенсibilизация к *A. fumigatus* связана с более существенным снижением функции легких и увеличением частоты легочных обострений у больных МВ [5, 14, 23]. Поэтому раннее выявление микогенной сенсibilизации чрезвычайно важно для своевременного установления диагноза АБЛА и назначения адекватной терапии, которая предотвратит прогрессирование поражения легких.

**Цель исследования** — изучение возможности применения теста активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* в условиях *in vitro* с использованием проточной цитометрии для выявления микогенной сенсibilизации у больных муковисцидозом.

## Материалы и методы

Обследовали 190 больных МВ в возрасте от 1 до 37 лет (медиана — 14 лет): мужчин — 96, женщин — 94, из них детей — 130, взрослых — 60.

Обследование больных включало сбор анамнестических данных (первые симптомы заболевания и время их появления, динамика развития, возможный контакт с плесневыми грибами дома

или на работе), а также оценку результатов общеклинических, лабораторных, инструментальных методов диагностики.

Микологическое обследование включало микроскопию и культуральное исследование образцов респираторных биосубстратов: мокрота, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ). При микроскопии использовали нативный препарат или окраску калькофлюором белым, отмечали наличие септированного мицелия, ветвящегося под углом 45°. Материал засеивали на среду Сабуро, посеы инкубировали при 37 °С в течение 10 дней. Полученные культуры грибов рода *Aspergillus* идентифицировали по морфологическим признакам.

Аллергологическое обследование включало кожное тестирование с 6 грибковыми аллергенами: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Candida* (Allergopharma, Германия). Методом иммуноферментного анализа определяли уровень общего IgE (ООО «Полигност», Россия) и специфических IgE (sIgE) к грибковым аллергенам (панель биотинилированных аллергенов «Алкор Био», Россия) в сыворотке крови.

Для выявления микогенной сенсibilизации дополнительно 10 больным МВ с АБЛА и 10 больным МВ без АБЛА провели тест активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* («Алкор Био», Россия).

Кровь для теста активации базофилов забирали натошак из кубитальной вены. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. Постановку исследуемых проб осуществляли в течение 1–2 часов от момента забора крови. Изучение активации базофилов проводили методом проточной цитометрии с использованием набора Allergenicity kit (Cellular Analysis of Allergy, Beckman Coulter, США). Идентификацию базофилов осуществляли с помощью маркеров CD3-CRTH2<sup>+</sup> (CRTH2-хемоаттрактантный рецептор, который присутствует как на Th2, так и на базофилах), а выявление активации базофилов — по увеличению содержания клеток с высокой экспрессией CD203c. Методика теста активации базофилов Allergenicity kit: образцы цельной периферической крови окрашивали тройным коктейлем моноклональных антител CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7 в присутствии буферного раствора (отрицательный контроль) или моноклональных антител к IgE (положительный контроль), или аллергена *A. fumigatus* в течение 15 минут при 37 °С в темноте. Далее проводили лизис эритроцитов лизирующим фиксирующим реагентом, входящим в набор Allergenicity kit. В каждой пробе оценивали 500 базофилов методом проточной цитометрии в мультипараметрическом протоколе с многоэтапным гейтированием.

Таким образом, у каждого пациента исследовали спонтанную активацию базофилов — долю клеток  $CD3^+CRTH2^+CD203c^{++}$  от общего количества базофилов в пробе с буферным раствором, что позволяет разграничить уровень экспрессии молекул покоящихся клеток по сравнению с состоянием активации клетки. Проведение положительного контроля, обеспечивающего неспецифическую активацию базофилов, необходимо для исключения ложноотрицательных реакций и повышения специфичности метода. Для специфической стимуляции базофилов в работе использовали аллерген *A. fumigatus* («Алкор Био», Россия). Оптимальная концентрация аллергена была определена в предыдущих исследованиях [1].

Для оценки уровня активации базофилов по экспрессии  $CD203c$  в ответ на инкубацию с аллергеном использовали индекс стимуляции (ИС). ИС — отношение процента активированных базофилов в пробе с аллергеном к проценту их спонтанной активации в нестимулированном контроле.

Для изучения функции внешнего дыхания использовали спирометрию методом выполнения петли «объем-поток» с компьютерной обработкой результатов исследования. Учитывали следующие показатели: объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ). По показаниям выполняли компьютерную томографию (КТ) легких в режиме высокого разрешения.

Для выявления микогенной сенсibilизации использовали критерий, предложенный международными экспертами ISHAM: положительный кожный прик-тест ( $\geq 3$  мм) и/или выявление в сыворотке крови уровня специфического IgE к грибковому аллергену, соответствующего классу 1 и выше ( $\geq 0,35$  Ед/мл) [3].

Диагноз аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА) устанавливали на основании критериев Stevens и соавт. [25].

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA 10. Данные представляли в виде медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ). Для оценки различий между независимыми выборками применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Корреляции были проверены с помощью теста Спирмена. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Частота микогенной сенсibilизации у больных МВ по положительным результатам кожных прик-тестов и/или выявлению sIgE к аллергенам плесневых грибов в сыворотке крови со-

ставляла 57%. Гиперчувствительность к *Aspergillus* spp. выявлена у 51 больного (27%). Частота сенсibilизации к остальным микромицетам составила: *Candida* spp. — 73%, *Alternaria* spp. — 34%, *Rhizopus* spp. — 20%, *Penicillium* spp. — 10%, *Cladosporium* spp. — 6%.

На основании результатов комплексного обследования АБЛА установлен у 11 (5,7%) больных МВ. При микологическом исследовании респираторных субстратов у 9 больных выявлен рост *A. fumigatus*, у 2 — рост *A. niger*.

Тест активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* выполнили 10 больным АБЛА в возрасте от 6 до 31 года, медиана — 17,0 (10,0–21,0); мужчин — 6 (60%), женщин — 4 (40%). Контрольную группу составили 10 больных МВ без микогенной сенсibilизации в возрасте от 18 до 60 лет, медиана — 26,0 (23,0–29,0); мужчин — 7 (70%), женщин — 3 (30%). Как видно из приведенных данных, группы не отличались между собой по полу, однако возраст был достоверно меньше у больных МВ с АБЛА. Клинические характеристики групп представлены в таблице 1.

У всех обследованных больных была смешанная форма МВ с тяжелым и среднетяжелым течением. Следует отметить, что индекс массы тела больных МВ с АБЛА составил 16,8 (16,0–18,0) и был достоверно ниже, чем в группе сравнения ( $p = 0,003$ ).

При исследовании функции внешнего дыхания значения ОФВ1 в обследованных группах не отличались, однако больные МВ с АБЛА демонстрировали достоверно более низкие показатели ФЖЕЛ ( $p = 0,006$ ).

Микробиологические исследования образцов мокроты выявили наличие грибов рода *Aspergillus* у всех больных МВ с АБЛА и отсутствие колонизации плесневыми грибами у больных МВ без АБЛА. Случаи инфицирования *S. aureus* и *P. aeruginosa* регистрировали одинаково часто у больных обеих групп.

Иммунологические показатели групп больных представлены в таблице 2. У больных МВ с АБЛА абсолютное количество эозинофилов было 0,41 (0,14–0,60)  $\times 10^9$ /л, а уровни общего IgE и sIgE к *A. fumigatus* составили 601 (459–702) МЕ/мл и 3,62 (1,40–5,91) МЕ/мл соответственно. Эти показатели у больных МВ без АБЛА были достоверно ниже ( $p < 0,05$ ). Представленные данные подтверждают наличие персистирующего аллергического воспаления за счет активации Т-хелперов 2-го типа (Th2) иммунного ответа при развитии АБЛА.

Установлено, что спонтанная активация базофилов не различалась у больных МВ с АБЛА и больных МВ без АБЛА. Неспецифическая активация базофилов выявила, что больший про-

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

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

| Показатели<br>Indicators   | МВ с АБЛА<br>CF with ABPA<br>(n = 10) | МВ без АБЛА<br>CF without ABPA<br>(n = 10) | p         |
|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|
| Возраст, лет<br>Age, years | 17,0<br>(10,0-211,0)                  | 26,0<br>(23,0-29,0)                        | p = 0,012 |
| Пол, м/ж<br>Male, m/f      | 6/4                                   | 7/3                                        | —         |
| ИМТ<br>BMI                 | 16,8<br>(16,0-18,0)                   | 18,6<br>(18,0-20,4)                        | p = 0,003 |
| ФЖЕЛ, %<br>FVC, %          | 60,0<br>(40,0-67,0)                   | 70,0<br>(67,0-76,0)                        | p = 0,006 |
| ОФВ1, %<br>FEV1, %         | 44,0<br>(24,0-55,0)                   | 47,5<br>(45,0-51,0)                        | p = 0,145 |

ТАБЛИЦА 2. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ, Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

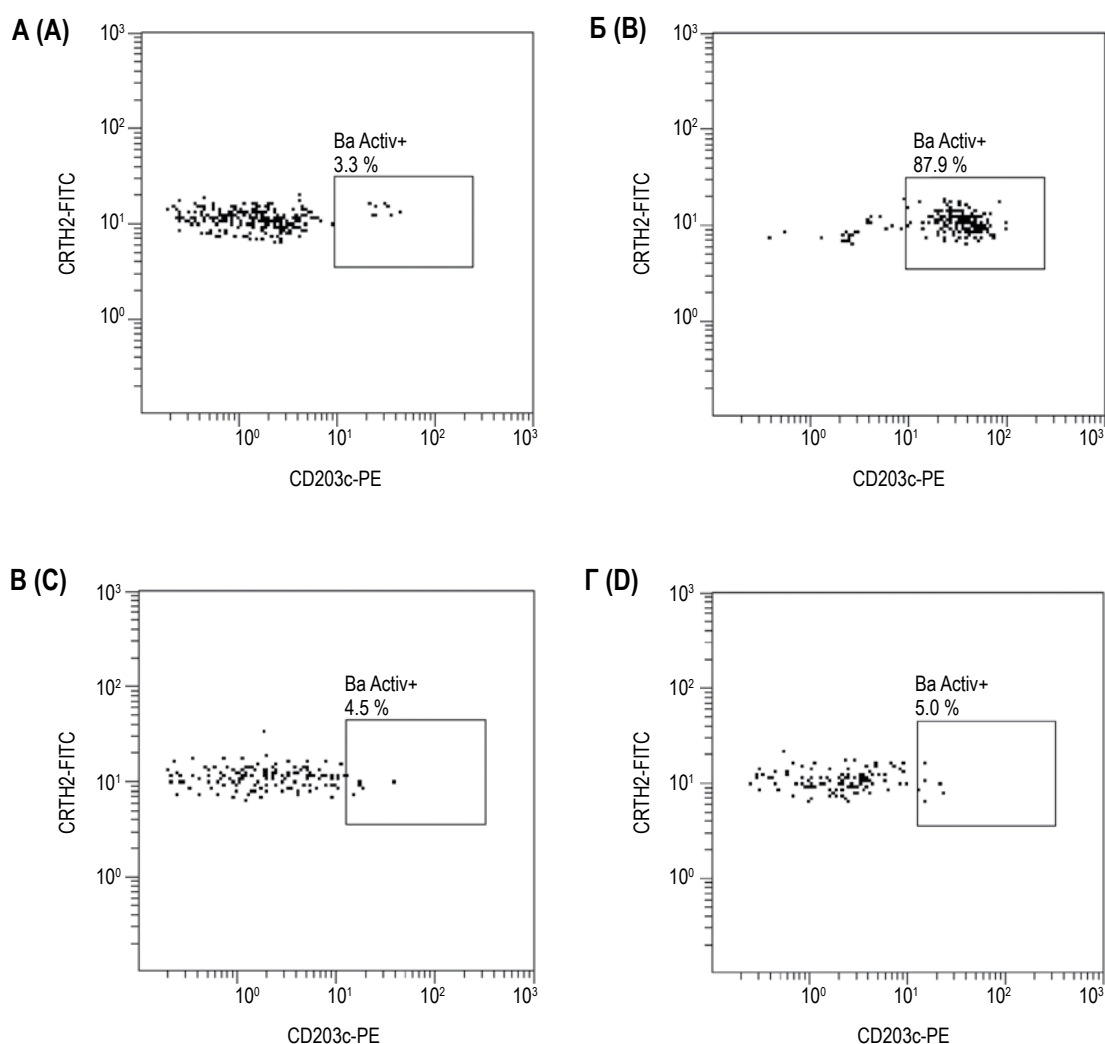
TABLE 2. IMMUNOLOGICAL INDICATORS OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

| Показатели<br>Indicators                                                                                                         | МВ с АБЛА<br>CF with ABPA<br>(n = 10) | МВ без АБЛА<br>CF without ABPA<br>(n = 10) | p         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|
| IgE общий, МЕ/мл<br>IgE total, IU/ml                                                                                             | 601,0<br>(459,0-702,0)                | 22,5<br>(4,0-33,0)                         | p = 0,000 |
| sIgE <i>Aspergillus</i> , МЕ/мл<br>IU/ml                                                                                         | 3,62<br>(1,40-5,91)                   | 0,02<br>(0,01-0,03)                        | p = 0,000 |
| Эозинофилы, %<br>Eosinophils, %                                                                                                  | 5,0<br>(1,0-9,0)                      | 2,0<br>(0,0-3,0)                           | p = 0,021 |
| Эозинофилы, $\times 10^9$ /л<br>Eosinophils, $\times 10^9$ /l                                                                    | 0,41<br>(0,14-0,60)                   | 0,12<br>(0,00-0,20)                        | p = 0,009 |
| Спонтанная активация<br>базофилов, %<br>Spontaneous basophil<br>activation, %                                                    | 3,70<br>(2,20-4,80)                   | 6,30<br>(4,80-10,50)                       | p = 0,050 |
| Активация базофилов<br>анти-IgE-антителами, %<br>Activation of basophils with<br>anti-IgE antibodies, %                          | 72,25<br>(55,20-86,30)                | 46,00<br>(44,40-48,50)                     | p = 0,000 |
| Количество базофилов<br>активированных<br><i>A. fumigatus</i> , %<br>The number of <i>A. fumigatus</i><br>activated basophils, % | 68,50<br>(52,50-81,50)                | 5,95<br>(3,80-7,90)                        | p = 0,002 |
| Индекс стимуляции<br>Stimulation index                                                                                           | 17,07<br>(10,30-27,70)                | 0,95<br>(0,70-1,10)                        | p = 0,000 |

цент базофилов у больных АБЛА по сравнению с контрольной группой активируется анти-IgE-антителами (p = 0,000).

В крови больных МВ с АБЛА определено от 6,2 до 94,1% базофилов, активированных аллергеном *A. fumigatus*. ИС колебался от 3,9 до 39,4

и составил 17,07 (10,30-27,70). В группе сравнения установлено достоверно более низкое количество сенсibilизированных базофилов, ИС был 0,95 (0,70-1,10) (p = 0,000). Данные теста активации базофилов больного МВ с АБЛА представлены на рисунке 1.



**Рисунок 1. Тест активации базофилов у больных МВ**

**Примечание.** Больной К. (А, Б) и больной М. (В, Г) на этапе итогового гейтирования базофилов ( $CD3^+CRTH2^+CD203c^+$ ) после спонтанной (А, В) или специфической (*A. fumigatus*) (Б, Г) активации. Высокий процент активированных базофилов (Б) подтверждает наличие сенсibilизации.

Figure 1. Basophil activation test in patients with cystic fibrosis

Note. Patient K. (A, B) and Patient M. (B, D) at the final basophil gating ( $CD3^+CRTH2^+CD203c^+$ ) after the spontaneous (A, C) or specific (*A. fumigatus*) (B, D) activation. High percentage of the activated basophils (b) confirms the sensibility.

Таким образом, исследованные группы больных различались как по содержанию sIgE к *A. fumigatus* в сыворотке крови, так и по количеству активированных аллергеном базофилов, что подтверждается данными корреляционного анализа. Установлена прямая положительная корреляционная связь между уровнями sIgE к *A. fumigatus* и количеством базофилов, активированных аллергеном *A. fumigatus* ( $r = 0,77$ ;  $p < 0,05$ ).

## Обсуждение

Микогенная сенсibilизация — важный патогенетический этап в развитии АБЛА. В насто-

ящее время широко изучается связь колонизации плесневыми грибами верхних дыхательных путей у больных бронхиальной астмой с развитием микогенной сенсibilизации. Установлена высокая частота выделения грибов рода *Aspergillus* из мокроты у сенсibilизированных пациентов [20]. Однако существует ограниченное количество исследований, посвященное этой проблеме у больных МВ. Так, в исследовании С. Baxter и соавт. не установлено корреляции между колонизацией дыхательных путей грибами и сенсibilизацией к *A. fumigatus* [5]. В нашей работе у всех больных МВ с АБЛА при посеве мокроты выявили рост грибов рода *Aspergillus*. Можно предположить,

что противоречивость данных связана с методологическими различиями в определении сенсibilизации, колонизации и микробиологических методах.

Результаты многочисленных исследований указывают, что сенсibilизация к *A. fumigatus* ассоциирована с более выраженными изменениями функции легких [5, 23]. Как и ряд других авторов, мы показали, что персистирующее присутствие *A. fumigatus* в дыхательных путях больных МВ связано с радиологическими аномалиями, включая более тяжелую бронхоэктазию, и оказывает влияние на легочную функцию [14, 21]. У больных МВ с АБЛА достоверно ниже показатели ФЖЕЛ по сравнению с контрольной группой.

Данные о частоте микогенной сенсibilизации у больных МВ варьируют в широких пределах. Метаанализ 64 исследований показал, что частота сенсibilизации к *Aspergillus* spp. в этой группе больных составляет 39,1% [19].

Частота микогенной сенсibilизации у больных МВ в нашем исследовании составила 57%, гиперчувствительность к *Aspergillus* spp. выявлена у 27% обследованных, что сопоставимо с результатами других исследований.

Для подтверждения микогенной сенсibilизации использовали определение sIgE и тест активации базофилов (БАТ). В данном исследовании мы сосредоточили внимание на маркере активации базофилов CD203c в качестве индикатора сенсibilизации к *A. fumigatus*.

Базофилы периферической крови и тканевые тучные клетки являются ключевыми эффекторными клетками в реакциях гиперчувствительности немедленного типа. Они участвуют в дифференцировке Th2-путем секреции цитокинов и антигенной презентации, что имеет большое значение в развитии IgE-опосредованного хронического аллергического воспаления, и играют ключевую роль в IgG-опосредованной системной анафилаксии [16]. Кроме того, базофилы и тучные клетки могут быть вовлечены и в другие типы аллергического и неаллергического ответов, в основе которых лежат иные механизмы реакции: активация комплемента, не-IgE-опосредованная стимуляция и прямое цитотоксическое (неиммунологическое) воздействие. Таким образом, изучение функциональной активности базофилов имеет важное диагностическое значение [17]. Принцип теста активации базофилов сводится к тому, что при контакте аллергена с молекулами IgE, фиксированных на базофилах, запускается каскад ферментных реакций, приводящих к дегрануляции и появлению на клеточной поверхности дополнительных молекул. К таким молекулам относятся, например, маркер дегрануляции CD63 и активационные молекулы

CD203c, CD13, CD107a, CD643 [7]. В настоящее время наиболее изученными и перспективными в аллергодиагностике маркерами активации базофилов являются CD63 и CD203c [6, 7].

Особенностью проведения исследования является то, что БАТ с аллергеном *A. fumigatus* можно выполнять менее чем за 2 часа, используя небольшой объем цельной периферической крови. Это можно сделать в том же образце крови, который получен для других иммунологических исследований, что существенно уменьшает дискомфорт для пациента. Выявление sIgE к *A. fumigatus* в сыворотке крови и проведение кожной пробы считают «золотыми стандартами» в рутинном обследовании больных и частью установленных критериев для диагностики АБЛА у больных МВ [20]. Тем не менее оба этих теста имеют недостатки.

Измерение уровней sIgE к *A. fumigatus* — это легкодоступный тест для врача и удобный для пациента. Однако иммуноглобулины этого класса характеризуются низким содержанием в сыворотке крови, а также могут отсутствовать в циркуляции, но быть фиксированными на клетках-мишенях: базофилах и тучных клетках [16]. В ряде работ было показано, что уровни sIgE со временем меняются и должны быть интерпретированы совместно с другими клиническими и лабораторными данными, чтобы установить диагноз [9]. Кроме того, высокий уровень общего IgE у больных может приводить к ложноположительным результатам вследствие неспецифического реагирования с аллергеном.

Диагностика микогенной аллергии *in vivo* подразумевает выполнение кожных проб в виде прик-тестов. К недостаткам кожного тестирования относят риск развития побочных реакций организма на дополнительную антигенную нагрузку, возможность возникновения ложноположительных и ложноотрицательных результатов [22]. Кожные пробы могут быть субъективными для лечащего врача и трудными для интерпретации [8].

Однако, как определение sIgE, так и результаты кожных проб показывают лишь наличие сенсibilизации у пациентов, но не всегда клиническую значимость диагностируемого аллергена. В то же время БАТ является функциональным тестом, который представляет собой провокационную пробу, но выполненную *ex vivo*, в пробирке. БАТ является специфической и надежной мерой IgE-зависимого ответа у сенсibilизированных субъектов, потому что базофилы циркулируют в крови, и усиление экспрессии маркеров активации на поверхности базофилов легко оценить с помощью проточной цитометрии. В проведенном нами исследовании у всех больных АБЛА

с помощью БАТ подтверждена сенсibilизация к *A. fumigatus* и установлена прямая положительная корреляционная связь между уровнями sIgE к *A. fumigatus* и количеством базофилов, активированных аллергеном *A. fumigatus* ( $r = 0,77$ ;  $p < 0,05$ ). Важное значение БАТ в диагностике АБЛА также подтвердили ирландские ученые. Опубликована новая классификация, в которой критериями АБЛА у больных МВ предлагают считать сочетание значения индекса стимуляции БАТ, индуцированного *A. fumigatus*  $> 1,36$  с повышенным уровнем сывороточного sIgE  $> 1,45$  МЕ/мл и общим уровнем IgE  $> 185$  МЕ/мл [20].

В. Mirković и соавт. в своей работе показали, что применение итраконазола у больных МВ с колонизацией *A. fumigatus* снижает грибковую нагрузку, но не изменяет уровни экспрессии CD203c на базофилах, стимулированной *A. fumigatus* [20]. Это указывает на то, что эрадикация конидий грибов из дыхательных путей не влияет на микогенную сенсibilизацию, а БАТ можно использовать на фоне антимикотической терапии. В настоящее время необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение влияния системных глюкокортикостероидов, моноклональных антител против IgE, IL-5,

IL-13 на число сенсibilизированных базофилов с маркером CD203c у больных МВ с АБЛА.

Однако не только сенсibilизация к *A. fumigatus* ухудшает течение основного заболевания у больных МВ, а также множество факторов, включая продолжительность воздействия микромицетов, вязкость слизи, особенности перестройки иммунного ответа и возраст [8, 12, 20]. Другие факторы, такие как HLA-DR/HLA-DQ подтипы и наличие единичных нуклеотидных полиморфизмов в сайте связывания IL-4 его рецептором на клетках, были описаны как predisposing факторы к развитию АБЛА [18]. Таким образом, чтобы прогнозировать развитие АБЛА, необходимы более длительные периоды наблюдения за больными из групп риска и оценка различных показателей в динамике.

## Заключение

Благодаря тесту активации базофилов у практикующего врача появились новые возможности диагностики различных видов аллергии, в том числе микогенной аллергии. Использование БАТ в комплексном обследовании больных МВ будет способствовать более оперативному выявлению АБЛА, что позволит своевременно начать таргетную терапию.

## Список литературы / References

1. Козлова Я.И., Учеваткина А.Е., Бычкова Н.С., Филиппова Л.В., Аак О.В., Пятакова А.В., Фролова Е.В., Давыдова Н.И., Клишко Н.Н. Тест активации базофилов в диагностике аллергического бронхолегочного аспергиллеза // Проблемы медицинской микологии, 2016. Т. 18, № 3. С. 7-11. [Kozlova Ya.I., Uchevatkina A.E., Bychkova N.V., Filippova L.V., Aak O.V., Pyatukova A.V., Frolova E.V., Davydova N.I., Klimko N.N. Basophil activation test in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Problemy meditsinskoy mikologii = Problems in Medical Mycology*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 7-11. (In Russ.)]
2. Красовский С.А., Самойленко В.А., Амелина Е.Л. Муковисцидоз: диагностика, клиника, основные принципы терапии // Пульмонология и аллергология, 2013. № 1. С. 42-46. [Krasovsky S.A., Samoylenko V.A., Amelina E.L. Cystic fibrosis: Diagnosis, clinic, basic principles of therapy. *Pulmonologiya i allergologiya = Pulmonology and Allergology*, 2013, no. 1, pp. 42-46. (In Russ.)]
3. Agarwal R., Chakrabarti A., Shah A., Gupta D., Meis J.F., Guleria R., Moss R., Denning D.W. For the ABPA complicating asthma ISHAM working group 2013. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin. Exp. Allergy*, 2013, Vol. 43, no. 8, pp. 850-873.
4. Baxter C.G., Dunn G., Jones A.M., Webb K., Gore R., Richardson M.D., Denning D.W. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, no. 3, pp. 560-566.
5. Baxter C.G., Moore C.B., Jones A.M., Webb A.K., Denning D.W. IgE-mediated immune responses and airway detection of *Aspergillus* and *Candida* in adult cystic fibrosis. *Chest*, 2013, Vol. 143, no. 5, pp. 1351-1357.
6. Boumiza R., Debard A.L., Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: Recent development in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin. Mol. Allergy*, 2005, no. 3, pp. 9-13.
7. Chirumbolo S., Vella A., Ortolani R., de Gironcoli M., Solero P., Tridente G., Bellavite P. Differential response of human basophil activation markers: a multiparameter flow cytometry approach. *Clin. Mol. Allergy*, 2008, no. 6, pp. 12-16.
8. Chotirmall S.H., McElvaney N.G. Fungi in the cystic fibrosis lung: Bystanders or pathogens? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2014, no. 52, pp. 161-173.
9. Chirumbolo S.H. Basophil activation test in allergy: time for an update? *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2012, no. 158, pp. 99-114.
10. Chotirmall S.H., Branagan P., Gunaratnam C., McElvaney N.G. *Aspergillus*/allergic bronchopulmonary aspergillosis in an Irish cystic fibrosis population: A diagnostically challenging entity. *Respir. Care*, 2012, Vol. 53, no. 8, pp. 1035-1041.



11. Delhaes L., Monchy S., Fréalle E., Hubans C., Salleron J., Leroy S., Prevotat A., Wallet F., Wallaert B., Dei-Cas E., Sime-Ngando T., Chabé M., Viscogliosi E. The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community – implications for therapeutic management. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 4, e36313. doi: 10.1371/journal.pone.0036313.
12. Denning D.W., Pashley C., Hartl D., Wardlaw A., Godet C., del Giacco S., Delhaes L., Sergejeva S. Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs. *Clin. Transl. Allergy*, 2014, Vol. 4, p. 14.
13. Farrell Ph.M., White T.B., Ren Cl.L., Hempstead S.E., Accurso F., Derichs N., Howenstine M., McColley S.A., Rock M., Rosenfeld M., Sermet-Gaudelus I., Southern K.W., Marshall B.C., Sosnay P.R. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J. Pediatr.*, 2017, Vol. 181, pp. 4-15.
14. Fillaux J., Bremont F., Murris M., Cassaing S., Rittie J-L., Tetu L., Segonds C., Abbai M., Bieth E., Berry A., Pipy B., Magnaval J-F. Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2012, Vol. 44, no. 11, pp. 842-847.
15. Janahi I.A., Rehman A., Al-Naimi A.R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Ann. Thorac. Med.*, 2017, Vol. 12, no. 2, pp. 74-82.
16. Karasuyama H., Tsujimura Y., Obata K., Mukai K. Role for basophils in systemic anaphylaxis. *Anaphylaxis. Chem. Immunol. Allergy*, 2010, Vol. 95, pp. 85-97.
17. Kang M.G., Song W.J., Park H.K., Lim K.H., Kim S.J., Lee S.Y., Kim S.H., Cho S.H., Min K.U., Chang Y.S. Basophil activation test with food additives in chronic urticaria patients. *Clin. Nutr. Res.*, 2014, Vol. 3, no. 1, pp. 9-16.
18. Knutsen A.P., Kariuki B., Consolino J.D., Warrier M.R. IL-4 alpha chain receptor (IL-4R alpha) polymorphisms in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin. Mol. Allergy*, 2006, no. 4, p. 3.
19. Maturu V.N., Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: Systematic review and meta-analysis. *Clin. Exp. Allergy*, 2015, Vol. 45, no. 12, pp. 1765-1778.
20. Mircovic B., Lavelle G.M., Abdul Azim A., Helma K., Gargoum F.S., Molloy K., Gernez Y., Dunne K., Renwick J., Murphy P., Moss R.B., Greene C.M., Gunaratnam C., Chotirmall S.H., McElvaney N.G. The Basophil surface marker CD203c identifies *Aspergillus* species sensitization in patients with cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 137, no. 2, pp. 436-443.
21. McMahon M.A., Chotirmall S.H., McCullagh B., Branagan P., McElvaney N.G., Logan P.M. Radiological abnormalities associated with *Aspergillus* colonization in a cystic fibrosis population. *Eur. J. Radiol.*, 2012, Vol. 81, no. 3, pp. e197-202.
22. Oppenheimer J., Nelson H.S. Skin testing. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2006, Vol. 96, no. 2, pp. 6-12.
23. Peetermans M., Goeminne P., de Boeck C., Dupont L.J. IgE sensitization to *Aspergillus fumigatus* is not a bystander phenomenon in cystic fibrosis lung disease. *Chest*, 2014, Vol. 146, pp. 99-100.
24. Sabino R., Ferreira J.A.G., Moss R.B., Valente J., Veríssimo C., Carolino E., Clemons K.V., Everson C., Banaei N., Penner J., Stevens D.A. Molecular epidemiology of *Aspergillus* collected from cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.*, 2015, Vol. 14, pp. 474-481.
25. Stevens D. A., Moss R.B., Kurup V.P., Knutsen A.P., Greenberger P., Judson M.A., Denning D.W., Cramer R., Brody A.S., Light M., Skov M., Maish W., Mastella G. Participants in the Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis – state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, Vol. 37, Suppl. 3, pp. 225-264.
26. Williams C., Ranjendran, R., Ramage G. Pathogenesis of fungal infections in cystic fibrosis. *Curr. Fungal Infect. Rep.*, 2016, Vol. 10, pp. 163-169.

---

**Авторы:**

**Козлова Я.И.** — к.м.н., доцент кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

**Фролова Е.В.** — к.м.н., заведующая НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

**Учеваткина А.Е.** — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

---

**Authors:**

**Kozlova Ya.I.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Frolova E.V.**, PhD (Medicine), Head, Research Laboratory of Immunology and Allergy, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Uchevatkina A.E.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Immunology and Allergy, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Филиппова Л.В.** — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

**Аак О.В.** — к.х.н., ведущий научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

**Богомолова Т.С.** — к.б.н., заведующая НИЛ микологического мониторинга и биологии грибов ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

**Борзова Ю.В.** — к.м.н., заведующая микологической клиникой ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

**Махмутова В.Р.** — врач-пульмонолог, Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия

**Степаненко Т.А.** — к.м.н., заведующая пульмонологическим отделением, Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия

**Кузнецов В.Д.** — ординатор кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

**Васильева Н.В.** — д.б.н., профессор, директор НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

**Шульгина М.В.** — д.б.н., заместитель директора НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

**Климко Н.Н.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

**Filippova L.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Immunology and Allergy, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Aak O.V.**, PhD (Chemistry), Leading Research Associate, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Bogomolova T.S.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Mycological Monitoring and Fungal Biology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Borzova Yu.V.**, PhD (Medicine), Head, Mycological Clinic, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Makhmutova V.R.**, Clinical Pulmonologist, Multidisciplinary City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

**Stepanenko T.A.**, PhD (Medicine), Head, Pulmonary Department, Multidisciplinary City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

**Kuznetsov V.D.**, Clinical Resident, Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Vasilyeva N.V.**, PhD, MD (Biology), Professor, Director, P. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Shulgina M.V.**, PhD, MD (Biology), Professor, Deputy Director, P. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Klimko N.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 12.01.2019  
Отправлена на доработку 04.03.2019  
Принята к печати 22.03.2019

Received 12.01.2019  
Revision received 04.03.2019  
Accepted 22.03.2019

# СИНУСОИДАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ И ЦИТОКИНОВЫЙ ОТВЕТ ПРИ ТЕТРАХЛОРМЕТАН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ И СПОСОБ ЕЕ КОРРЕКЦИИ

Шафигуллина З.А.<sup>1,2</sup>, Данилова И.Г.<sup>1,2</sup>, Медведева С.Ю.<sup>1,2</sup>,  
Черешнев В.А.<sup>1,2</sup>, Абидов М.Т.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,  
г. Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,  
г. Екатеринбург, Россия

**Резюме.** Высокая распространенность заболеваний печени (токсические, вирусные гепатиты, печеночная недостаточность, цирроз) делает актуальным поиск новых методов лечения заболеваний гепатобилиарной системы. На сегодняшний день окончательно не выяснена роль иммунных механизмов в патогенезе развития диффузного токсического повреждения печени. Модель токсического гепатита, индуцированная тетрахлорметаном (CCl<sub>4</sub>), широко известна, но, несмотря на это, именно экспериментальные модели позволяют дать комплексную оценку и разработать методы адекватной коррекции нарушений печени, что не всегда возможно в клинической практике.

Для создания модели диффузного токсического повреждения печени использовали масляный раствор CCl<sub>4</sub>, который вводили животным экспериментальных групп однократно внутривенно в дозе 50 мг/100 г массы тела. Инъекции аминофталгидрида (АФГ) экспериментальным животным с целью коррекции токсического повреждения печени осуществлялись в течение всего эксперимента внутримышечно из расчета 2 мг/кг.

На модели токсического повреждения печени CCl<sub>4</sub> и его коррекции АФГ проведена оценка роли синусоидальных клеток (СК) и продукции цитокинов на локальном и системном уровне. В ответ на диффузное токсическое повреждение печени на локальном уровне усиливается продукция провоспалительных цитокинов TNFα, IL-1α и IL-18, тогда как в плазме крови зафиксировано увеличение концентрации только TNFα. На фоне введения АФГ снижается концентрация провоспалительных цитокинов TNFα и IL-18 на системном уровне, а локально снижается уровень IL-6 и IFNγ.

Изменения функционального состояния иммунокомпетентных клеток, к числу которых относятся СК, оказывают существенное влияние на развитие патологических процессов в печени. Результаты проведенного нами исследования подтверждают тот факт, что в ранние сроки токсического воздействия в ткани печени возрастает количество СК, в том числе за счет притока моноцитов крови или за счет зрелых макрофагов перитонеальной полости, поступающих через мезотелий непосредственно к месту повреждения. СК осуществляют фагоцитоз поврежденных гепатоцитов и способствуют разрешению воспалительного процесса.

Модуляция активности макрофагов АФГ способствует увеличению числа СК в ранние сроки и стабилизирует их количество после 2-недельного применения. Изменение количества СК печени

## Адрес для переписки:

Шафигуллина Злата Александровна  
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»  
Уральского отделения Российской академии наук  
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.  
Тел.: 8 (952) 138-01-57.  
E-mail: zlata\_pyankova@mail.ru

## Address for correspondence:

Shafigullina Zlata A.  
Institute of Immunology and Physiology  
620049, Russian Federation, Ekaterinburg,  
Pervomayskaya str., 106.  
Phone: 7 (952) 138-01-57.  
E-mail: zlata\_pyankova@mail.ru

## Образец цитирования:

З.А. Шафигуллина, И.Г. Данилова, С.Ю. Медведева,  
В.А. Черешнев, М.Т. Абидов «Синусоидальные клетки  
и цитокиновый ответ при тетрахлорметан-  
индуцированной гепатотоксичности и способ ее  
коррекции» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21,  
№ 5. С. 929-936. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-929-936  
© Шафигуллина З.А. и соавт., 2019

## For citation:

Z.A. Shafigullina, I.G. Danilova, S.Yu. Medvedeva,  
V.A. Chereshev, M.T. Abidov "Sinusoidal cells and cytokine  
response in the tetrachloromethane-induced hepatotoxicity  
and an approach to its correction", Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5,  
pp. 929-936. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-929-936  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-929-936

при токсическом повреждении отражается на продукции цитокинов. Вероятно, направленное воздействие на СК посредством АФГ способно изменить продукцию регуляторных факторов и компенсировать недостаточную скорость восстановительных процессов после токсического повреждения.

*Ключевые слова:* синусоидальные клетки, цитокины, тетрахлорметан, диффузное токсическое повреждение печени

## SINUSOIDAL CELLS AND CYTOKINE RESPONSE IN THE TETRACHLOROMETHANE-INDUCED HEPATOTOXICITY AND AN APPROACH TO ITS CORRECTION

Shafigullina Z.A.<sup>a, b</sup>, Danilova I.G.<sup>a, b</sup>, Medvedeva S.Yu.<sup>a, b</sup>,  
Chereshnev V.A.<sup>a, b</sup>, Abidov M.T.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> B. Eltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** High occurrence of liver diseases (toxic, viral hepatitis, liver failure, cirrhosis) requires urgent search of new methods for management of the hepatobiliary diseases. At the present time, the role of immune mechanisms in pathogenesis of diffuse toxic liver damage is not finally clarified. The model of toxic hepatitis induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) is widely known, but this approach allows us to perform complex evaluation and develop the methods for adequate correction of liver disorders in experimental model, which is not always feasible in clinical setting.

To design a model of diffuse toxic liver damage, the CCl<sub>4</sub> oil solution was used, having been administered intraperitoneally to experimental animals, at a single dose of 50 mg per 100 g body mass. Aiming for correction of toxic liver damage, the injections of aminophthalhydrazide (APH) to experimental animals were carried out intramuscularly at the dose of 2 mg/kg over the terms of experiment. An evaluation of the role of sinusoidal cells (SC) and cytokine production at the local and systemic level were carried out in the model of toxic liver damage caused by CCl<sub>4</sub> and its correction by APH treatment. In the course of developing diffuse toxic liver damage induced by CCl<sub>4</sub>, the production of proinflammatory cytokines TNFα, IL-1α and IL-18 was enhanced at the local level, whereas an increase in TNFα concentration was observed in blood plasma. Following aminophthalhydrazide (APH) administration, the concentrations of proinflammatory cytokines (TNFα and IL-18) decreased at system level, along with locally decreased levels of IL-6 and IFNγ.

Changes in the functional state of immunocompetent cells, which include sinusoidal cells (SC), have a significant impact on the development of pathological processes in the liver. The results of our study presume that, over the early periods of toxic impact upon liver tissue, the number of SCs increases both due to influx of blood monocytes and mature macrophages from the peritoneal cavity that enter the injury site directly *via* mesothelial layer. The SCs provide phagocytosis of damaged hepatocytes and contribute to resolution of the inflammatory process.

Modulation of the macrophage activities by APH contributes to increased amounts of SCs at the early stages, and stabilizes their quantities after 2 weeks of APH injections. Change in the numbers of liver SCs during toxic damage affects the production of cytokines. A direct effect of APH upon the SCs may change the production of regulatory factors and compensate the insufficient rate of recovery processes after the toxic damage.

*Keywords:* sinusoidal cells, cytokines, tetrachloromethane, diffuse toxic liver damage

Исследование проведено в рамках бюджетной программы «Изучение механизмов регенераторных процессов в органах и тканях с использованием экспериментальных моделей экстремальных факторов и токсического воздействия на организм», № гос. регистрации — АААА-А18-118020590107-0, «Иммунная система в регуляции физиологических функций в норме

и при патологических процессах» № гос. регистрации — АААА-А18-118020590108-7.

### Введение

В общей структуре заболеваний значительную долю занимают патологии гепатобилиарной системы. Одной из наиболее распространен-

ных причин данных заболеваний является воздействие гепатотоксических агентов. Несмотря на большое количество научных публикаций, до настоящего времени окончательно не выяснена роль иммунных механизмов в патогенезе развития диффузного токсического повреждения печени.

Метаболические нарушения при действии тетрахлорметана ( $CCl_4$ ) способны изменять продукцию про- и противовоспалительных цитокинов клетками иммунной системы. СК печени, большую часть которых составляют макрофаги, принадлежит важная роль как в поддержке воспалительной реакции, так и в регуляции регенерации [4, 11].

Синусоидальные эндотелиальные клетки являются многочисленной непаренхиматозной клеточной популяцией печени и представлены 4 основными разновидностями, имеющими мезенхимальное происхождение: лейкоциты, эндотелиоциты, клетки Ито, клетки Купфера или фиксированные макрофаги [12]. СК выполняют роль «барьера» в печеночных синусоидах, обеспечивают фильтрацию, эндоцитоз, презентацию антигенов и привлечение лейкоцитов к месту повреждения [17].

Основными факторами, регулирующими воспалительный процесс и регенерацию, являются цитокины, локально выделяющиеся клетками моноцитарно-макрофагального ряда в очаг повреждения. Такие цитокины, как  $TNF\alpha$ ,  $IL-1$ ,  $IL-6$ , ростовые факторы HGF, вырабатываемые синусоидальными клетками печени, запускают сигнальные пути трансдукции репликации ДНК (STAT3, MAPK) [8]. Ростовые факторы PDGF, IGF-1, HGF, TGF- $\beta$ , синтезируемые синусоидальными клетками, снижают степень апоптоза гепатоцитов, уменьшают продукцию оксида азота и активных форм кислорода. Вышеперечисленные факторы способны усиливать межклеточные взаимодействия клеток печени, восстанавливать функциональную активность сохранившихся и вновь образованных гепатоцитов [9, 15]. Поиск новых подходов иммунокорректирующей терапии, способной приводить к модификации регенераторного потенциала органа на сегодняшний день остается актуальной задачей.

**Цель исследования** — оценить уровень значимых цитокинов и роль синусоидальных клеток при токсическом повреждении печени и на фоне его коррекции АФГ.

## Материалы и методы

Эксперимент по моделированию диффузного токсического повреждения печени был выполнен на 65 крысах-самцах линии Wistar массой  $180 \pm 10$  г, одобрен локальным этическим коми-

тетом Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (г. Екатеринбург, Россия) и соответствует принципам, сформулированным в Директиве 2010/63/ЕС Европейского парламента и Европейского Совета от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.). Животные, используемые в исследовании, содержались в одинаковых условиях по 5 крыс в клетке на обычном рационе вивария со свободным доступом к пище и воде и температурным режимом  $20 \pm 2$  °C.

Были сформированы следующие экспериментальные группы животных: интактная,  $CCl_4$  3 сутки,  $CCl_4$  7 сутки,  $CCl_4$ , 14 сутки,  $CCl_4$  + АФГ 3 сутки,  $CCl_4$  + АФГ 7 сутки,  $CCl_4$  + АФГ 14 сутки. Для создания модели диффузного токсического повреждения печени использовали  $CCl_4$ , который вводили животным экспериментальных групп однократно внутривентрально в дозе 50 мг/100 г массы тела. Инъекции аминоталгидраза экспериментальным животным осуществлялись в течение всего эксперимента внутримышечно из расчета 2 мг/кг. АФГ обладает противовоспалительными, иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами. Его основные фармакологические эффекты обусловлены способностью воздействовать на функционально-метаболическую активность макрофагов и восстанавливать их антигенпрезентирующую и секреторную функции [13]. К группам с  $CCl_4$ -воздействием и с применением АФГ были сформированы контрольные группы животных, которым вводили аналогичные дозы масляного раствора и 0,85% раствора хлорида натрия соответственно. Интактную группу составляли здоровые животные. Животных опытных групп выводили из эксперимента на 3, 7 и 14 сутки передозировкой диэтилового эфира.

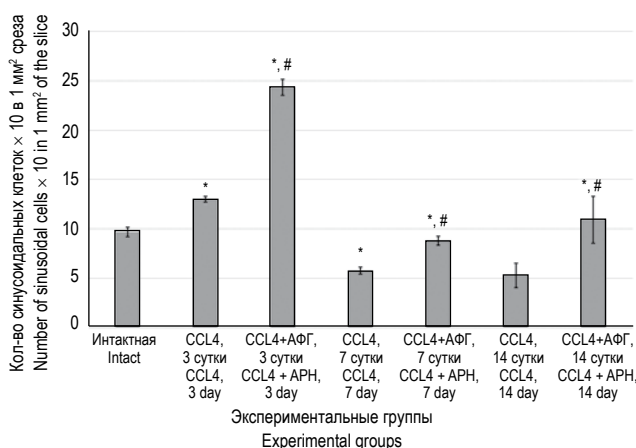
Образцы ткани печени погружали в 10% нейтральный формалин на 24 часа при комнатной температуре. Подготовку образцов для гистологического исследования осуществляли с использованием автоматического процессора Leica EG 1160 с последующей заливкой в парафин [10]. Со срезов толщиной 3–4 мкм удаляли парафин, для этого стекла помещались последовательно в ксилол, в 100% спирт и в растворы с постепенным снижением концентрации спирта до полностью водного раствора. Срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопическое исследование проводили на микроскопе Leica DM 2500, анализ изображений выполняли в программе Leica Application Suite (V4). Подсчет количества СК осуществляли в единице площади в 20-ти полях зрения при увеличении микроскопа  $\times 400$ . Данный показатель позволяет

охарактеризовать вклад СК в регенерацию печени при токсическом повреждении.

Для анализа содержания цитокинов в плазме крови экспериментальных животных производили забор периферической крови, центрифугировали при 3000 об/мин на холоде в течение 15 мин. Подготовка гомогената печени крыс включала гомогенизацию образцов, ресуспендирование с физиологическим раствором (0,85% р-р хлорида натрия) и центрифугирование при 5000 об/мин на холоде в течение 30 мин [1, 18].

Содержание цитокинов в плазме крови и гомогенатах печени крыс определяли методом иммуноферментного анализа с использованием прибора Lazurite Automated ELISA System. Для оценки уровня цитокинов в плазме крови использовали наборы для ИФА (иммуноферментный анализ) фирмы Thermo Scientific: Rat TNF-alpha Platinum ELISA BMS622 TWO/BMS622TEN, Rat IL-6 ELISA Kit BMS625/BMS625 TWO/BMS625 TEN, Rat IL-10 Platinum ELISA BMS629/BMS629 TEN, Rat IL-18 ELISA Kit KRC2341, а для гомогенатов печени, кроме вышеперечисленных, — Rat TGF- $\beta$ 1 Platinum ELISA BMS623/3/BMS623/3TEN, Rat IFN gamma Platinum ELISA BMS621 TWO/BMS621TEN, Rat IL-1 alpha Platinum ELISA BMS627/BMS627TEN.

Статистическая обработка результатов эксперимента выполнена с применением Statistica 10.0. Для сравнения двух независимых групп использован непараметрический критерий Манна–Уитни. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ( $P < 0,05$ ).



**Рисунок 1. Синусоидальные клетки печени в динамике токсического повреждения и на фоне его коррекции**

**Примечание.** \* – различия с интактными животными достоверны при  $p < 0,05$ ; # – различия с группой CCl<sub>4</sub> 3, 7 и 14 сутки достоверны при  $p < 0,05$ .

Figure 1. Sinusoidal liver cells in the dynamics of toxic damage and during of its correction

Note. \*, differences with intact animals are significant at  $p < 0.05$ ; #, differences with CCl<sub>4</sub> group 3, 7 and 14 days are significant at  $p < 0.05$ .

## Результаты

В связи с тем, что в ходе морфометрического анализа и ИФА различий между интактной и контрольными группами животных не было установлено, в дальнейшем представлены результаты только интактной группы.

В соответствии с морфометрическими данными на 3 сутки после введения токсиканта отмечается достоверное увеличение количества СК с  $9,69 \pm 0,48$  кл × 10/мм<sup>2</sup> (интактная группа) до  $13,0 \pm 0,28$  кл × 10/мм<sup>2</sup> (рис. 1).

На 7 и 14 сутки после воздействия CCl<sub>4</sub> наблюдается снижение числа СК не только относительно интактной группы, но и относительно группы CCl<sub>4</sub>, 3 сутки до значения  $5,8 \pm 0,37$  кл × 10/мм<sup>2</sup> и  $5,3 \pm 1,25$  кл × 10/мм<sup>2</sup> соответственно (рис. 1).

Модуляция активности макрофагов АФГ приводит к увеличению количества СК в печени на 3 сутки токсического воздействия, а на 7 и 14 сутки после терапии данный показатель снижается относительно 3 суток, но остается выше, чем в группах без лечения. Следовательно, есть основания полагать, что направленное воздействие на синусоидальные клетки посредством АФГ способно изменить продукцию регуляторных факторов и компенсировать недостаточную скорость восстановительных процессов после токсического повреждения.

Изменение количества синусоидальных клеток печени при токсическом повреждении отражается на продукции цитокинов. Так, при экспериментальном диффузном токсическом повреждении печени на 3 сутки отмечается резкое увеличение плазменной концентрации TNF $\alpha$  до  $922,16 \pm 192,20$  пг/мл по сравнению с показателем интактной группы ( $16,14 \pm 3,09$  пг/мл) (табл. 1).

Повышение уровня TNF $\alpha$  в плазме крови коррелирует с увеличением числа синусоидальных клеток печени на 3 сутки после введения CCl<sub>4</sub>. На 7 сутки токсического воздействия уровень TNF $\alpha$  снижается как относительно показателей интактной группы, так и относительно группы CCl<sub>4</sub> 3 сутки. На 14 суткам после введения токсиканта количество TNF $\alpha$  увеличивается по сравнению с интактной группой и существенно снижается по сравнению с показателями группы CCl<sub>4</sub> 3 сутки (табл. 1). Применение АФГ при токсическом повреждении печени приводит к плавному снижению концентрации TNF $\alpha$  и достигает минимального значения на 14 сутки (табл. 1).

При оценке концентрации IL-6 в плазме крови после воздействия токсиканта во все сроки эксперимента достоверных различий с показателями интактной группы не установлено (табл. 1). Введение АФГ на 3 сутки не приводит к изменению уровня IL-6 в плазме крови, однако в более

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 1. THE CONCENTRATION OF CYTOKINES IN THE BLOOD PLASMA OF EXPERIMENTAL ANIMALS

| Группа /<br>Показатель<br>Group /<br>Parameter             | TNF $\alpha$ , пг/мл<br>pg/ml            | IL-6, пг/мл<br>pg/ml                          | IL-18, пг/мл<br>pg/ml              | IL-10, пг/мл<br>pg/ml                     |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------|
| Интактная<br>Intact (a)                                    | 16,14 $\pm$ 3,09                         | 39,06 $\pm$ 7,69                              | 5,97 $\pm$ 1,72                    | 3542,03 $\pm$ 1477,07                     |
| CCl $_4$ , 3 сутки<br>CCl $_4$ , 3 day (b)                 | 922,16 $\pm$ 192,20 <sup>a</sup>         | 53,35 $\pm$ 18,28                             | 6,72 $\pm$ 0,31                    | 4757,90 $\pm$ 1215,78                     |
| CCl $_4$ , 7 сутки<br>CCl $_4$ , 7 day (c)                 | 3,60 $\pm$ 1,13 <sup>a, b, e</sup>       | 48,92 $\pm$ 8,98                              | 8,25 $\pm$ 0,71 <sup>e</sup>       | 77,51 $\pm$ 11,86 <sup>a, b, e</sup>      |
| CCl $_4$ , 14 сутки<br>CCl $_4$ , 14 day (d)               | 33,52 $\pm$ 5,93 <sup>a, b, c, e</sup>   | 43,26 $\pm$ 3,63 <sup>f</sup>                 | 6,48 $\pm$ 0,51 <sup>e</sup>       | 134,15 $\pm$ 42,49 <sup>a, b, e, f</sup>  |
| CCl $_4$ + АФГ,<br>3 сутки<br>CCl $_4$ + APH,<br>3 day (e) | 240,50 $\pm$ 25,89 <sup>a, b</sup>       | 36,34 $\pm$ 2,04                              | 4,25 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>       | 2194,02 $\pm$ 356,87                      |
| CCl $_4$ + АФГ,<br>7 сутки<br>CCl $_4$ + APH,<br>7 day (f) | 32,03 $\pm$ 11,40 <sup>b, e</sup>        | 126,46 $\pm$ 6,88 <sup>a, b, c, e</sup>       | 8,95 $\pm$ 2,06                    | 812,43 $\pm$ 109,98 <sup>a, b, c, e</sup> |
| CCl $_4$ + АФГ,<br>14 сутки<br>CCl $_4$ + APH,<br>14 day   | 1,44 $\pm$ 0,33 <sup>a, b, d, e, f</sup> | 272,82 $\pm$ 5,71 <sup>a, b, c, d, e, f</sup> | 3,68 $\pm$ 0,71 <sup>b, c, d</sup> | 123,30 $\pm$ 39,20 <sup>a, b, e, f</sup>  |

Примечание. a, b, c, d, e, f – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой (a), (b), (c), (d), (e), (f) соответственно.

Note. a, b, c, d, e, f are statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) with group (a), (b), (c), (d), (e), (f) respectively.

поздние сроки исследования отмечается увеличение плазменной концентрации IL-6 относительно показателей групп CCl $_4$  7 и 14 сутки (табл. 1).

Воздействие CCl $_4$  не оказывает влияния на концентрацию IL-18 в плазме крови. На фоне введения АФГ на 3 и 14 сутки концентрация IL-18 заметно снижается до значений 4,25 $\pm$ 0,33 пг/мл и 3,68 $\pm$ 0,71 пг/мл соответственно (табл. 1).

Токсическое действие CCl $_4$  вызывает резкое снижение концентрации противовоспалительного цитокина IL-10 в плазме крови на 7 и 14 сутки по сравнению с интактной группой и группой CCl $_4$  3 сутки. На фоне применения АФГ на 7 сутки отмечается характерное для токсического повреждения снижение уровня IL-10 (табл. 1).

В ходе исследования уровня цитокинов в гомогенатах печени у крыс после внутрибрюшинного введения CCl $_4$ , в зависимости от продолжительности действия токсиканта, обнаружено увеличение концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 $\alpha$ , IL-6 и TNF $\alpha$ , противовоспалительного медиатора IL-10 и снижение содержания TGF- $\beta$  (табл. 2).

Модуляция активности макрофагов приводит к увеличению концентрации IL-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$  и способствует снижению продукции провоспалительных цитокинов IL-6, IFN $\gamma$  на локальном уровне. При этом применение АФГ не оказывает существенного влияния на локальную концентрацию IL-18, TNF $\alpha$  и IL-10.

## Обсуждение

В работах, опубликованных нами ранее, показано, что CCl $_4$  вызывает повреждение не только органа-мишени (печени), но и других органов, что приводит к развитию системного воспалительного ответа, который выражается в активации макрофагального звена иммунной системы и выработке цитокинов [3, 4].

Изменения функционального состояния иммунокомпетентных клеток, к числу которых относятся синусоидальные клетки, оказывают существенное влияние на развитие патологических процессов в печени [16, 17]. Результаты проведенного нами исследования подтверждают тот факт, что в ранние сроки токсического воздей-

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В ГОМОГЕНАТАХ ПЕЧЕНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 2. THE LEVEL OF CYTOKINES IN THE LIVER HOMOGENATES OF EXPERIMENTAL ANIMALS

| Группа /<br>Показатель<br>Group /<br>Parameter                                    | IL-1 $\alpha$ , пг/мл<br>pg/ml             | IL-6, пг/мл<br>pg/ml                        | IL-18,<br>пг/мл<br>pg/ml              | TNF $\alpha$ ,<br>пг/мл<br>pg/ml    | IFN $\gamma$ , пг/мл<br>pg/ml            | IL-10,<br>пг/мл<br>pg/ml              | TGF- $\beta$ ,<br>пг/мл<br>pg/ml        |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Интактная</b><br>Intact (a)                                                    | 941,50 $\pm$<br>98,16                      | 30,52 $\pm$<br>3,58                         | 543,27 $\pm$<br>18,22                 | 694,19 $\pm$<br>188,79              | 931,25 $\pm$<br>86,34                    | 182,86 $\pm$<br>44,61                 | 817,18 $\pm$<br>220,79                  |
| <b>CCI<sub>4</sub>, 3 сутки</b><br>CCI <sub>4</sub> , 3 day (b)                   | 1146,97 $\pm$<br>213,15                    | 44,90 $\pm$<br>3,23 <sup>a</sup>            | 593,74 $\pm$<br>28,51                 | 1090,42 $\pm$<br>72,36              | 1199,88 $\pm$<br>81,09                   | 419,43 $\pm$<br>131,03                | 223,62 $\pm$<br>20,16 <sup>a</sup>      |
| <b>CCI<sub>4</sub>, 7 сутки</b><br>CCI <sub>4</sub> , 7 day (c)                   | 1272,63 $\pm$<br>39,25 <sup>a</sup>        | 36,50 $\pm$<br>13,93                        | 779,36 $\pm$<br>58,85 <sup>a, e</sup> | 1154,13 $\pm$<br>138,92             | 857,89 $\pm$<br>48,17 <sup>b</sup>       | 509,71 $\pm$<br>83,05 <sup>a, e</sup> | 239,11 $\pm$<br>26,62 <sup>a</sup>      |
| <b>CCI<sub>4</sub>, 14 сутки</b><br>CCI <sub>4</sub> , 14 day (d)                 | 1409,63 $\pm$<br>110,91 <sup>a, e</sup>    | 12,22 $\pm$<br>1,22 <sup>a, b, e, f</sup>   | 601,48 $\pm$<br>19,58                 | 1283,17 $\pm$<br>97,96 <sup>a</sup> | 674,66 $\pm$<br>62,75 <sup>b</sup>       | 460,57 $\pm$<br>95,70 <sup>a, e</sup> | 623,39 $\pm$<br>137,51 <sup>b, c</sup>  |
| <b>CCI<sub>4</sub> + АФГ,<br/>3 сутки</b><br>CCI <sub>4</sub> + APH,<br>3 day (e) | 944,30 $\pm$<br>100,91                     | 29,51 $\pm$<br>1,90 <sup>b</sup>            | 522,08 $\pm$<br>24,10                 | 1193,46 $\pm$<br>158,77             | 831,88 $\pm$<br>80,12 <sup>b</sup>       | 90,84 $\pm$<br>0,01 <sup>a</sup>      | 558,14 $\pm$<br>203,50 <sup>b</sup>     |
| <b>CCI<sub>4</sub> + АФГ,<br/>7 сутки</b><br>CCI <sub>4</sub> + APH,<br>7 day (f) | 1622,83 $\pm$<br>120,66 <sup>a, c, e</sup> | 77,80 $\pm$<br>2,93 <sup>a, b, e</sup>      | 735,53 $\pm$<br>41,54 <sup>a, e</sup> | 1484,70 $\pm$<br>260,47             | 675,05 $\pm$<br>17,55 <sup>a, b, c</sup> | 274,57 $\pm$<br>34,14 <sup>e</sup>    | 401,92 $\pm$<br>35,02 <sup>b, c</sup>   |
| <b>CCI<sub>4</sub> + АФГ,<br/>14 сутки</b><br>CCI <sub>4</sub> + APH,<br>14 day   | 1401,63 $\pm$<br>110,02 <sup>a, e</sup>    | 8,03 $\pm$<br>0,77 <sup>a, b, c, e, f</sup> | 575,86 $\pm$<br>44,22 <sup>c, f</sup> | 1157,38 $\pm$<br>70,73              | 666,12 $\pm$<br>34,53 <sup>a, b, c</sup> | 428,29 $\pm$<br>18,56 <sup>a, e</sup> | 1167,19 $\pm$<br>437,77 <sup>b, c</sup> |

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ствия в ткани печени возрастает количество синусоидальных клеток, в том числе за счет притока моноцитов крови или за счет зрелых макрофагов перитонеальной полости, поступающих через мезотелий непосредственно к месту повреждения [14].

Синусоидальные клетки печени способны продуцировать такие провоспалительные цитокины, как IL-1, IL-6 и TNF $\alpha$ . Доказано, что данные медиаторы отвечают за стимуляцию системного ответа в острой фазе воспаления [5, 7]. В нормальных физиологических условиях в печени цитокины продуцируются в минимальных концентрациях. Однако различные патофизиологические стимулы, такие как накопление в клетках печени липидов, свободных радикалов, а также поступление в печень токсинов, способствуют увеличению содержания провоспалительных молекул [5, 6].

В данном исследовании показано, что в ответ на диффузное токсическое повреждение печени на системном уровне наблюдается усиленная выработка провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  и подавление продукции IL-10, при этом концентрация провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-18 остается неизменной.

При действии токсиканта на локальном уровне отмечается увеличение концентрации IL-1 $\alpha$ , IL-18, TNF $\alpha$ , IL-10 и снижение IL-6, IFN $\gamma$ , TGF- $\beta$ . Повышенная продукция IL-1 $\alpha$  и IL-18 в гомогенатах печени, по-видимому, запускает локальное воспаление, повышая уровни таких цитокинов, как TNF $\alpha$ , IL-6. Повышение концентрации противовоспалительного цитокина IL-10 подтверждает ключевую роль данного медиатора в регуляции иммунного ответа и способность подавлять секрецию провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL-6 [2].



Воздействие на синусоидальные клетки АФГ способствует увеличению уровня IL-10, IL-6 и снижению IL-18, TNF $\alpha$  в плазме крови, а на локальном уровне приводит к росту концентрации IL-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$  и снижению уровня IL-6, IFN $\gamma$ .

Таким образом, уточнение механизмов биологических эффектов аминофталгидрида на синусоидальные клетки и продукцию цитокинов,

а также поиск эффективных стимуляторов регенерации печени среди других модуляторов функции макрофагов является перспективным направлением исследования.

## Благодарности

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

## Список литературы / References

1. Притулина Ю.Г., Криворучко И.В., Шенцова В.В., Филь Г.В., Астапченко Д.С., Сахарова Л.А. Анализ цитокинового статуса при ряде инфекционных заболеваний // Успехи современного естествознания, 2014. № 2. С. 16-20. [Pritulina Yu.G., Krivoruchko I.V., Shentsova V.V., Fil G.V., Astapchenko D.S., Sakharova L.A. Analysis of cytokine status in a number of infectious diseases. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences*, 2014, no. 2, pp. 16-20. (In Russ.)]
2. Сташкевич Д.С., Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова А.Л. Актуальные вопросы иммунологии: система цитокинов, биологическое значение, генетический полиморфизм, методы определения: учеб. пособие. Челябинск: Цицеро, 2016. 82 с. [Stashkevich D.S., Filippova Yu.Yu., Burmistrova A.L. Immediate questions of immunology: cytokine system, biological significance, genetic polymorphism, methods of determination: studies manual]. Chelyabinsk: Cicero, 2016. 82 p.
3. Шафигуллина З.А., Медведева С.Ю., Данилова И.Г. Иммунотоксическое действие тетрахлорметана // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 493-499. [Shafigullina Z.A., Medvedeva S.Yu., Danilova I.G. Immunotoxic effect of carbon tetrachloride. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 3, pp. 493-499. (In Russ.)]
4. Шафигуллина З.А., Медведева С.Ю., Данилова И.Г. Роль клеточного компонента стромы в компенсаторных процессах при диффузном повреждении печени // Токсикологический вестник, 2018. № 3 (150). С. 32-37. [Shafigullina Z.A., Medvedeva S.Yu., Danilova I.G. Role of the stromal cellular component in compensatory processes during diffusal toxic damage. *Toksikologicheskii vestnik = Toxicological Review*, 2018, no. 3 (150), pp. 32-37. (In Russ.)]
5. Brauersreuther V., Viviani G.L., Mach F., Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.*, 2012, Vol. 18, pp. 727-735.
6. Copaci I., Micu L., Voiculescu M. The role of cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. A review. *J. Gastrointest. Liver Dis.*, 2006, Vol. 15, no. 4, pp. 363-373.
7. Fernandez-Real J.M., Broch M., Vendrell J., Richart C., Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, Vol. 85, no. 3, pp. 1334-1339.
8. Gao B. Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012, Suppl. 2, pp. 89-93.
9. Knolle P.A. Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.*, 2000, Vol. 174, pp. 21-34.
10. Kumar G.L., Rudbeck L. Education guide. Immunohistochemical (IHC) staining methods. 2009. Dako North America, Carpinteria, California. 160 p.
11. Marrone G., Shah V.H., Gracia-Sancho J. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *J. Hepatol.*, 2016, Vol. 65, no. 3, pp. 608-617.
12. Okada T., Kimura A., Kanki K., Nakatani S., Nagahara Y., Hiraga M., Watanabe Y. Liver resident macrophages (kupffer cells) share several functional antigens in common with endothelial cells. *Scand. J. Immunol.*, 2016, Vol. 83, pp. 139-150.
13. Patent US, USOO9101629B2, 11.08.2015. Method for obtaining 5-amino 2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione alkali metal salts and their use in medicine. Patent United States of America, USOO9101629B2 US 9, 101, 629 B2 / Abidov A.M., Danilova I.G.
14. Rehmann B. Mature peritoneal macrophages take an avascular route into the injured liver and promote tissue repair. *Hepatology*, 2017, Vol. 65, no. 1, pp. 376-379.
15. Rountree C.B. A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential. *Stem. Cells*, 2007, Vol. 25, no. 10, pp. 2419-2429.
16. Sanchez Perez M.J., Gonzalez-Reimers E., Santolaria-Fernandez F. Lipid peroxidation and serum cytokines in acute alcoholic hepatitis. *Alcohol Alcohol.*, 2006, Vol. 41, no. 6, pp. 593-597.
17. Shetty S., Lalor P.F., Adams D.H. Liver sinusoidal endothelial cells, gatekeepers of hepatic immunity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2018, Vol. 15, pp. 555-567.
18. Zahr M.N., Luong R., Sullivan E.V., Pfefferbaum A. Measurement of serum, liver, and brain cytokine induction, thiamine levels, and hepatopathology in rats exposed to a 4-day alcohol binge protocol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2010, Vol. 34, no. 11, pp. 1858-1870.

**Авторы:**

**Шафигуллина З.А.** — аспирант, Институт естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»; младший научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

**Данилова И.Г.** — д.б.н., доцент, заведующая лабораторией морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; заведующая кафедрой медицинской биохимии и биофизики, Институт естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

**Медведева С.Ю.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики, Институт естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 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; заведующий кафедрой иммунохимии, Химико-технологический институт ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

**Абидов М.Т.** — д.м.н., профессор, ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

**Authors:**

**Shafigullina Z.A.**, Postgraduate Student, Institute of Natural Sciences and Mathematics, B. Eltsin Ural Federal University; Junior Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

**Danilova I.G.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Institute of Natural Sciences and Mathematics, B. Eltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

**Medvedeva S.Yu.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Institute of Natural Sciences and Mathematics, B. Eltsin Ural Federal University, 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; Head, Department of Immunochemistry, Institute of Chemical Technologies, B. Eltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

**Abidov M.T.**, PhD, MD (Medicine), Professor, B. Eltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 13.02.2019  
Принята к печати 05.04.2019

Received 13.02.2019  
Accepted 05.04.2019

## КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ АСПЕКТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE-АНТИТЕЛ К КОРОВЬЕМУ МОЛОКУ И ЕГО КОМПОНЕНТАМ

Ковязина Н.А.<sup>1</sup>, Алхутова Н.А.<sup>1</sup>, Жижина О.Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> СПбГБУЗ «Елизаветинская больница», Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Пищевая аллергия к коровьему молоку и его компонентам широко распространена среди детей раннего, дошкольного и младшего школьного возраста и может служить фактором, существенно влияющим на состояние здоровья ребенка при его взрослении. Клинические симптомы аллергии к молоку непатогномоничны и могут носить как выраженный, так и стертый характер, что становится причиной гиподиагностики. Кроме того, разнообразие антигенов в составе молока обуславливает особенности течения аллергии к его компонентам и вносит дополнительные трудности в диагностику и лечение данной патологии. В то же время сенсибилизация к белкам коровьего молока зачастую является провокатором «атопического марша» и бронхиальной астмы, может быть причиной задержки роста и других патологических состояний. В настоящее время не существует четких критериев риска формирования аллергии к молоку и, следовательно, успех ее профилактики и лечения во многом зависит от компетенции врача-аллерголога и информативности применяемых диагностических методов. Однако на сегодняшний день отсутствуют общепринятые лабораторные алгоритмы диагностики и контроля эффективности лечения аллергии к коровьему молоку и его компонентам.

Авторами статьи проведено лабораторное обследование 187 детей в возрасте от 3 месяцев до 10 лет и выявлено, что иммунохемилюминесцентный метод исследования уровня специфических IgE к коровьему молоку на анализаторе «ИММУЛАЙТ 2000/XPi» информативен при разных подходах к прогнозированию и оценке эффективности лечения пищевой аллергии: как ориентированном на критическое диагностическое значение ЗМЕ/л, так и учитывающем степень снижения уровня антител. Авторы статьи считают целесообразным при пациенториентированной интерпретации результатов определения специфических IgE учитывать расширенную неопределенность, если клиническое решение принимается на основании критического значения, и предел промежуточной воспроизводимости, если оценивается динамика. Частота обнаружения специфических антител к коровьему молоку среди обследованных мальчиков была выше, чем у девочек, однако умеренный/высокий уровень реактивности выявляется у мальчиков реже. Кроме того, выявлены случаи, когда уровень специфических IgE к бета-лактоальбумину был выше, чем к цельному коровьему молоку, что необходимо учитывать при проведении скринингового исследования.

На основании анализа данных литературы и результатов собственного исследования авторы считают необходимым проведение развернутого исследования специфических IgE к коровьему молоку и его компонентам в сыворотке крови детей раннего, дошкольного и младшего школьного возраста.

**Ключевые слова:** пищевая аллергия, компоненты молока, специфические IgE, интенсивность аллергической реакции, педиатрия

### Адрес для переписки:

Ковязина Надежда Алексеевна  
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной  
медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России  
194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика  
Лебедева, 4/2.  
Тел.: 8 (812) 702-63-45.  
E-mail: nakovzn@gmail.com

### Address for correspondence:

Kovyazina Nadezhda A.  
A. Nikiforov Federal Center of Urgent and  
Radiation Medicine  
194044, Russian Federation, St. Petersburg,  
Acad. Lebedev str., 4/2.  
Phone: 7 (812) 702-63-45.  
E-mail: nakovzn@gmail.com

### Образец цитирования:

Н.А. Ковязина, Н.А. Алхутова, О.Л. Жижина  
«Клинико-лабораторные аспекты выявления  
специфических IgE-антител к коровьему молоку и его  
компонентам» // Медицинская иммунология, 2019.  
Т. 21, № 5. С. 937-944.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-937-944

© Ковязина Н.А. и соавт., 2019

### For citation:

N.A. Kovyazina, N.A. Alkhutova, O.L. Zhizhina "Clinical and  
laboratory aspects of detecting specific IgE antibodies to cow's  
milk and its components", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5,  
pp. 937-944. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-937-944

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-937-944

# CLINICAL AND LABORATORY ASPECTS OF DETECTING SPECIFIC IgE ANTIBODIES TO COW'S MILK AND ITS COMPONENTS

Kovyazina N.A.<sup>a</sup>, Alkhutova N.A.<sup>a</sup>, Zhizhina O.L.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Elisabeth Municipal Hospital, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Food allergy against cow milk and its components is highly prevalent among infants and children of pre-school and young school age being a sufficient factor influencing health condition of children during the maturation period. Clinical signs of the milk allergy are non-specific, and they may be pronounced or expressed in mild form, thus enabling hypodiagnosics of this disorder. Moreover, a variety of milk antigens determines different clinical course of this allergic condition and brings additional difficulties to its diagnostics and treatment. Meanwhile, a sensibilization for the cow milk proteins may sometimes trigger a generalized atopy and bronchial asthma, being a factor delayed growth and other health disorders. At the present time, there are no distinct risk criteria for milk allergy. Therefore, its successful prophylaxis and treatment largely depends on the competence of clinical allergologist and informativity of the diagnostic techniques used. So far, however, we have no generally approved laboratory algorithms for diagnostics and monitoring of treatment efficiency in the cow milk allergy and its components.

We have performed a laboratory study of 187 children at the age of 3 months to 10 years. An immunochemoluminescent assay of specific IgE antibody levels to the cow milk using IMMULITE 2000/XPi analyzer has revealed its good informative value at different approaches to prediction and evaluation of food allergy treatment, both oriented for a critical cutoff value of 3 MU/L, and by monitoring a decrease in antibody levels. The authors consider rational an extended indefiniteness principle during the patient-oriented interpretation of IgE assay results if clinical decision is based on critical value of the index. In cases of clinical monitoring, the limit of interim reproducibility should be taken into account. The prevalence of specific cow milk antibodies among the boys was higher than among girls, however, with lesser frequency of moderate/high reactivity among the males. Moreover, the cases were detected with higher levels of anti-beta-lactalbumin IgG than those against whole milk. This finding should be considered during the screening studies.

On the basis of literature analysis and own results, the authors propose an extensive study of specific IgE antibodies against cow milk and its components in blood serum of infants and children from the pre-school and junior school age groups.

**Keywords:** food allergies, cow's milk components, specific IgE, intensity of allergic reaction, pediatrics

## Введение

Не вызывает сомнений, что проблема своевременной и специфичной диагностики аллергии к белкам коровьего молока в настоящее время крайне актуальна. Распространенность этого заболевания у детей первого года жизни в разных странах составляет от 1,9 до 7,5%, причем у детей-атопиков — до 90% [4]. Среди детей с IgE-опосредованной пищевой аллергией на молоко около 15% остаются чувствительными к нему почти до 2 лет, а 35% приобретают аллергию к другим пищевым продуктам [3].

Клинические симптомы аллергической реакции при употреблении коровьего молока наблюдаются у 1-17,5% детей в возрасте до 7 лет [2, 8, 10, 20]. Аллергия к белкам коровьего молока затрагивает различные органы и системы, однако ее проявления отмечаются в основном со стороны органов желудочно-кишечного тракта и кожи (50-60%), а также дыхательных путей (20-30%) [2, 4, 25]. Клинические симптомы аллергии к мо-

локу чаще всего возникают в возрасте от 1 нед. до 6 мес., однако они непатогномичны и схожи, в частности, с симптомами непереносимости лактозы и других заболеваний ЖКТ [2, 4]. Кроме того, симптомы могут носить как выраженный, так и стертый характер, что становится причиной гиподиагностики. В то же время сенсибилизация к белкам коровьего молока зачастую является провокатором «атопического марша» и таких заболеваний, как атопические ринит и дерматит, бронхиальная астма, может быть причиной задержки роста и других патологических состояний [8, 19, 27].

Известно, что в молоке содержится в среднем около 3,2% белков [7], среди которых выделяют три группы, представленные казеином и его фрагментами (до 80%), белками молочной сыворотки (до 20%), а также в небольшом количестве белками оболочек жировых шариков. Молочная сыворотка, в свою очередь, содержит альфа-лактоальбумин и бета-лактоглобулин, продуцируемые молочной железой, а также бел-

ки, которые поступают в молоко из кровотока: коровий сывороточный альбумин, лактоферрин, иммуноглобулины и протеозопептоны [8, 16, 26]. Перечисленные компоненты молока отличаются не только первичной структурой и функциональными свойствами, но также и способностью вызывать IgE-ответ. Считается, что наиболее выраженными антигенными свойствами обладает бета-лактоглобулин молочной сыворотки [4]. Разнообразие антигенов в составе молока не только обуславливает особенности течения аллергии к его компонентам, но и вносит дополнительные трудности в диагностику и лечение данной патологии.

Между тем общепринятого способа лечения и профилактики пищевой аллергии не существует, а мнения специалистов неоднозначны. Так, для этих целей широко применяется элиминационная диета, однако ее эффективность не доказана [2, 6, 12]. Более того, опубликованы результаты исследований, согласно которым такой подход к профилактике и лечению аллергии может способствовать росту количества аллергических заболеваний, вызванных как пищевыми, так и ингаляционными аллергенами [6, 24, 27]. Тем не менее некоторые авторы отмечают ассоциацию между повышенным риском развития аллергии к белкам коровьего молока и вскармливанием детей в течение первых дней жизни стандартной смесью на основе коровьего молока [6, 13]. Поэтому, в соответствии с рекомендациями согласительного комитета по пищевой аллергии и анафилаксии «Первичная профилактика пищевой аллергии, 2014» (EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Primary Prevention of Food Allergy, 2014) [6, 9], если грудного вскармливания недостаточно или оно невозможно, то дети с высоким риском развития аллергических болезней должны получать гипоаллергенную смесь с доказанным защитным эффектом в течение первых 4 месяцев жизни, в то время как другим детям можно давать стандартную смесь [6]. Надо отметить, что исключительно грудное вскармливание также не исключает риска возможного развития аллергии к белкам коровьего молока на этапе введения прикорма [6, 22]. Напротив, в ряде исследований сообщается, что раннее введение коровьего молока в диету новорожденного ассоциируется со снижением риска развития аллергии на этот продукт. Однако большинство исследователей пришли к выводу, что как задержка, так и раннее введение прикорма могут увеличить риск формирования пищевой аллергии [6, 11, 18]. Таким образом, четких критериев риска формирования аллергии к молоку нет и, следовательно, успех ее профилактики и лечения во многом зависит от компетенции врача-аллерголога и информативности применяемых диагностических методов. Но соответствующие стандарты лабо-

раторной диагностики и требования к характеристикам аналитических методов в настоящий момент отсутствуют.

По данным разных авторов, IgE-опосредованная аллергия к белкам коровьего молока проходит с возрастом в 30–79% случаев, причем определение уровня специфических IgE в динамике может служить индикатором этого процесса [1, 2, 9, 10]. Сохраняющийся высокий уровень специфических IgE может свидетельствовать о высоком риске развития бронхиальной астмы, риноконъюнктивита и атопического дерматита [9, 12]. Некоторые авторы рассматривают в качестве возможного индикатора персистирующего течения аллергии уровень специфических IgE у детей на первом году жизни, в период клинической манифестации [1, 2, 21]. Подтверждением данного положения являются результаты проспективного исследования, согласно которому у 68% детей, аллергические проявления у которых сохранялись до 3 и более лет, уровень специфического IgE к коровьему молоку в возрасте до 1 года составлял более 3 кЕдА/л, в то время как у 70% детей, имевших на первом году жизни уровень специфического IgE менее 3 кЕдА/л, к трем годам сформировалась толерантность [8, 23]. Также опубликованы результаты исследования, проведенного Е.Е. Варламовым и соавт. в 2008 г., подтверждающие, что вероятность формирования пищевой толерантности зависит от исходного уровня специфических IgE к пищевым аллергенам, а не от скорости его снижения. Авторы предполагают, что повторное аллергообследование через год целесообразно выполнять только детям с уровнем специфических IgE менее 3 кЕ/л, остальным же — в более поздние сроки [1].

Таким образом, не вызывает сомнений, что пищевая аллергия к коровьему молоку и его компонентам может служить фактором, существенно влияющим на состояние здоровья ребенка при его взрослении. В течение последнего десятилетия был выполнен целый ряд научно-практических работ, посвященных изучению данной патологии с точки зрения клинической лабораторной диагностики. Однако на сегодняшний день отсутствуют общепринятые лабораторные алгоритмы диагностики и контроля эффективности лечения аллергии к коровьему молоку и его компонентам.

**Цель исследования** — повысить информативность результатов выявления специфических IgE к коровьему молоку у детей раннего, дошкольного и младшего школьного возраста

## Материалы и методы

Оценены результаты лабораторного обследования 187 детей в возрасте от 3 месяцев до 10 лет. Исследования выполнялись с 2012 г. по 2017 г. в соответствии с назначениями врача-аллерголо-

га с целью диагностики пищевой аллергии. Определение уровней специфических IgE к коровьему молоку и бета-лактоглобулину проводили в сыворотке крови иммунохемилюминесцентным методом на анализаторе «ИММУЛАЙТ 2000» (DPC, США) с использованием системы реагентов: “3gAllergy™ Specific IgE Universal Kit”, «набор реагентов для определения чувствительности к аллергену коровьего молока/milk (fresh cow's milk), f2», «набор реагентов для определения чувствительности к аллергену бета-лактоглобулина/beta-lactoglobulin (putified from bovine milk), f77». Внутривлабораторный контроль качества исследований проводился с использованием двухуровневого контроля “3gAllergy™ Specific IgE Universal Kit Controls”. Рабочий диапазон системы реагентов “3gAllergy™ Specific IgE Universal Kit” — 0,1-100,0 МЕ/мл (WHO 2<sup>nd</sup> IRP 75/502). Максимальный коэффициент межсерийной вариации (прецизионности) составил 12%; оценка правильности не проводилась, поскольку данный тест не представлен в международных и Федеральных системах внешней оценки качества. Результаты исследования специфических антител оценивали по следующей стандартной классификации, указанной в инструкции к набору реагентов (табл. 1).

Статистический анализ проводили с использованием Statistica 10.0. Использовали U-критерий Манна–Уитни. Данные в таблицах

**ТАБЛИЦА 1. КЛАССИФИКАЦИЯ РЕАКТИВНОСТИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ**

TABLE 1. CLASSIFICATION OF REACTIVITY ACCORDING TO THE RESULTS OF THE STUDY OF THE LEVEL OF SPECIFIC ANTIBODIES

| Результат исследования специфических антител, МЕ/мл<br>Result of the study of specific antibodies, IU/ml | Уровень реактивности<br>Reactivity level                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| < 0,10                                                                                                   | Отсутствует или неопределяемый<br>Missing or undetectable |
| 0,10-0,34                                                                                                | Очень низкий<br>Very low                                  |
| 0,35-0,69                                                                                                | Низкий<br>Low                                             |
| 0,70-3,49                                                                                                | Умеренный<br>Moderate                                     |
| 3,50-17,49                                                                                               | Высокий<br>High                                           |
| 17,50-52,49                                                                                              | Очень высокий<br>Very high                                |
| 52,50-99,99                                                                                              |                                                           |
| ≥ 100                                                                                                    |                                                           |

представлены в виде  $M \pm SD$  (M — средняя арифметическая, SD — среднее квадратическое отклонение). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

Определение концентрации специфических антител к коровьему молоку было выполнено в сыворотке крови 187 детей (81 девочка и 106 мальчиков). IgE-реактивность была выявлена у 52 детей (27%), в том числе у 18 девочек и 34 мальчиков. Таким образом, частота обнаружения специфических антител к коровьему молоку среди обследованных мальчиков (32%) была выше, чем у девочек (20%), что подтверждает существующее мнение, что мужской пол является фактором повышенного риска развития пищевой аллергии [6, 15].

Мы провели оценку частоты выявления высоких и низких концентраций специфических антител в сыворотке крови обследованных детей (табл. 2).

Обращает на себя внимание, что у 73% мальчиков уровень реактивности выявленных антител был низким или очень низким, в то время как аналогичные значения специфических IgE были обнаружены только у половины девочек. При этом почти у четверти обследованных девочек был выявлен умеренный/высокий уровень реактивности в отличие от мальчиков, среди которых умеренные/высокие уровни данного показателя обнаружены только у 14%. Таким образом, несмотря на то, что частота обнаружения специфических антител к коровьему молоку среди обследованных мальчиков была выше, чем у девочек, умеренный/высокий уровень реактивности выявлялся у мальчиков реже. Следовательно, принимая во внимание изложенную выше прогностическую значимость исходного уровня специфических IgE, можно предположить, что вероятность формирования пищевой толерантности у мальчиков выше, чем у девочек.

Согласно результатам исследования, проведенного Е.Е. Варламовым и соавт., среди детей с развившейся пищевой толерантностью и уровнем специфических IgE не выше 2-го класса достоверно чаще встречались дети старше 3 лет [1]. В нашем исследовании мы также выявили различия в возрасте детей с низким/очень низким и умеренным/высоким/очень высоким уровнем реактивности к аллергену коровьего молока, что согласуется с общепринятыми представлениями о формировании пищевой толерантности по мере взросления ребенка.

Как указано выше, в настоящее время обсуждается прогностическая значимость исходного уровня специфических антител к коровьему молоку, и, в частности, предложено использовать для этих целей диагностическое значение

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЫЯВЛЕННОГО УРОВНЯ РЕАКТИВНОСТИ

TABLE 2. DISTRIBUTION OF CHILDREN DEPENDING ON THE LEVEL OF REACTIVITY

|                                          | Девочки<br>Girls                        |                                                                    | Мальчики<br>Boys                        |                                                                    |
|------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Уровень реактивности<br>Reactivity level | Очень низкий/<br>низкий<br>Very low/low | Умеренный/<br>высокий/<br>очень высокий<br>Moderate/high/very high | Очень низкий/<br>низкий<br>Very low/low | Умеренный/<br>высокий/<br>очень высокий<br>Moderate/high/very high |
| Количество<br>Amount                     | 9                                       | 9                                                                  | 25                                      | 9                                                                  |
| Возраст<br>Age                           | 4,4±1,5                                 | 1,8±1,1                                                            | 3,9±2,1                                 | 1,3±1,2                                                            |

3МЕ/мл. Для этого значения нами была рассчитана расширенная неопределенность результата, которая составила  $\pm 0,72$  МЕ/мл (коэффициент межсерийной вариации с коэффициентом охвата 2 без учета правильности) [5]. Таким образом, можно утверждать, что все значения, приближенные к диагностическому значению 3МЕ/мл, с вероятностью 95% не попадали в интервал 0,1-0,69 МЕ/мл, расцениваемый как «очень низкий/низкий уровень реактивности» в таблице 3. Кроме того, если врач-аллерголог использует диагностическое значение 3МЕ/мл в качестве критерия оценки выраженности пищевой аллергии, то пациенториентированную интерпретацию результатов определения специфических IgE целесообразно проводить с учетом расширенной неопределенности, которая в условиях нашей лаборатории формирует диапазон  $3,00 \pm 0,72$  МЕ/мл.

В этой связи в качестве лабораторных случаев приводим результаты исследования уровня специфических антител к коровьему молоку у тех обследованных детей, кому они были выполнены в динамике (табл. 3).

Обращает на себя внимание тот факт, что в лабораторном случае № 4 исходно высокий уровень реактивности через год остался по-прежнему

высоким, не опускаясь ниже диагностического диапазона  $3,00 \pm 0,72$  МЕ/мл, а в лабораторном случае № 2 низкий уровень реактивности при исследовании через год после первичного обращения не изменился в течение и последующего года наблюдения, что не противоречит рекомендации проводить повторное исследование уровня специфических антител при исходном уровне до 3 МЕ/мл — через год, а при уровне выше 3 МЕ/мл — в более поздние сроки. Тем не менее указанная рекомендация не умоляет клиническую значимость оценки динамики уровня специфических антител как критерия эффективности проводимой терапии. В этой связи представляется важным, что во всех четырех случаях выявленное снижение концентрации специфических антител было достоверным, поскольку результат повторного (через год) определения выходил за пределы промежуточной воспроизводимости для анализируемого диапазона, рассчитанного нами как  $2,77SD$ .

Таким образом, приведенные данные и лабораторные примеры демонстрируют, что прецизионность использованного нами метода определения концентрации специфических IgE позволяет применять его при разных подходах к прогнози-

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К КОРОВЬЕМУ МОЛОКУ, ПОЛУЧЕННЫЕ В ДИНАМИКЕ

TABLE 3. RESULTS OF THE STUDY OF THE LEVEL OF SPECIFIC ANTIBODIES TO COW'S MILK, OBTAINED IN THE DYNAMICS

| Случаи<br>Cases | Возраст пациента<br>при первичном<br>исследовании<br>The patient's age at the<br>initial examination | Концентрация специфических IgE, МЕ/мл (уровень реактивности)<br>Concentration of specific IgE, IU/ml (level of reactivity) |                                      |                                                          |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|                 |                                                                                                      | Исходный уровень<br>Baseline                                                                                               | В динамике через<br>год<br>In a year | В динамике<br>через два года<br>In dynamics in two years |
| 1               | 9 мес.<br>9 months                                                                                   | 1,22 (умеренный)<br>1.22 (moderate)                                                                                        | 0,58 (низкий)<br>0.58 (low)          | —                                                        |
| 2               | 1 год 11 мес.<br>1 year 11 months                                                                    | 1,37 (умеренный)<br>1.37 (moderate)                                                                                        | 0,59 (низкий)<br>0.59 (low)          | 0,57 (низкий)<br>0.57 (low)                              |
| 3               | 1 год 2 мес.<br>1 year 2 months                                                                      | 1,62 (умеренный)<br>1.62 (moderate)                                                                                        | 0,34 (низкий)<br>0.34 (low)          | —                                                        |
| 4               | 9 мес.<br>9 months                                                                                   | 7,49 (высокий)<br>7.49 (high)                                                                                              | 4,89 (высокий)<br>4.89 (high)        | —                                                        |

рованию течения пищевой аллергии: как ориентированном на критическое диагностическое значение 3МЕ/л, так и учитывающем степень снижения уровня антител.

У 11 из 187 обследованных детей, помимо исследования уровня специфических антител к коровьему молоку, были определены концентрации специфических IgE к бета-лактоглобулину (табл. 4).

Обращает на себя внимание, что при обследовании мальчиков в четырех из шести случаев уровень реактивности к бета-лактоглобулину был выше, чем к цельному коровьему молоку. Таким образом, изолированное исследование антител к цельному коровьему молоку в этих случаях обладает меньшей диагностической информативностью по сравнению с совместным выявлением антител к молоку и его компоненту. Данное на-

**ТАБЛИЦА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE К КОРОВЬЕМУ МОЛОКУ И БЕТА-ЛАКТОАЛЬБУМИНУ**

TABLE 4. RESULTS OF THE STUDY OF THE LEVEL OF SPECIFIC IgE TO FRESH COW'S MILK AND BETA-LACTOGLOBULINUM

| Пол<br>Sex       | Случай<br>№<br>Case<br>No. | Возраст<br>Age                       | Коровье молоко<br>Fresh cow's milk                            |                                             | Бета-лактоглобулин<br>Beta-lactoglobulinum                    |                                             |
|------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                  |                            |                                      | Уровень спец.<br>IgE, МЕ/мл<br>Level of special<br>IgE, IU/ml | Уровень<br>реактивности<br>Reactivity level | Уровень спец.<br>IgE, МЕ/мл<br>Level of special<br>IgE, IU/ml | Уровень<br>реактивности<br>Reactivity level |
| Мальчики<br>Boys | 1                          | 9 мес.<br>9 months                   | 1,22                                                          | умеренный/<br>высокий<br>moderate/<br>high  | 2,02                                                          | умеренный/<br>высокий<br>moderate/<br>high  |
|                  | 2                          | 3 года 6 мес.<br>3 years<br>6 months | 0,21                                                          | низкий<br>low                               | 0,55                                                          | умеренный/<br>высокий<br>moderate/<br>high  |
|                  | 3                          | 2 года 6 мес.<br>2 years<br>6 months | 0,25                                                          | низкий<br>low                               | 0,32                                                          | низкий<br>low                               |
|                  | 4                          | 3 года 1 мес.<br>3 years<br>1 months | 0,26                                                          | низкий<br>low                               | 0,76                                                          | умеренный/<br>высокий<br>moderate/<br>high  |
|                  | 5                          | 1 год<br>1 year                      | 0,11                                                          | низкий<br>low                               | 0,53                                                          | умеренный/<br>высокий<br>moderate/<br>high  |
|                  | 6                          | 1 год 8 мес.<br>1 years<br>8 months  | 0,12                                                          | низкий<br>low                               | 0,85                                                          | умеренный/<br>высокий<br>moderate/<br>high  |
| Девочки<br>Girls | 1                          | 9 мес.<br>9 months                   | 1,22                                                          | умеренный/<br>высокий<br>moderate/<br>high  | 2,02                                                          | умеренный/<br>высокий<br>moderate/<br>high  |
|                  | 2                          | 1 год 6 мес.<br>1 years<br>6 months  | 41,80                                                         | очень высокий<br>very high                  | 1,09                                                          | умеренный/<br>высокий<br>moderate/<br>high  |
|                  | 3                          | 7 мес.<br>7 months                   | 16,10                                                         | очень высокий<br>very high                  | 17,20                                                         | очень высокий<br>very high                  |
|                  | 4                          | 5 мес.<br>5 months                   | 5,15                                                          | очень высокий<br>very high                  | 24,30                                                         | очень высокий<br>very high                  |
|                  | 5                          | 5 мес.<br>5 months                   | 11,30                                                         | очень высокий<br>very high                  | 35,10                                                         | очень высокий<br>very high                  |



блюдение подтверждает изложенные выше теоретические представления о возможных отличиях в силе IgE-ответа к различным компонентам молока [7, 8]. Учитывая современные представления о связи исходного уровня специфических IgE к коровьему молоку и вероятности формирования пищевой толерантности, выявленный факт может быть клинически значимым и требует дальнейшего изучения.

## Выводы

1. Иммунохемилуминесцентный метод исследования уровня специфических IgE к коровьему молоку на анализаторе «ИММУЛАЙТ 2000/ХРi» информативен при разных подходах к прогнозированию и оценке эффективности лечения пищевой аллергии: как ориентированном на кри-

тическое диагностическое значение ЗМЕ/л, так и учитывающем степень снижения уровня антител.

2. Пациенториентированную интерпретацию результатов определения специфических IgE целесообразно проводить с учетом расширенной неопределенности, если клиническое решение принимается на основании критического значения, и предела промежуточной воспроизводимости, если оценивается динамика.

3. Уровень специфических IgE к бета-лактоглобулину может быть выше, чем к цельному коровьему молоку, что необходимо учитывать при проведении скринингового исследования.

4. Целесообразно проведение развернутого исследования специфических IgE к коровьему молоку и его компонентам в сыворотке крови детей раннего, дошкольного и младшего школьного возраста.

## Список литературы / References

1. Варламов Е.Е., Пампура А.Н., Окунева Т.С. Прогностические критерии развития толерантности к продуктам питания у детей с пищевой аллергией // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2008. № 6. С. 88-93. [Varlamov E.E., Pampura A.N., Okuneva T.S. Prognostic indicators of the development of food tolerance in children with food allergy. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2008, no. 6, pp. 88-93. (In Russ.)]
2. Вишнева Е.А., Намазова-Баранова Л.С., Турти Т.В., Торшхоева Р.М., Алексеева А.А., Левина Ю.Г. Аллергия к белкам коровьего молока. Подходы и алгоритмы лечения // Вопросы современной педиатрии, 2012. Т. 11, № 3. С. 65-69. [Vishneva E.A., Namazova-Baranova L.S., Turti T.V., Torshkhoyeva R.M., Alekseeva A.A., Levina J.G. Treatment with amino-acid-based formula of children with alimentary allergy to cow milk proteins. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2012, Vol. 11, no. 3, pp. 65-69. (In Russ.)]
3. Гervазиева В.Б., Свeрановская В.В. Пищевая аллергия и повышенная чувствительность к соевым белкам // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7. С. 15-20. [Gervazieva V.B., Sveranovskaya V.V. Alimentary allergy and hypersensitivity to soya bean proteins. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, pp. 15-20. (In Russ.)]
4. Захарова И.Н., Коровина Н.А., Малова Н.Е. Диетотерапия при непереносимости белков коровьего молока у детей раннего возраста // Вопросы современной педиатрии, 2005. Т. 4. № 1. С. 67-70. [Zakharova I.N., Korovina N.A., Malova N.E. Diet therapy in cow milk protein intolerance in infants. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2005, Vol. 4, no. 1, pp. 67-70. (In Russ.)]
5. Ковязина Н.А., Алхутова Н.А., Бардышева Н.А., Зыбина Н.Н., Калинина Н.М. От теории к практике. Роль контроля качества аналитического этапа исследований в повышении клинической информативности лабораторных тестов // Клиническая лабораторная диагностика, 2016. № 3. С. 188-192. [Koviazina N.A., Alkhutova N.A., Bardisheva N.A., Zibina N.N., Kalinina N.M. From theory to practice. The role of quality control of analytical stage of studies in increasing clinical informativeness of laboratory testes. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2016, no. 3, pp. 188-192. (In Russ.)]
6. Новик Г.А. Стратегия формирования толерантности у детей с пищевой аллергией // Вопросы современной педиатрии, 2015. Т. 14, № 1. С. 70-77. [Novik G.A. Strategy for tolerance in children with food allergies. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2015, Vol. 14, no. 1, pp. 70-77. (In Russ.)]
7. Просеков А.Ю., Курбанова М.Г. Анализ состава и свойств белков молока с целью использования в различных отраслях пищевой промышленности // Техника и технология пищевых производств, 2009. № 4. С. 68-71. [Prosekov A.Yu., Kurbanova M.G. Analysis of the composition and properties of milk proteins in order to use in various food industries. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv = Food Processing: Techniques and Technology*, 2009, no. 4, pp. 68-71. (In Russ.)]
8. Федотова М.М., Огородова Л.М., Федорова О.С., Евдокимова Т.А. Молекулярные и эпидемиологические основы аллергии к белкам коровьего молока // Бюллетень сибирской медицины, 2011. № 6. С. 86-92. [Fedotova M.M., Ogorodova L.M., Fyodorova O.S., Evdokimova T.A. Molecular and epidemiological basis of cow's milk allergy. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2011, no. 6, pp. 86-92. (In Russ.)]
9. de Greef E., Hauser B., Devreker T., Veerman-Wauters G., Vandenplas Y. Diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *World. J. Pediatr.*, 2012, Vol. 8, no. 1, pp. 19-24.
10. Fiocchi A., Brozek J., Schunemann H., Restani P., Beyer K., Troncone R., Martelli A., Terracciano L., Bahna S., Rance F., Ebisawa M., Heine R., Assa'd A., Sampson H., Verduci E., Bouygue G.R., Baena-Cagnani C., Canonica W., Lockey R. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2010, Vol. 21, Suppl. 21, pp. 1-125.

11. Greer F.R., Sicherer S.H., Burks A.W. Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics*, 2008, no. 121, pp. 183-191.
12. Hopper J.L., Jenkins M.A., Carlin J.B., Giles G.G. Increase in the self-reported prevalence of asthma and hay fever in adults over the last generation: a matched parent-offspring study. *Aust. J. Public Health*, 1995, Vol. 19, pp. 120-124.
13. Host A., Husby S., Osterballe O. A prospective study of cow's milk allergy in exclusively breast-fed infants. Incidence, pathogenetic role of early inadvertent exposure to cow's milk formula, and characterization of bovine milk protein in human milk. *Acta Paediatr. Scand.*, 1988, Vol. 77, no. 5, pp. 663-670.
14. Illi S., Muttius E., Lau S., Nickel R., Gruber Ch., Niggeman B., Wahn U. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and association with asthma. *J. Allergol. Clin. Immunol.*, 2004, Vol. 113, pp. 925-938.
15. Lack G. Update on risk factors for food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 129, pp. 1187-1197.
16. Monaci L., Tregoeat V., van Hengel A.J., Anklam E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *Eur. Food Research Tech.*, 2006, Vol. 223, no. 2, pp. 149-179.
17. Muraro A., Halken S., Arshad S.H., Beyer K., Dubois A.E.J., du Toit G., Eigenmann P. A., Grimshaw K.E.C., Hoest A., Lack G., O'Mahony L., Papadopoulos N.G., Panesar S., Prescott S., Roberts G., de Silva D., Venter C., Verhasselt V., Akdis A.C., Sheikh A. On behalf of EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Primary prevention of food allergy. *Allergy*, 2014, Vol. 69, pp. 590-601.
18. Prescott S.L., Smith P., Tang M.L.K., Palmer D.J., Sinn J., Huntley S.J., Comack B., Heime R., Gibson R., Makrides M. The importance of early complementary feeding in the development of oral tolerance: concerns and controversies. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2008, Vol. 19, pp. 375-380.
19. Roberts G., Patel N., Levi-Schaffer F., Habibi P., Lack G. Food allergy as a risk-factor of life-threatening asthma in childhood a case-controlled study. *J. Allergol. Clin. Immunol.*, 2003, Vol. 112, pp. 168-17.
20. Roehr C.C., Edenharter G., Reimann S., Ehlers I., Worm M., Zuberbier T. Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. *Clin. Exp. Allergy*, 2004, Vol. 34, pp. 1534-1541.
21. Saarinen K.M., Juntunen-Backman K., Jarvenpaa A.L., Kuitunen P., Lope L., Renlund M., Siivola M., Savilahti E. Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: A prospective study of 6209 infants. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999, Vol. 104, no. 2, Pt 1, pp. 457-461.
22. Saarinen K., Pelkonen A., Mäkelä M., Savilahti E. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, Vol. 116, no. 4, pp. 869-875.
23. Sicherer S.H., Sampson H.A. Cow's milk protein-specific IgE concentrations in two age groups of milk-allergic children and in children achieving clinical tolerance. *Clin. Exp. Allergy*, 1999, Vol. 29, no. 4, pp. 507-512.
24. Tarini B.A., Carroll A.E., Sox C.M., Christakis D.A. Systematic review of the relationship between early introduction of solid foods to infants and the development of allergic disease. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, 2006, Vol. 160, pp. 502-507.
25. Vanto T., Helppilä S., Juntunen-Backman K., Kalimo K., Klemola T., Korpela R., Koskinen P. Prediction of the development of tolerance to milk in children with cow's milk hypersensitivity. *J. Pediatr.*, 2004, Vol. 144, no. 2, pp. 218-222.
26. Wal J.M. Cow's milk proteins/allergens. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2002, Vol. 89, no. 1, pp. 3-10.
27. Woodcock A., Lowe L.A., Murray C.S., Simpson B.M., Pipis S.D., Kissen P. Early life environmental control: effect on symptoms, sensitization, and lung function at age 3 years. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2004, Vol. 170, pp. 433-439.

---

**Авторы:**

**Ковязина Н.А.** — к.м.н., заведующая лабораторией серологических исследований и аллергодиагностики отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

**Алхутова Н.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории серологических исследований и аллергодиагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

**Жижицина О.Л.** — к.м.н., врач эндокринологического отделения СПбГБУЗ «Елизаветинская больница», Санкт-Петербург, Россия

---

**Authors:**

**Kovyazina N.A.**, PhD (Medicine), Head, Laboratory of Serology Studies and Allergodiagnosics, Department of Laboratory Diagnostics, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Alkhutova N.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Serology Studies and Allergodiagnosics, Department of Laboratory Diagnostics, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Zhizhina O.L.**, PhD (Medicine), Physician, Clinical Endocrinology Department, St. Elisabeth Municipal Hospital, St. Petersburg, Russian Federation

---

Поступила 26.10.2018

Отправлена на доработку 29.10.2018

Принята к печати 08.11.2018

---

Received 26.10.2018

Revision received 29.10.2018

Accepted 08.11.2018

## ЭКСПРЕССИЯ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ TLR2, TLR3, TLR4 И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ TNF И IL-6 В БИОПТАТАХ ПАЦИЕНТОВ С НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНИ

Боголюбова А.В.<sup>1</sup>, Мишина Е.Е.<sup>2</sup>, Богомолов П.О.<sup>3</sup>, Мациевич М.В.<sup>4</sup>,  
Кокина К.Ю.<sup>3</sup>, Майоров А.Ю.<sup>2</sup>, Белоусов П.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

<sup>4</sup> ООО «Клиническая больница Центросоюза РФ», Москва, Россия

**Резюме.** Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) представляет собой группу тесно ассоциированных с ожирением заболеваний, являющихся одними из наиболее распространенных и социально значимых патологий печени в современном западном мире. Возникновение и прогрессия НАЖБП от простого стеатоза в неалкогольный стеатогепатит с последующим развитием фиброза являются ведущими факторами в патогенезе значительной части случаев наиболее тяжелых патологий печени, таких как цирроз и печеночно-клеточный рак, а также внепеченочных метаболических осложнений НАЖБП, таких как инсулинорезистентность и сахарный диабет 2 типа. Воспалительный компонент является важнейшим фактором патогенеза НАЖБП, в частности в рамках прогрессии простого стеатоза в неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). Вместе с тем роль важнейших медиаторов воспалительного ответа — рецепторов врожденного иммунитета, в частности TOLL-подобных рецепторов, в патогенезе НАЖБП изучена крайне фрагментарно. В представленной работе мы при помощи биоинформатического анализа находящихся в публичном доступе баз данных экспрессионных профилей выявили, что из всех TOLL-подобных рецепторов в нормальной ткани печени человека на достаточно высоком уровне экспрессируются только TOLL-подобные рецепторы TLR1, TLR2, TLR3 и TLR4, экспрессия мРНК трех из которых (TLR2, TLR3 и TLR4), а также важнейших медиаторов иммунного ответа провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли (TNF) и интерлейкина-6 (IL-6) была далее проанализирована нами при помощи ПЦР с обратной транскрипцией в биоптатах печени 20 пациентов с НАЖБП (стеатоз, n = 10; неалкогольный стеатогепатит, n = 10), а также 4 пациентов с

### 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.  
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy  
of Sciences  
119991, Russian Federation, Moscow, Vavilova str., 32.  
Phone: 7 (499) 135-99-64.  
Fax: 7 (499) 135-14-05.  
E-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com

### Образец цитирования:

А.В. Боголюбова, Е.Е. Мишина, П.О. Богомолов, М.В. Мациевич, К.Ю. Кокина, А.Ю. Майоров, П.В. Белоусов  
«Экспрессия TOLL-подобных рецепторов TLR2, TLR3, TLR4 и провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в биоптатах пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5. С. 945-952.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-945-952  
© Боголюбова А.В. и соавт., 2019

### For citation:

A.V. Bogolyubova, E.E. Mishina, P.O. Bogomolov, M.V. Matsievich, K.Yu. Kokina, A.Yu. Mayorov, P.V. Belousov  
“Expression of TLR2, TLR3, TLR4 and proinflammatory TNF and IL-6 cytokines in liver biopsies of nonalcoholic fatty liver disease patients”, Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 945-952.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-945-952  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-945-952

клиническим подозрением на НАЖБП, у которых, однако, в биоптатах печени отсутствовали гистологические признаки НАЖБП. Нами было обнаружено значительное увеличение экспрессии мРНК TLR2, TLR3 и TLR4 в биоптатах печени пациентов с НАСГ по сравнению с контрольной выборкой пациентов без гистологических признаков НАЖБП. Также была показана ассоциация уровня экспрессии мРНК данных рецепторов со степенью повреждения печени по данным гистологического анализа (уровень стеатоза и баллонной дистрофии гепатоцитов), а также с концентрацией в плазме крови пациентов мочевой кислоты, важнейшего эндогенного стимулятора врожденного иммунитета. Полученные нами данные указывают на возможную вовлеченность врожденного иммунитета, а именно Toll-подобных рецепторов, в патогенез НАЖБП.

*Ключевые слова:* Toll-подобные рецепторы, провоспалительные цитокины, неалкогольная жировая болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, стеатоз

## EXPRESSION OF TLR2, TLR3, TLR4 AND PROINFLAMMATORY TNF AND IL-6 CYTOKINES IN LIVER BIOPSIES OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE PATIENTS

Bogolyubova A.V.<sup>a</sup>, Mishina E.E.<sup>b</sup>, Bogomolov P.O.<sup>c</sup>, Matsievich M.V.<sup>d</sup>, Kokina K.Yu.<sup>c</sup>, Mayorov A.Yu.<sup>b</sup>, Belousov P.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Moscow Regional M. Vladimirsky Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> LTD "Clinical Hospital of Russian Central Union", Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a group of conditions closely associated with obesity that are among the most common and socially significant liver diseases in the modern Western world. The emergence and progression of NAFLD from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis with the subsequent development of fibrosis are the leading factors in the pathogenesis of a significant proportion of the most severe liver pathologies, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma, as well as extrahepatic metabolic complications of NAFLD, such as insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. The inflammatory component is one of the most important factors in the pathogenesis of NAFLD, particularly in the context of the progression of simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis. At the same time, the role of the most important mediators of the inflammatory response, innate immunity receptors and the Toll-like receptors in particular, in the pathogenesis of NAFLD has been poorly studied. In the present work, we first used the bioinformatics analysis of the publicly available gene expression databases to demonstrate that only TLR1, TLR2, TLR3 and TLR4 were significantly expressed in the healthy human liver. We then used the reverse transcription PCR to measure the mRNA expression levels of TLR2, TLR3, and TLR4, as well as those of the important pro-inflammatory mediators tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-6 (IL-6), in the liver biopsy specimens obtained from 20 patients with NAFLD (simple steatosis, n = 10; non-alcoholic steatohepatitis, n = 10), as well as from 4 obese patients with clinical suspicion for NAFLD but no histological signs of NAFLD in their liver biopsies. We found a significant increase in the expression of TLR2, TLR3 and TLR4 mRNA in liver biopsy samples obtained from patients with non-alcoholic steatohepatitis as compared to those obtained from controls without histological signs of NAFLD. We were also able to demonstrate the association between the hepatic levels of TLR2, TLR3 and TLR4 mRNAs with the histological degree of liver damage as evidenced by the degree of steatosis and balloon dystrophy of hepatocytes, as well as with the plasma levels of uric acid, the important endogenous stimulator of innate immunity. Our data indicate the possible involvement of innate immunity, particularly the Toll-like receptors, in the pathogenesis of NAFLD.

*Keywords:* Toll-like receptors, proinflammatory cytokines, nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, steatosis

Результаты исследований экспрессии Toll-подобных рецепторов получены за счет средств Российского научного фонда (грант 17-15-01475). Экспрессия провоспалительных цитокинов была изучена в рамках Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (тема № 01201363822).

## Введение

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) — это группа связанных с ожирением патологических состояний печени, характеризующихся накоплением в паренхиме органа аномально количества липидов. Выделяют несколько стадий НАЖБП от печеночного стеатоза до неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), фиброза и цирроза печени (который может прогрессировать в печеночно-клеточный рак) [1]. Ряд исследований показал, что воспаление, сопровождающее прогрессию НАЖБП, может быть связано с сигналингом Toll-подобных рецепторов (TLR) [3, 5, 6, 9, 10].

Toll-подобные рецепторы (TLR) — группа рецепторов врожденного иммунитета, отвечающая за распознавание чужеродных организму бактерий и вирусов. В моделях на животных было неоднократно показано, что НАЖБП сопровождается изменением в уровне бактериальных эндотоксинов, которые, в свою очередь, влияют на экспрессию TLR и активацию их сигнальных путей, приводящих, в частности, к экспрессии провоспалительных цитокинов, таких как TNF [7].

Изучение экспрессии TLR в образцах печени больных НАЖБП ранее проводилось на весьма ограниченных выборках. **Целью данной работы** является изучение экспрессии TLR2, TLR3 и TLR4, а также провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в 20 образцах печени больных с НАЖБП и 4 контрольных образцах и анализ корреляции между экспрессией этих молекул и клинико-морфологическими параметрами НАЖБП.

## Материалы и методы

### Пациенты

Для исследования были взяты пациенты, проходившие обследование в Институте диабета ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России и в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского в 2017–2018 годах. Для всех пациентов было проведено полное клинико-лабораторное исследование: оценка липидного спектра (оценка уровней общего холестерина, триглицеридов, ЛПНП, ЛПВП), печеночной функции (АЛТ, АСТ, билирубин общий), почечной функции (креатинин, мочевины), электролитного статуса (кальций общий), анализ на ферритин, общий белок,

**ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ, СОГЛАСНО ДАННЫМ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА**

TABLE 1. EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN LIVER TISSUE, ACCORDING TO TRANSCRIPTOME ANALYSIS

|       | HPA | GTEX | FANTOM5 |
|-------|-----|------|---------|
| TLR1  | 4,5 | 0,4  | 8,2     |
| TLR2  | 3,8 | 2,7  | NA      |
| TLR3  | 7,7 | 0,8  | 13,6    |
| TLR4  | 9,6 | 1,5  | 28,6    |
| TLR5  | 0,8 | 0,4  | 1,9     |
| TLR6  | 1   | 0,2  | 0,4     |
| TLR7  | 0,3 | 0    | 1,4     |
| TLR8  | 1,1 | 0,1  | 7,2     |
| TLR9  | 0   | 0,6  | NA      |
| TLR10 | 0,2 | 0    | 0,4     |

**Примечание.** HPA – Human protein atlas, GTEX – Genome-based tissue expression.

Note. HPA, Human protein atlas; GTEX, Genome-based tissue expression.

щелочную фосфатазу, гамма-ГТ, мочевую кислоту. Кроме того, всем пациентам проведена биоимпедансометрия, а также ультразвуковое исследование брюшной полости для оценки размеров и структурных изменений печени и эластография сдвиговой волны печени для оценки ее упругости и стадии фиброза по системе METAVIR.

Далее всем пациентам из исследуемой группы была выполнена биопсия печени под ультразвуковым контролем с дальнейшим морфологическим исследованием биоптата, при котором оценивались структурные изменения ткани: индекс гистологической активности, индекс фиброза (по методу K.G. Ishak), а также наличие и степень выраженности стеатоза гепатоцитов. Для определения степени поражения печени использовалась классификация NAS (NAFLD activity score, уровень активности НАЖБП).

Исходя из полученных результатов, диагноз «НАСГ и стеатоз» был поставлен 10 и 10 пациентам соответственно, у 4 пациентов признаков НАЖБП обнаружено не было, и они составили контрольную группу.

### Выделение РНК и синтез кДНК

Пробы ткани печени измельчали в 500 мкл реактива ExtractRNA (Евроген, Москва) и далее выделяли тотальную РНК согласно протоколу производителя. Концентрацию полученной РНК измеряли при помощи прибора NanoDrop

Inc. Обратную транскрипцию проводили при помощи набора MMLV RT Kit (Евроген, Москва), используя 2 мкг тотальной РНК и олиго-dT/Random праймеров, взятых в соотношении 1:2, согласно протоколу производителя.

#### ПЦР в реальном времени

Уровень мРНК Toll-подобных рецепторов TLR2, TLR3, TLR4, а также провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 измеряли методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, последовательности которых представлены в таблице 1, и смеси qPCR mix-HS SYBR + LowROX (Евроген, Россия) [11]. Относительный уровень экспрессии генов определяли методом  $\Delta\Delta C_t$  и нормализовали на уровень экспрессии референтного гена человеческого  $\beta$ -актина.

Список праймеров, использованных при проведении количественного ПЦР анализа:

|          |                           |
|----------|---------------------------|
| ActB-Fwd | ACTGGGACGACATGGAGAAA      |
| ActB-Rev | GGCGTACAGGGATAGCACAG      |
| TLR2-Fwd | GAAAGCTCCAGCAGGAACATC     |
| TLR2-Rev | GAATGAAGTCCCGCTTATGAAGACA |
| TLR3-Fwd | GGACTTTGAGGCGGGTGT        |
| TLR3-Rev | TGTTGAAGTGCATGATGTACCTTGA |
| TLR4-Fwd | TGCGTGGAGGTGGTTCCTA       |
| TLR4-Rev | GGCTCTGATATGCCCCATCT      |
| TNF-Fwd  | CTGCACTTTGGAGTGATCGG      |
| TNF-Rev  | TGAGGGTTTGCTACAACATGG     |
| IL6-Fwd  | AACAACCTGAACCTTCCA        |
| IL6-Rev  | GCTTGTTCTCTCACTACTCTC     |

#### Статистическая обработка результатов

Сравнение экспрессии молекул между исследуемыми группами проводили в программе GraphPad Prism 6.0 с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

Анализ корреляции проводили с использованием языка программирования R с применением пакета Hmisc для вычисления коэффициента корреляции Спирмена и соответствующих р-уровней значимости.

## Результаты

Для формирования перечня Toll-подобных рецепторов, которые мы хотели бы изучить в рамках данного исследования, нами была оценена экспрессия всех Toll-подобных рецепторов человека по данным консорциумов FANTOM5, Human Protein Atlas (HPA) и Genome-based Tissue

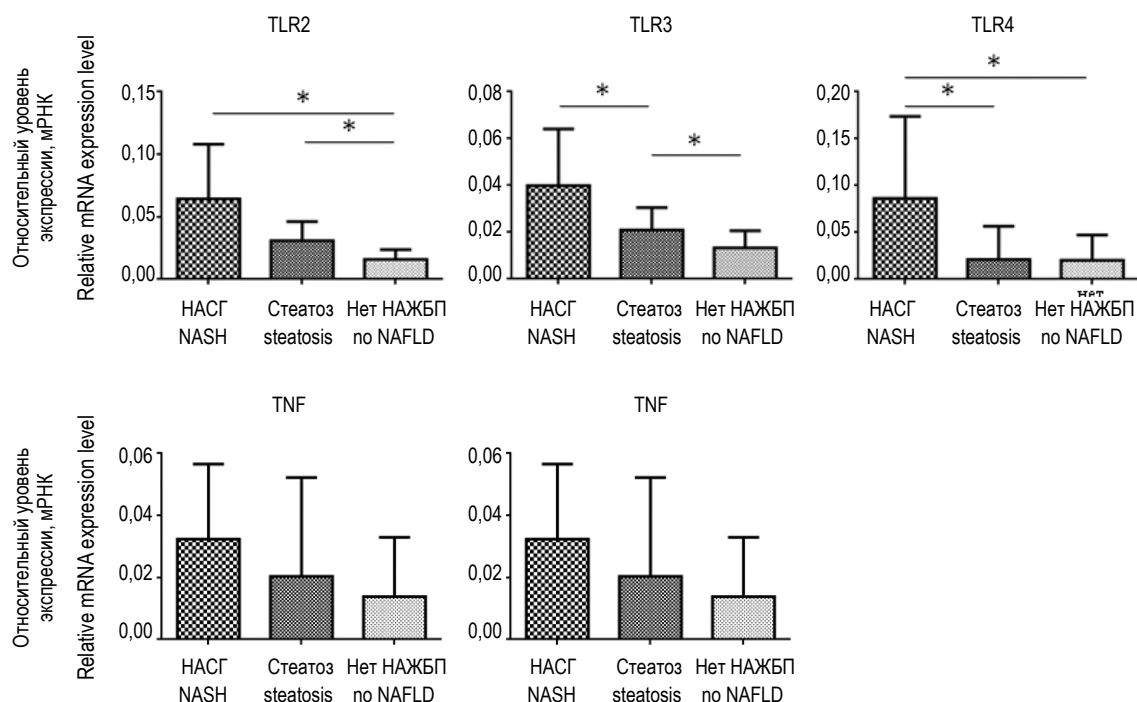
Expression (GTEx), взятым из базы данных Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>). Было показано, что в нормальной ткани печени на детектируемом уровне экспрессируются TLR1, TLR2, TLR3 и TLR4, тогда как экспрессия остальных молекул наблюдается на очень низком уровне (табл. 1). Поскольку TLR1 и TLR2 формируют гетеродимер, нами было принято решение взять в исследование один из рецепторов, а именно TLR2.

Был проведен анализ экспрессии трех Toll-подобных рецепторов, TLR2, TLR3, TLR4, а также провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в пробах печени больных НАЖБП различных стадий (стеатоз и НАСГ) и контрольных пробах методом количественного ПЦР (рис. 1). Экспрессия всех Toll-подобных рецепторов увеличивается в ходе прогрессии заболевания. Статистически значимые различия наблюдаются между группой с НАСГ и контролем для всех исследуемых рецепторов. В то же время различия между двумя стадиями НАЖБП, НАСГ и стеатозом являются статистически значимыми для TLR3 и TLR4; в случае TLR2 такая тенденция прослеживается, однако является статистически недостоверной.

Статистически значимых различий между уровнями экспрессии провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в биоптатах печени пациентов НАЖБП и контрольными пробами показать не удалось (рис. 2). Для TNF такая тенденция прослеживается, однако большой разброс значений относительной экспрессии не позволяет считать результаты статистически значимыми.

Нами были исследованы факторы, которые ассоциированы с повышенной экспрессией Toll-подобных рецепторов в клетках печени больных с НАЖБП. Для этого был проведен корреляционный анализ экспрессии всех анализируемых молекул с клиническими параметрами пациентов, включающими параметры, характеризующие нарушения углеводного обмена, метаболизм липидов и мочевины, а также с цитологическими параметрами печени, характеризующими степень ее поражения (процент стеатоза, баллонная дистрофия).

В таблице 2 приведены результаты корреляционного анализа для параметров, которые демонстрировали статистически значимую связь с уровнем экспрессии анализируемой мРНК. Мы видим, что уровень экспрессии как Toll-подобных рецепторов, так и провоспалительных цитокинов коррелирует между собой. Кроме того, корреляция наблюдалась между параметрами, указывающими на степень поражения печени (процент стеатоза, наличие баллонной дистрофии), и экспрессией нескольких Toll-подобных рецепторов. Также была отмечена корреляция между повышенным содержанием мочевой кислоты в сыво-



**Рисунок 1. Уровень относительной экспрессии мРНК Толл-подобных рецепторов TLR2, TLR3, TLR4, а также провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в биоптатах печени с НАЖБП (НАСГ, n = 10; стеатоз, n = 10) и контрольных образцах (n = 4)**

Примечание. \* – p < 0,05 по U-критерию Манна–Уитни.

Figure 1. The level of relative expression of the mRNA of Toll-like receptors TLR2, TLR3, TLR4 receptors, as well as of the proinflammatory cytokines TNF and IL-6 in liver biopsy samples with NAFLD (NASH, n = 10; steatosis, n = 10) and control samples (n = 4)

Note. \*, p < 0.05 according to the Mann–Whitney U test.

**ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ЭКСПРЕССИЕЙ мРНК АНАЛИЗИРУЕМЫХ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ И НЕКОТОРЫМИ КЛИНИКО-ПАТОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ (КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМЕНА)**

TABLE 2. CORRELATION BETWEEN mRNA EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTORS AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND SOME CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS (SPEARMAN CORRELATION COEFFICIENTS)

|                                                                                 | TLR2  | TLR3  | TLR4  | TNF   | IL-6  |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| TLR2                                                                            | 1     | 0,87* | 0,77* | 0,75* | 0,52* |
| TLR3                                                                            | 0,87* | 1     | 0,76* | 0,70* | 0,49* |
| TLR4                                                                            | 0,77* | 0,76* | 1     | 0,87* | 0,68* |
| TNF                                                                             | 0,75* | 0,70* | 0,87* | 1     | 0,74  |
| IL-6                                                                            | 0,52* | 0,49* | 0,68* | 0,74* | 1     |
| <b>С (мочевая кислота)</b><br>C (uric acid)                                     | 0,47* | 0,44* | 0,34* | 0,37  | 0,51* |
| <b>Стеатоз (по системе Брунта)</b><br>Steatosis (according to the Brunt system) | 0,46* | 0,45* | 0,08  | 0,07  | -0,21 |
| <b>Баллонная дистрофия</b><br>Ballooning degeneration                           | 0,52* | 0,53* | 0,37* | 0,24  | -0,02 |
| <b>Баллы по NAS</b><br>NAS scores                                               | 0,44* | 0,50* | 0,22  | 0,18  | -0,05 |

Примечание. \* – p < 0,05.

Note. \*, p < 0.05.

ротке крови и экспрессией большинства изучаемых молекул.

## Обсуждение

НАЖБП — одно из наиболее распространенных заболеваний печени в развитых странах. В то же время механизмы ее развития и прогрессии изучены не до конца. Показано, что важнейшими факторами, приводящими к развитию НАЖБП, являются ожирение, нарушение метаболизма глюкозы, а также изменения в составе микрофлоры кишечника [1].

Рецепторы врожденного иммунитета, такие как Toll-подобные рецепторы, являются ключевыми факторами иммунной системы, реагирующими в ответ на факторы патогенности (PAMP — pathogen associated molecular patterns). Кроме того, для некоторых из TLR показана активация в ответ на экспрессию факторов стресса (DAMP — danger associated molecular patterns) [4]. В ходе прогрессии НАЖБП может наблюдаться увеличение как факторов патогенности в результате дисрегуляции микробиома кишечника, так и факторов стресса, связанного с нарушениями метаболизма глюкозы и липидов в организме [8].

Ранее в нескольких работах было показано увеличение экспрессии TLR4 в печени в ходе прогрессии НАЖБП. Так, в работе Sharifnia и соавт. была исследована экспрессия TLR4 в биопсиях печени 61 пациенток с НАЖБП методом ПЦР в реальном времени, а также сывороточный уровень липополисахарида, и показано значительное увеличение данных параметров в группе пациенток с НАСГ по сравнению с пациентами со стеатозом [10]. Несколько исследований также показывают увеличение экспрессии Toll-подобных рецепторов в сыворотке крови и в биопсиях печени пациентов с НАЖБП. Так, в работе du Plessis с соавт. было проанализировано содержание TLR2 и TLR4 в сыворотке 81 пациента с различными стадиями НАЖБП и 10 контрольных сыворотках с применением иммуноферментного анализа и показаны различия между этими двумя группами [9]. В работе Liu и соавт. было проведено иммуногистохимическое окрашивание срезов биопсий печени пациентов с НАСГ, алкогольным стеатогепатитом и пациентов без признаков печеночного стеатоза на TLR3 и TLR4 и показано, что экспрессия этих молекул значительно выше в группах больных стеатогепатитом различной природы, нежели в контрольной группе [6]. В работе же Kiziltas и соавт. сравнивали соотношение различных однонуклеотидных полиморфизмов TLR4 между группами пациентов с НАЖБП и здоровых доноров и показали, что в группе больных НАЖБП присутствие гетерозиготной мутации Asp299Gly значительно ниже, чем в контрольной группе [5].

Эти данные могут указывать на вовлеченность TLR4 в патогенез НАЖБП.

Экспрессия всех Toll-подобных рецепторов в биоптатах печени была исследована в работе Kanuri и соавт., в которой было показано, что экспрессия TLR1-5 значительно выше у пациентов с НАЖБП по сравнению с контролем, тогда как экспрессия TLR6-10 не различалась между группами [3]. Существенным недостатком этого исследования является то, что авторы в ходе анализа результатов не делили когорту пациентов с НАЖБП на различные стадии заболевания.

Нами был проведен анализ экспрессии Toll-подобных рецепторов TLR2, TLR3 и TLR4, экспрессия которых наблюдается и в здоровой ткани печени, а также провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в биоптатах печени 20 пациентов с НАЖБП (у 10 из них был диагностирован стеатоз, у 10 — НАСГ) и 4 контрольных образцах. Кроме того, был проведен корреляционный анализ между различными клинико-диагностическими параметрами и уровнем экспрессии анализируемых молекул.

Нами было показано, что экспрессия всех анализируемых Toll-подобных рецепторов увеличивается в ходе прогрессии заболевания, что соотносится с литературными данными. Экспрессия же провоспалительных цитокинов статистически не различается между анализируемыми группами (рис. 1). В случае TNF наблюдается закономерное увеличение экспрессии в ходе прогрессии НАЖБП, однако, ввиду значительных колебаний значений, этот тренд не является статистически достоверным. По всей видимости, необходима большая выборка пациентов, чтобы подтвердить наши наблюдения.

В результате корреляционного анализа было показано, что некоторые клинико-диагностические параметры связаны с экспрессией анализируемых молекул (табл. 2). Так, показатели поражения печени, такие как уровень стеатоза (по Brunt) и баллонной дистрофии, статистически значимо коррелируют с увеличением экспрессии Toll-подобных рецепторов. Возможно, это связано с увеличением факторов стресса, сопровождающим разрушение клеток печени в процессе НАЖБП. Кроме того, существенная корреляция наблюдалась между экспрессией Toll-подобных рецепторов и уровнем мочевой кислоты в сыворотке крови пациентов. Мочевая кислота является одним из наиболее изученных факторов стресса, который может активировать рецепторы врожденного иммунитета [2]. Тем не менее ее вовлеченность в прогрессию НАЖБП ранее не была показана. Таким образом, оценка экспрессии Toll-подобных рецепторов может служить дополнительным параметром при оценке прогрессии НАЖБП.



## Список литературы / References

1. Benedict M., Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J. Hepatol.*, 2017, Vol. 9, no. 16, pp. 715-732.
2. Ghaemi-Oskouie F., Shi Y. The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation. *Curr. Rheumat. Rep.*, 2011, Vol. 13, no. 2, pp. 160-166.
3. Kanuri G., Ladurner R., Skibovskaya J., Spruss A., Königsrainer A., Bischoff S.C., Bergheim I. Expression of Toll-like receptors 1-5 but not TLR 6-10 is elevated in livers of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.*, 2015, Vol. 35, no. 2, pp. 562-568.
4. Kawasaki T. and Kawai T. Toll-like Receptor signaling pathways. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 461.
5. Kiziltas S., Ata P., Colak Y., Mesçi B., Senates E., Enc F., Ulasoglu C., Tuncer I., Oguz A. TLR4 gene polymorphism in patients with nonalcoholic fatty liver disease in comparison to healthy controls. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, 2014, Vol. 12, no. 3, pp. 165-170.
6. Liu H., Li J., Tillman B., Morgan T.R., French B.A., French S.W. TLR3/4 Signaling is mediated via the NFκB-CXCR4/7 pathway in human alcoholic hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis which formed mallory-denk bodies. *Exp. Mol. Pathol.*, 2014, Vol. 97, no. 2, pp. 234-240.
7. Miura K., Ohnishi H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 23, pp. 7381-7391.
8. Miura K., Seki E., Ohnishi H., Brenner D.A. Role of Toll-like receptors and their downstream molecules in the development of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2010, Vol. 2010, 362847. doi: 10.1155/2010/362847.
9. du Plessis J., Korf H., van Pelt J., Windmolders P., Vander Elst I., Verrijken A., Hubens G., van Gaal L., Cassiman D., Nevens F., Francque S., van der Merwe S. Pro-inflammatory cytokines but not endotoxin-related parameters associate with disease severity in patients with NAFLD. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 12, e0166048. doi: 10.1371/journal.pone.0166048.
10. Sharifnia T., Antoun J., Verriere T.G., Suarez G., Wattacheril J., Wilson K.T., Peek R.M. Jr, Abumrad N.N., Flynn C.R. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am. J. Physiology. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2015, Vol. 309, no. 4, pp. G270-278.
11. Sviriaeva E.N., Korneev K.V., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Kuprash D.V. Modeling of viral-bacterial coinfections at the molecular level using agonists of innate immunity receptors. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2016, Vol. 471, no. 1, pp. 393-395.

### Авторы:

**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, Москва, Россия

**Мишина Е.Е.** — научный сотрудник отдела прогнозирования и инноваций диабета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Богомолов П.О.** — к.м.н., профессор, руководитель отдела гепатологии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

**Мацеевич М.В.** — к.м.н., заведующая отделением гастроэнтерологии ООО «Клиническая больница Центросоюза РФ», Москва, Россия

### Authors:

**Bogolyubova A.V.**, Junior Research Associate, Laboratory of Intracellular Signaling in Health and Disease, V. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Mishina E.E.**, Research Associate, Department of Prediction and Innovations in Diabetes, National Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

**Bogomolov P.O.**, PhD (Medicine), Head, Department of Hepatology, Moscow Regional M. Vladimirovsky Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

**Matsievich M.V.**, PhD (Medicine), Head, Department of Gastroenterology, LTD "Clinical Hospital of Russian Central Union", Moscow, Russian Federation

**Кокина К.Ю.** — научный сотрудник отдела гепатологии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

**Майоров А.Ю.** — д.м.н., заведующий отделом прогнозирования и инноваций диабета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Белусов 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

**Kokina K.Yu.**, Research Associate, Department of Hepatology, Moscow Regional M. Vladimirovsky Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

**Mayorov A.Yu.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Prediction and Innovations in Diabetes, National Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

**Belousov P.V.**, Junior Research Associate, Laboratory of Intracellular Signaling in Health and Disease, V. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 02.10.2018  
Отправлена на доработку 15.10.2018  
Принята к печати 19.10.2018

---

Received 02.10.2018  
Revision received 15.10.2018  
Accepted 19.10.2018

## РОЛЬ ЦИТОКИН-ОПОСРЕДОВАННЫХ МЕХАНИЗМОВ В РАЗВИТИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ

Паскова Е.В.<sup>1</sup>, Маркелова Е.В.<sup>1</sup>, Шахгельдян К.И.<sup>2,3</sup>, Гельцер Б.И.<sup>3</sup>,  
Кригер А.Б.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Владивостокский государственный университет экономики и сервиса», г. Владивосток, Россия

<sup>3</sup> ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

**Резюме.** Остеомиелит нижней челюсти является одной из актуальных проблем современной медицины. Причин возникновения гнойно-некротических процессов челюстных костей достаточно много, в том числе играют роль нарушения в системах врожденного и адаптивного иммунитета. Цель исследования состояла в определении содержания TNF $\alpha$ , IL-17, IL-4 в сыворотке крови и смешанной слюне у пациентов с неосложненными переломами нижней челюсти и посттравматическим остеомиелитом для выяснения возможности использования данных показателей для ранней диагностики посттравматических осложнений. В статье представлены результаты исследования оппозитных цитокинов фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), интерлейкина-17 (IL-17) и интерлейкина-4 (IL-4) в сыворотке крови и смешанной слюне у больных с неосложненным переломом нижней челюсти и с посттравматическим остеомиелитом на первые и десятые сутки наблюдения. С помощью однослойных нейронных сетей были построены бинарные классификаторы, позволяющие стратифицировать больных по клинической форме заболевания и прогнозировать его течение. Вероятность осложненного перелома нижней челюсти описывается соотношением  $P = 1/(1+e^{-z})$ , где показатель  $z$  определяется через уровень TNF $\alpha$ , IL-17 и IL-4 в первый и десятый день наблюдения. Моделирование подтвердило высокую прогностическую значимость TNF $\alpha$  и IL-17 в сыворотке крови для ранней верификации посттравматического остеомиелита, что подтверждалось показателями ОТК и ROC, которые в различных моделях варьировали от 87 до 100%. К наиболее точным следует отнести модели 4 и 5, где в качестве предикторов использовались TNF $\alpha$ , зафиксированный на десятый день исследования, и комбинация TNF $\alpha$  и IL-17, полученные в первый день госпитализации. Моделирование по результатам исследования иммунологических индикаторов в смешанной слюне показало, что предиктивными свойствами обладают только IL-4 и IL-17, зарегистрированные на десятый день госпитализации, что отличало эти бинарные классификаторы от аналогичных, полученных по уровню концентрации цитокинов в сыворотке крови. Результаты исследования свидетельствуют о важной роли нарушений в системе про- и противовоспалительных цитокинов в патогенезе посттравматического остеомиелита.

**Ключевые слова:** посттравматический остеомиелит, цитокины, нижняя челюсть, бинарный классификатор, искусственная нейронная сеть

### Адрес для переписки:

Паскова Елена Владимировна  
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 4.  
Тел.: 8 (950) 288-53-45.  
E-mail: popovavl@list

### Address for correspondence:

Paskova Elena V.  
Pacific State Medical University  
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakova ave., 4.  
Phone: 7 (950) 288-53-45.  
E-mail: popovavl@list.ru

### Образец цитирования:

Е.В. Паскова, Е.В. Маркелова, К.И. Шахгельдян, Б.И. Гельцер, А.Б. Кригер «Роль цитокин-опосредованных механизмов в развитии посттравматического остеомиелита нижней челюсти» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5. С. 953-958.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-953-958

© Паскова Е.В. и соавт., 2019

### For citation:

E.V. Paskova, E.V. Markelova, K.I. Shakhgeldyan, B.I. Geltser, A.B. Kriger "Role of cytokine-mediated mechanisms in development of post-traumatic mandibular osteomyelitis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 953-958.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-953-958

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-953-958

## ROLE OF CYTOKINE-MEDIATED MECHANISMS IN DEVELOPMENT OF POST-TRAUMATIC MANDIBULAR OSTEOMYELITIS

Paskova E.V.<sup>a</sup>, Markelova E.V.<sup>a</sup>, Shakhgeldyan K.I.<sup>b, c</sup>, Geltser B.I.<sup>c</sup>, Kriger A.B.<sup>b, c</sup>

<sup>a</sup> Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

<sup>b</sup> Vladivostok State University of Economics and Service, Vladivostok, Russian Federation

<sup>c</sup> Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

**Abstract.** Osteomyelitis of the lower jaw is one of the urgent problems of modern medicine. There are many reasons for the evolvement of purulent necrotic processes of the jaw bones, including the role of disorders in the systems of innate and adaptive immunity. The aim of the study was to determine the content of TNF $\alpha$ , IL-17, IL-4 in serum and mixed saliva in patients with uncomplicated mandibular fractures and posttraumatic osteomyelitis to determine the possibility of using these indicators for early diagnosis of posttraumatic complications. The article presents the results of a study of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-17 (IL-17) and interleukin-4 (IL-4) cytokines in serum and mixed saliva in patients with uncomplicated mandibular fracture and post-traumatic osteomyelitis at the first and tenth days of observation. By means of single-layer neural networks, binary classifiers were built, allowing patients to be stratified by the clinical form of the disease and to predict its course. The probability of uncomplicated mandibular fracture is described by the ratio  $P = 1/(1+e^{-z})$ , where the index  $z$  is determined by the level of TNF $\alpha$ , IL-17, and IL-4 at the first and tenth day of observation. The simulation confirmed high prognostic significance of serum TNF $\alpha$  and IL-17 for early verification of posttraumatic osteomyelitis, which was confirmed by the OTC and ROC indices, which varied from 87 to 100% in different models. Models 4 and 5, where TNF $\alpha$  recorded on the tenth day of the study was used as predictors, and a combination of TNF $\alpha$  and IL-17 obtained on the first day of hospitalization, were the most accurate. Modeling the results of the study of immunological indicators in the mixed saliva showed that the predictive properties have only IL-4 and IL-17, was on the tenth day of hospitalization that distinguishes these binary classifiers from similar indexes, derive from the levels of cytokines in blood serum. The results of the study indicate the important role of disorders in the system of pro- and anti-inflammatory cytokines in pathogenesis of post-traumatic osteomyelitis.

**Keywords:** mandibular osteomyelitis, serum cytokines, TNF $\alpha$ , IL-17, IL-4, prognostic value

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-03131.

Переломы нижней челюсти составляют около 90% всех травм челюстно-лицевой области и 10% от общего уровня травматических заболеваний человека [1, 2, 5]. Посттравматические, в том числе воспалительные, осложнения у этих больных фиксируются в 30% случаев и чаще всего определяются анатомо-физиологическими особенностями нижней челюсти, наличием хронических одонтогенных очагов инфекции, посттравматическим повреждением мягких тканей, гематомами и другими факторами [3, 4]. В последние годы все большее внимание исследователей привлекают цитокин-опосредованные механизмы в развитии широкого круга патофизиологических процессов, в том числе травматических повреждений и воспалении тканей, а также их репарации и регенерации [4, 6].

Известно, что у здоровых лиц метаболизм костной ткани обеспечивается балансом про-

цессов костеобразования и костной резорбции. В регуляции последней важное значение принадлежит продукции фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), активирующего остеокласты и инициирующего воспалительную реакцию [4, 6]. Малоизученной при заболеваниях челюстно-лицевой области остается роль противовоспалительного цитокина интерлейкина-17 (IL-17), к одной из функций которого относят стимуляцию активности нейтрофилов. Кроме того, доказано, что он усиливает дифференцировку остеобластов в зрелые остеокласты [7]. Итерлейкин-4 (IL-4) снижает активность деструктивно-воспалительных процессов в тканях пародонта, ограничивает развитие остеопороза и выполняет противовоспалительные функции. Он стимулирует образование антител, продукцию IgE, угнетает фактор роста В-лимфоцитов, индуцирует противовоспалительные цитокины [4, 10]. IL-4 подавляет синтез IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  и является их антагонистом [4].

**Цель исследования** состояла в определении содержания TNF $\alpha$ , IL-17, IL-4 в сыворотке крови

и смешанной слюне у пациентов с неосложненными переломами нижней челюсти и посттравматическим остеомиелитом для выяснения возможности использования данных показателей для ранней диагностики посттравматических осложнений.

## Материалы и методы

Объектом исследования были 40 пациентов, находившиеся на стационарном лечении в отделении челюстно-лицевой хирургии ГБУЗ «Краевой клинической больницы № 2» г. Владивостока. В I группу были включены 18 больных с неосложненными переломами нижней челюсти, во II – 22 пациента с острым посттравматическим остеомиелитом нижней челюсти. Мужчин было 28, женщин – 12. Средний возраст обследованных составил 34,2 года. Группу контроля составили 26 здоровых добровольцев того же возраста и пола. Уровень цитокинов исследовали с применением реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc. (США) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Забор материала производился в первые сутки госпитализации пациента в стационар и на 10 день лечения. Учет результатов производили с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия). Уровень статистической значимости, при котором отклонялись нулевые гипотезы, составлял менее 0,05. Статистическую достоверность различий между

сравняемыми группами определяли методом Манна–Уитни. Были разработаны бинарные классификаторы для стратификации больных с посттравматическим остеомиелитом и неосложненным переломом нижней челюсти. Модели были построены с помощью простой однослойной нейронной сети пакета nnet R-studio. Для оценки качества моделей применяли площадь под ROC-кривой (AUC), критерий Акаике (AIC) и относительную точность классификации (ОТК), которую определяли как отношение количества корректно установленных модельных диагнозов к общему количеству больных.

## Результаты и обсуждение

Содержание TNF $\alpha$  в сыворотке крови у обследованных двух групп больных в первые сутки госпитализации было существенно выше контрольных значений ( $p < 0,0001$ , табл. 1). Вместе с тем при неосложненной форме перелома этот показатель был в 1,5 раза ниже, чем у лиц с посттравматическим остеомиелитом ( $p < 0,01$ ). Известно, что данный цитокин регулирует иммунновоспалительную реакцию при травмах или инфекциях, являясь главным стимулятором для нейтрофилов и эндотелиальных клеток в процессах их взаимодействия, увеличения количества фибробластов при заживлении раны [7].

В ходе исследования было установлено, что у пациентов I и II групп уровень IL-17 более

**ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С НЕОСЛОЖНЕННЫМ И ОСЛОЖНЕННЫМ ПЕРЕЛОМОМ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ, Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )**

TABLE 1. LEVEL OF CYTOKINES IN THE SERUM OF PATIENTS WITH UNCOMPLICATED AND COMPLICATED FRACTURE OF THE LOWER JAW, Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )

| Показатели<br>Parameters         | Пациенты с неосложненными переломами челюстей<br>(I группа)<br>Patients with uncomplicated jaw fractures<br>(I group)<br>n = 18 |                                       | Острый посттравматический остеомиелит нижней челюсти<br>(II группа)<br>Acute post-traumatic osteomyelitis of the lower jaw<br>(II group)<br>n = 22 |                                  | Группа контроля<br>Control group<br>n = 26       |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------|
|                                  | 1 сутки<br>1 <sup>st</sup> day                                                                                                  | 10 сутки<br>10 <sup>th</sup> day      | 1 сутки<br>1 <sup>st</sup> day                                                                                                                     | 10 сутки<br>10 <sup>th</sup> day |                                                  |
| TNF $\alpha$<br>(пг/мл)<br>pg/ml | 11,8***<br>(7,2-12,4)<br>$p < 0,01$                                                                                             | 2,76***<br>(1,6-4,3)<br>$p < 0,001$   | 16,3**<br>(12,6-28,9)                                                                                                                              | 14,35**<br>(13-19)               | 1,63**<br>(0,40-2,24)<br>$p < 0,0001$            |
| IL-17<br>(пг/мл)<br>pg/ml        | 16,19**<br>(15,1-16,2)<br>$p < 0,001$                                                                                           | 15,34**<br>(12,2-16,8)<br>$p < 0,001$ | 19,1**<br>(18,3-19,2)                                                                                                                              | 18,7**<br>(17,7-19,8)            | 2,81***<br>(1,2-5,4)<br>$p < 0,0001$             |
| IL-4<br>(пг/мл)<br>pg/ml         | 6,2***<br>(3,6-14,7)<br>$p < 0,05$                                                                                              | 6,37**<br>(3,5-9,5)<br>$p = 0,38$     | 1,56<br>(1,54-1,76)                                                                                                                                | 5,62<br>(3,2-6,9)                | 2,11***<br>(1,9-4,5)<br>$p = 0,09$<br>$p = 0,13$ |

Примечание. Статистическая достоверность выборочной медианы: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Note. Statistical reliability of the sample median: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

**ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В СМЕШАННОЙ СЛЮНЕ ПАЦИЕНТОВ С НЕОСЛОЖНЕННЫМ И ОСЛОЖНЕННЫМ ПЕРЕЛОМОМ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ, Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

**TABLE 2. LEVEL OF CYTOKINES IN THE MIXED SALIVA OF PATIENTS WITH UNCOMPLICATED AND COMPLICATED FRACTURE OF THE MANDIBLE, Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

| Показатели<br>Parameters                          | Пациенты с неосложненными переломами челюстей<br>(I группа)<br>Patients with uncomplicated jaw fractures (I group)<br>n = 18 |                                    | Острый посттравматический остеомиелит нижней челюсти<br>(II группа)<br>Acute post-traumatic osteomyelitis of the lower jaw (II group)<br>n = 22 |                                  | Группа контроля<br>Control group<br>n = 26      |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------|
|                                                   | 1 сутки<br>1 <sup>st</sup> day                                                                                               | 10 сутки<br>10 <sup>th</sup> day   | 1 сутки<br>1 <sup>st</sup> day                                                                                                                  | 10 сутки<br>10 <sup>th</sup> day |                                                 |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b><br>(пг/мл)<br>pg/ml | 5,01***<br>(4,87-6,20)<br>p < 0,0001                                                                                         | 3,11***<br>(2,65-3,43)<br>p < 0,01 | 13,45**<br>(11,23-15,00)                                                                                                                        | 5,32**<br>(4,93-6,65)            | 2,25*<br>(1,8-2,9)<br>p < 0,01<br>p < 0,001     |
| <b>IL-17</b><br>(пг/мл)<br>pg/ml                  | 12,34**<br>(9,4-13,8)<br>p = 0,49                                                                                            | 7,32**<br>(5,4-8,8)<br>p < 0,01    | 13,21<br>(11,65-14,70)                                                                                                                          | 18,54<br>(17,7-19,5)             | 3,72***<br>(1,42-4,44)<br>p < 0,0001            |
| <b>IL-4</b><br>(пг/мл)<br>pg/ml                   | 7,16***<br>(2,0-9,9)<br>p = 0,34                                                                                             | 2,39***<br>(1,7-3,4)<br>p < 0,001  | 3,45<br>(3,21-3,70)                                                                                                                             | 18,76<br>(17,5-19,8)             | 0,95***<br>(0,95-1,12)<br>p < 0,01<br>p < 0,001 |

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

**ТАБЛИЦА 3. МОДЕЛИ БИНАРНОГО КЛАССИФИКАТОРА ДЛЯ РАННЕЙ ВЕРИФИКАЦИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА ПО УРОВНЮ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

**TABLE 3. BINARY CLASSIFICATION MODELS FOR EARLY VERIFICATION OF POSTTRAUMATIC OSTEOMYELITIS BY CYTOKINE LEVEL IN SERUM**

| № | Модель<br>Model                                              | День<br>Day | ОТК<br>OTC          | AIC   | ROC  |
|---|--------------------------------------------------------------|-------------|---------------------|-------|------|
| 1 | $z = 13,8 \cdot \text{IL-17-4,2}$                            | 1           | 0,875 (0,710-0,960) | 42,35 | 0,87 |
| 2 | $z = 131,1 \cdot \text{IL-17-59,8}$                          | 10          | 0,97 (0,84-0,99)    | 9,17  | 0,99 |
| 3 | $z = 18,1 \cdot \text{TNF}\alpha-2$                          | 1           | 0,89 (0,76-0,96)    | 41    | 0,89 |
| 4 | $z = 104,5 \cdot \text{TNF}\alpha-14,87$                     | 10          | 1,00 (0,92-1,00)    | 4,3   | 1    |
| 5 | $z = 70 \cdot \text{TNF}\alpha + 34 \cdot \text{IL-17-14,3}$ | 1           | 1,00 (0,80-1,00)    | 10,1  | 1    |

**ТАБЛИЦА 4. МОДЕЛИ БИНАРНОЙ КЛАССИФИКАЦИИ ДЛЯ РАННЕЙ ВЕРИФИКАЦИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА ПО УРОВНЮ ЦИТОКИНОВ В СМЕШАННОЙ СЛЮНЕ**

**TABLE 4. BINARY CLASSIFICATION MODELS FOR EARLY VERIFICATION OF POSTTRAUMATIC OSTEOMYELITIS BY CYTOKINE LEVEL IN MIXED SALIVA**

| № | Модель<br>Model                        | День<br>Day | ОТК<br>OTC        | AIC  | ROC  |
|---|----------------------------------------|-------------|-------------------|------|------|
| 1 | $z = 1,48 \cdot \text{IL-17-0,63}$     | 1           | 0,55 (0,35-0,75)  | 40   | 0,62 |
| 2 | $z = 15,5 \cdot \text{IL-17-2,5}$      | 10          | 0,92 (0,76-0,99)  | 13,4 | 0,93 |
| 3 | $z = 0,44 \cdot \text{IL-4-2,7}$       | 10          | 0,875 (0,71-0,96) | 26,7 | 0,92 |
| 4 | $z = 4,22 \cdot \text{TNF}\alpha-1,26$ | 10          | 0,67 (0,50-0,81)  | 48   | 0,7  |

чем в 5 раз превышал контрольные значения ( $p < 0,0001$ ). Его содержание в сыворотке крови у больных с острым остеомиелитом было до-

стоверно выше показателей в группе пациентов с неосложненным переломом нижней челюсти ( $p < 0,001$ ). При анализе содержания противо-

воспалительного цитокина IL-4 было зафиксировано, что его значения в исследуемых группах существенно различались между собой ( $p < 0,05$ ). Так, в первый день госпитализации максимальный уровень данного показателя имел место у больных I группы, а минимальный — у больных II группы.

К десятому дню исследования в группе больных с неосложненными переломами системный уровень TNF $\alpha$  в сыворотке крови стремился к норме, в то время как у пациентов с острым посттравматическим остеомиелитом он существенно не изменялся. Концентрация IL-17 в динамике наблюдения у больных обеих групп существенно не изменялась, в то время как уровень IL-4 у больных с посттравматическим остеомиелитом на десятый день госпитализации существенно возрастал (табл. 1).

Смешанная слюна относится к биологической жидкости, состоящей из секрета слюнных желез и ряда компонентов неслюнного происхождения (жидкость зубодесневого желобка, бронхиального секрета, сывороточных компонентов и клеток крови, продуктов жизнедеятельности бактерий, вирусов и грибов, слущенного эпителия и других факторов) [1, 3, 9]. Ранее было показано, что динамика изменений микробиоценоза ротовой полости отражает состояние мукозального иммунитета [8, 9].

Было установлено, что максимальная концентрация TNF $\alpha$  в смешанной слюне имела место у больных с посттравматическим остеомиелитом в первые сутки заболевания и превышала в 2,5 раза его уровень у больных с неосложненными переломами нижней челюсти ( $p < 0,0001$ , табл. 2). На 10-е сутки ее уровень заметно снижался, но существенно превышал контрольные значения. Содержание IL-17 в первые сутки у больных обследованных групп различалось только с контрольными значениями ( $p < 0,0001$ ), а достоверных отличий между пациентами 2-х групп зарегистрировано не было ( $p = 0,49$ ). Однако на десятые сутки наблюдения у больных с посттравматическим остеомиелитом концентрация IL-17 более чем в 2 раза превышала уровень этого показателя у обследованных I группы ( $p < 0,01$ ). Это подтверждает известные данные о том, что IL-17 участвует в обеспечении противоинфекционной защиты слизистых оболочек, вызывая экспрессию генов, кодирующих синтез провоспалительных цитокинов, антимикробных

пептидов в эпителиальных клетках [7]. У больных с неосложненным переломом содержание IL-4 в слюне в первые сутки исследования было в 2,3 раза выше, чем у больных с посттравматическим остеомиелитом. На десятые сутки его концентрация снизилась в 3 раза у больных I группы и резко (в 5,4 раза) возросла во II (табл. 2).

Для более точной оценки диагностического значения показателей TNF $\alpha$ , IL-17 и IL-4 в качестве предикторов развития посттравматического остеомиелита с помощью однослойных нейронных сетей были построены прогностические модели, имитирующие бинарную логистическую регрессию. Построение моделей осуществлялось отдельно для иммунологических параметров, определенных в сыворотке крови и смешанной слюне. Вероятность осложненного перелома нижней челюсти описывается соотношением  $P = 1/(1+e^{-z})$ , где показатель  $z$  определяется через уровень TNF $\alpha$ , IL-17 и IL-4 в первый и десятый день наблюдения (табл. 3, 4). Моделирование подтвердило высокую прогностическую значимость TNF $\alpha$  и IL-17 в сыворотке крови для ранней верификации посттравматического остеомиелита, что подтверждалось показателями ОТК и ROC, которые в различных моделях варьировали от 87 до 100%. К наиболее точным следует отнести модели 4 и 5, где в качестве предикторов использовались TNF $\alpha$ , зафиксированный на десятый день исследования, и комбинация TNF $\alpha$  и IL-17, полученные в первый день госпитализации (табл. 3).

Моделирование по результатам исследования иммунологических индикаторов в смешанной слюне показало, что предиктивными свойствами обладают только IL-4 и IL-17, зарегистрированные на десятый день госпитализации, что отличало эти бинарные классификаторы от аналогичных, полученных по уровню концентрации цитокинов в сыворотке крови (табл. 4).

Результаты исследования доказывают важную роль цитокин-опосредованных механизмов в развитии острого посттравматического остеомиелита нижней челюсти. Применение методов машинного обучения в виде бинарных классификаторов на основе искусственных нейронных сетей позволяет использовать иммунологические показатели в качестве предикторов для раннего прогнозирования клинического течения переломов нижней челюсти.

## Список литературы / References

1. Кирпичников М.В., Подольский В.В. К вопросу об этиологических факторах травматического остеомиелита нижней челюсти // Актуальные вопросы стоматологии, 2017. С. 172-176. [Kirpichnikov M.V., Podolsky V.V. On the issue of etiological factors of traumatic osteomyelitis of the mandible. *Aktualnye voprosy stomatologii = Topical Issues of Dentistry*, 2017, pp. 172-176. (In Russ.)]
2. Кулигин Д.А. Этиологические факторы травматического остеомиелита // Бюллетень медицинских Интернет-конференций, 2017. Т. 7, № 10. С. 1536-1537. [Kuligin D.A. Etiological factors of traumatic

osteomyelitis. *Byulleten meditsinskikh Internet-konferentsiy = Bulletin of Medical Internet Conferences*, 2017, Vol. 7, no. 10, pp. 1536-1537. (In Russ.)]

3. Малютин А.В., Николаева Б.В., Пинелис И.С., Турчина Е.В. Причинно-следственные связи развития травматического остеомиелита челюстей // Медицина завтрашнего дня, 2017. С. 137-138. [Malyutina A.V., Nikolaeva B.V., Pinelis I.S., Turchina E.V. Cause-and-effect relations of development of traumatic osteomyelitis of jaws. *Meditsina zavtrashnego dnya = Medicine of Tomorrow*, 2017, pp. 137-138. (In Russ.)]

4. Матчин А.А., Абдуллаев М.Д., Ахмерова Р.И., Рахматуллин Т.Р. Клинический анализ иммунологических факторов риска развития воспалительно-деструктивного процесса в костях лицевого скелета // Современные медицинские исследования, 2018. С. 27-29. [Matchin A.A., Abdullayev M.D., Akhmerova R.I., Rakhmatullin T.R. Clinical analysis of immunological risk factors for the development of inflammatory-destructive process in the bones of the facial skeleton. *Sovremennye meditsinskie issledovaniya = Modern Medical Research*, 2018, pp. 27-29. (In Russ.)]

5. Сивухина О.В., Горайнова К.В. Оценка факторов риска в развитии травматического остеомиелита при лечении переломов нижней челюсти // Гигиена: здоровье и профилактика, 2018. С. 194-195. [Sivukhina O.V., Goryaynova K.V. Assessment of risk factors in the development of traumatic osteomyelitis in the treatment of mandible fractures. *Gigiena: zdorovye i profilaktika = Hygiene: Health and Prevention*, 2018, pp. 194-195. (In Russ.)]

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. Delsing C.E. Th17 cytokine deficiency in patients with Aspergillus skull base osteomyelitis. *BMC Infect. Dis.*, 2015, Vol. 15, p. 140.

8. Kim S.M., Eo M.Y., Cho Y.J. Immunoprecipitation high performance liquid chromatographic analysis of healing process in chronic suppurative osteomyelitis of the jaw. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, 2018, Vol. 46, no. 1, pp. 119-127.

9. Kharazmi M., Hallberg P. Mucosal trauma and osteonecrosis. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, 2018, Vol. 154, no. 2, p. 155.

10. Morita M. Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following antiresorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 46322. doi: 10.1038/srep46322.

#### Авторы:

**Паскова Е.В.** — аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Маркелова Е.В.** — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Шахгельдян К.И.** — д.т.н., доцент, директор института информационных технологий ФГБОУ ВО «Владивостокский государственный университет экономики и сервиса»; заведующая лабораторией анализа больших данных в здравоохранении и биомедицине, Школа биомедицины ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

**Гельцер Б.И.** — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор департамента клинической медицины, Школа биомедицины ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

**Кригер А.Б.** — к.ф.-м.н., доцент, Институт информационных технологий ФГБОУ ВО «Владивостокский государственный университет экономики и сервиса»; старший научный сотрудник лаборатории анализа больших данных в здравоохранении и биомедицине, Школа биомедицины ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

#### Authors:

**Paskova E.V.**, Postgraduate Student, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

**Markelova E.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

**Shakhgeldyan K.I.**, PhD, MD (Technology), Associate Professor, Director, Institute of Information Technologies, Vladivostok State University of Economics and Service; Head, Laboratory of Big Data Analysis in Healthcare and Biomedicine, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

**Geltser B.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Department of Clinical Medicine, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

**Kruger A.B.**, PhD (Physics/Mathematics), Associate Professor, Institute of Information Technology, Vladivostok State University of Economics and Service; Senior Research Associate, Laboratory of Big Data Analysis in Healthcare and Biomedicine, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 03.03.2019

Принята к печати 11.03.2019

Received 03.03.2019

Accepted 11.03.2019



## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ *MICA* В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Каневский Л.М.<sup>1</sup>, Гречихина М.В.<sup>1</sup>, Кузьмина Е.Г.<sup>2</sup>,  
Мушкарина Т.Ю.<sup>2</sup>, Спелков А.А.<sup>1</sup>, Стрельцова М.А.<sup>1</sup>,  
Коваленко Е.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»  
Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Научный медицинский  
исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

**Резюме.** Под влиянием стрессовых факторов, инфекций, опухолевой трансформации на поверхности клеток организма экспрессируется белок *MICA*, который является лигандом к рецептору NKG2D NK- и Т-клеток. Взаимодействие рецептора NKG2D на поверхности клеток иммунной системы с *MICA* приводит к активации лимфоцитов и уничтожению носителя лиганда. Ген *MICA* отличается высоким уровнем полиморфизма. К настоящему времени описано 87 аллелей, продукты которых различаются по способности активировать цитотоксические лимфоциты, что может оказывать влияние на протекание ряда заболеваний, таких как рак, вирусные инфекции, аутоиммунные заболевания. Распределения аллелей *MICA* в разных этносах существенно различаются. Анализ полиморфизма *MICA* в данном этносе необходим для выявления взаимосвязей между определенными аллелями *MICA* и теми или иными заболеваниями. Данная работа направлена на исследование распределения аллелей *MICA* среди населения России.

Типирование *MICA* проводили по методике, предложенной Yizhou Zoe и Peter Stastny. Методика включала в себя: 1) выделение геномной ДНК из цельной донорской крови; 2) ПЦР с целью амплификации фрагмента гена *MICA*; 3) секвенирование полученных ПЦР-фрагментов. Анализ результатов секвенирования проводили с использованием программ Vector NTI и Chromas Lite.

Был определен генотип аллелей *MICA* 119 доноров. Из 87 описанных в литературе аллелей *MICA* среди исследованных образцов обнаружено 15. Частоты встречаемости аллелей *MICA* оказались следующими: \*002 — 19,3%, \*004 — 6,7%, \*007 — 3,0%, \*008 — 35,7%, \*009 — 10,1%, \*010 — 5,0%, \*011 — 3,8%, \*012 — 2,1%, \*016 — 2,5%, \*017 — 3,4%, \*018 — 5,5%, \*019 — 0,4%, \*027 — 1,3%, \*053 — 0,8%, \*068 — 0,4%. Выяснилось, что распределение аллелей *MICA* в России сходно с таковыми для европейских стран. При сопоставлении литературных данных по разным странам мира выяснилось, что различия в распределении аллелей *MICA* выражены преимущественно между расами, а не нациями.

В данной работе проанализировано распределение аллелей *MICA* у россиян. Оно оказалось весьма сходным с таковыми у представителей других европейских стран и имеет ряд существенных отличий

### Адрес для переписки:

Каневский Леонид Михайлович  
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 (917) 552-27-22.  
Факс: 8 (495) 335-08-12.  
E-mail: leonid\_kanewski@mail.ru

### Address for correspondence:

Kanevskiy Leonid M.  
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences  
117997, Russian Federation, Moscow, GSP-7,  
Miklukho-Maklai str., 16/10.  
Phone: 7 (917) 552-27-22.  
Fax: 7 (495) 335-08-12.  
E-mail: leonid\_kanewski@mail.ru

### Образец цитирования:

Л.М. Каневский, М.В. Гречихина, Е.Г. Кузьмина,  
Т.Ю. Мушкарина, А.А. Спелков, М.А. Стрельцова,  
Е.И. Коваленко «Распределение аллелей *MICA*  
в российской популяции» // Медицинская иммунология,  
2019. Т. 21, № 5. С. 959-964.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-959-964  
© Каневский Л.М. и соавт., 2019

### For citation:

L.M. Kanevskiy, M.V. Grechikhina, E.G. Kuzmina,  
T.Yu. Mushkarina, A.A. Spelkov, M.A. Streltsova,  
E.I. Kovalenko "Distribution of *MICA* alleles in the Russian  
population", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 959-964.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-959-964  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-959-964

от этносов монголоидной расы (Япония, Китай, Корея). Анализ распределения аллелей *MICA* в российской популяции может оказаться полезен для выявления предрасположенности индивидов к тем или иным заболеваниям.

**Ключевые слова:** *MHC, MICA, NKG2D, генотипирование, секвенирование, популяционный анализ*

## DISTRIBUTION OF *MICA* ALLELES IN THE RUSSIAN POPULATION

Kanevskiy L.M.<sup>a</sup>, Grechikhina M.V.<sup>a</sup>, Kuzmina E.G.<sup>b</sup>,  
Mushkarina T.Yu.<sup>b</sup>, Spelkov A.A.<sup>a</sup>, Streltsova M.A.<sup>a</sup>, Kovalenko E.I.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> A. Tsyb Medical Radiological Research Center – Branch of National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russian Federation

**Abstract.** Stress factors, infections, tumor transformation of the cells of organism induce the expression of *MICA* protein, which is a ligand for the *NKG2D* receptor of NK and T cells. The interaction of the *NKG2D* receptor on the surface of the cells of the immune system with *MICA* results in activation of lymphocytes and elimination of the ligand carrier. The *MICA* gene has a high level of polymorphism. To date, 87 alleles have been described; their products differ in ability to activate cytotoxic lymphocytes, that can affect the progression of a number of diseases, such as cancer, viral infections, autoimmune diseases. The distribution of *MICA* alleles in different ethnic groups varies considerably. The analysis of *MICA* polymorphism in a current ethnos is necessary for revealing the relationships between certain *MICA* alleles and different diseases. Goal. This work is aimed at studying of the distribution of *MICA* alleles in Russian population. Materials and methods. Polymorphism of *MICA* was analyzed according to the procedure proposed by Yizhou Zoe and Peter Stastny. The procedure included: 1) isolation of genomic DNA from whole blood; 2) PCR for amplification of a fragment of the *MICA* gene; 3) sequencing of the resulting PCR fragments. Analysis of the results of sequencing was carried out using the programs Vector NTI and Chromas Lite. Results. The genotype of the *MICA* alleles of 119 donors has been determined. Of the 87 *MICA* alleles described in the literature, 15 were found among the samples studied. The frequencies of *MICA* alleles were the following: \*002 – 19.3%, \*004 – 6.7%, \*007 – 3.0%, \*008 – 35.7%, \*009 – 10.1%, \*010 – 5.0%, \*011 – 3.8%, \*012 – 2.1%, \*016 – 2.5%, \*017 – 3.4%, \*018 – 5.5%, \*019 – 0.4%, \*027 – 1.3%, \*053 – 0.8%, \*068 – 0.4%. The distribution of *MICA* alleles in Russia was found to be similar to that of European countries. When comparing literary data for different countries of the world, it was found that the differences in the distribution of *MICA* alleles are expressed mainly between races, and not nations. Conclusions. In this paper, the distribution of *MICA* alleles in Russian population has been analyzed. It turned out to be very similar to those of other European countries and has a number of significant differences from the ethnoses of the Mongoloid race (Japan, China, Korea). The analysis of the distribution of *MICA* alleles in the Russian population may be useful for identifying the predisposition of individuals to certain diseases.

**Keywords:** *MHC, MICA, NKG2D, genotyping, sequencing, population analysis*

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 16-04-01867.

### Введение

Ген *MICA* (Major Histocompatibility Complex class I chain-related gene A) расположен в локусе главного комплекса гистосовместимости в хромосоме 6. Этот ген кодирует трансмембранный белок *MICA*, который служит лигандом для рецептора *NKG2D*, представленного на по-

верхности лимфоцитов-киллеров (NK-клеток, CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов,  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов и CD8<sup>+</sup>NKT-клеток). В норме белок *MICA* отсутствует на поверхности клеток, однако под действием ряда факторов, таких как радиация, УФ-излучение, гипоксия, тепловой шок, вирусная инфекция, наблюдается индукция его поверхностной экспрессии [4]. То же происходит при опухолевой трансформации клетки [1]. Экспрессирующие *MICA* клетки могут быть распознаны цитотокси-

ческими лимфоцитами и элиминированы. Таким образом происходит уничтожение потенциально опасных для организма клеток, в частности опухолевых и инфицированных вирусами.

Белок *MICA* структурно схож с белками HLA класса I: он состоит из трех внеклеточных доменов ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ ), трансмембранного и цитозольного доменов. Однако, в отличие от последних, *MICA* не связывает  $\beta 2$ -микроглобулин, не способен презентировать антигенный пептид и в нем отсутствуют сайты связывания с CD8. Домены  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  формируют сайт связывания с рецептором NKG2D цитотоксических лимфоцитов. К посттрансляционным модификациям белка относятся N-гликозилирование внеклеточных доменов (описано 7 или 8 сайтов у разных аллелей) и S-ацилирование цитозольного фрагмента, что влияет на закрепление белка в определенных микродоменах мембраны клетки [4].

Ген *MICA* является высокополиморфным: на данный момент описано 87 аллелей. Свойства белковых продуктов различных аллелей существенно различаются, при этом оба имеющих в генотипе аллеля экспрессируются кодоминантно [7]. Основными параметрами, по которым наблюдаются различия между аллельными вариантами белка *MICA*, являются: аффинность к NKG2D, третичная структура внеклеточной части *MICA*, количество сайтов N-гликозилирования, уровень поверхностной экспрессии, способ закрепления в мембране и форма, в которой происходит высвобождение растворимых форм этих белков во внеклеточное пространство. Каждый из этих параметров оказывает существенное влияние на способность лимфоцитов-киллеров лизировать экспрессирующие *MICA* клетки [1, 4].

К настоящему времени в большинстве развитых стран проведены исследования распределения аллелей *MICA* в различных этносах. Эти работы позволили выявить взаимосвязи между строением аллельных продуктов гена *MICA* и некоторыми заболеваниями. В настоящем исследовании впервые изучено распределение аллелей *MICA* в российской популяции и проведено сравнение с имеющимися данными по другим странам.

## Материалы и методы

Исследование проводили на образцах крови здоровых доноров, давших информированное согласие на использование их крови в научных исследованиях. Генотипирование проводили путем секвенирования фрагмента гена *MICA*, содержа-

щего экзоны 2–5, по методу, предложенному Zou и Stastny [11] с некоторыми модификациями. Вкратце. 1. Геномную ДНК выделяли из образцов крови с помощью набора GeneJet Genomic DNA Purification kit (кат.# K0722, Thermo Scientific, США) согласно инструкциям производителя. 2. Проводили ПЦР с помощью описанных в статье праймеров *MICA*6823-F и *MICA*9023-R с целью амплифицировать фрагмент, содержащий экзоны 2–5 гена *MICA*. Для амплификации использовали высокоточные полимеразы Phusion Flash и Phusion Hot Start II (кат.# F548 и #F549 соответственно; ThermoFisher Scientific, США). Вторую из них использовали для дополнительной проверки гомозиготных образцов. 3. Результаты ПЦР и количество полученного ПЦР-продукта оценивали методом электрофореза в 1% агарозном геле путем сравнения с маркером, содержащим известное количество ДНК определенного размера. Количественное сравнение проводили с помощью программы ImageLab, Bio-Rad, США. 4. Очистку и секвенирование ПЦР-фрагментов осуществляли в компании Евроген (Москва). Для секвенирования использовали набор праймеров, предложенный в статье Zou и Stastny [11]. 5. Анализ сиквенсов проводили с помощью программ VectorNTI (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, США) и ChromasLite (Technelysium Pty Ltd, Австралия); анализировали отличия полученных сиквенсов от консенсусной последовательности аллеля *MICA*\*001. Для типирования использовали данные о последовательностях кДНК аллелей *MICA*, взятые со следующего сайта: [https://raw.githubusercontent.com/ANHIG/IMGTHLA/Latest/alignments/MICA\\_nuc.txt](https://raw.githubusercontent.com/ANHIG/IMGTHLA/Latest/alignments/MICA_nuc.txt).

## Результаты и обсуждение

Всего было проанализировано 119 индивидов (53 женщины и 66 мужчин). Частоты аллелей были рассчитаны по формуле: количество обнаруженных аллелей/2n, где n — число образцов (119). Распределение частот аллелей *MICA* не противоречило закону Харди–Вайнберга ( $p = 0,18$ ); анализ был проведен согласно методу, предложенному Guo и Thompson [5]. Полученные результаты приведены в таблице 1.

В российской популяции выявлено 15 аллелей *MICA* из описанных 87. В других работах количество обнаруженных аллелей также значительно ниже общего числа известных аллелей *MICA*. Этот результат можно объяснить следующими причинами. 1. Некоторые аллели, первоначально включенные в базу данных, не были подтверждены дальнейшими исследованиями (например,

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ MICA В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ И НЕКОТОРЫХ ЗАРУБЕЖНЫХ СТРАНАХ

TABLE 1. DISTRIBUTION OF MICA ALLELES IN RUSSIAN POPULATION AND CERTAIN FOREIGN COUNTRIES

| Аллель<br>Allele | Россия<br>Russia<br>(n = 119) | Германия<br>Germany<br>(n = 110) | Австрия<br>Austria<br>(n = 320) | Словакия<br>Slovakia<br>(n = 124) | Япония<br>Japan<br>(n = 114)* | Корея<br>Korea<br>(n = 199)** | Северный<br>Китай<br>North China<br>(n = 104)*** |
|------------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------|
| *001             | –                             | 0,5                              | 0,9                             | –                                 | –                             | –                             | –                                                |
| *002             | 19,3                          | 13,2                             | 10,9                            | 16,5                              | 12,5                          | 17,8                          | 12,0                                             |
| *004             | 6,7                           | 5,5                              | 6,4                             | 7,3                               | 11,1                          | 12,3                          | 4,8                                              |
| *006             | –                             | 0,5                              | 0,3                             | 0,8                               | –                             | –                             | –                                                |
| *007             | 3,0                           | 3,2                              | 4,5                             | 6,9                               | 0,9                           | 3,3                           | 1,5                                              |
| *008             | 35,7                          | 40,5                             | 43,1                            | 37,1                              | 25,2                          | 10,8                          | 23,6                                             |
| *009             | 10,1                          | 10,9                             | 10,9                            | 11,3                              | 18,4                          | 10,6                          | 12,5                                             |
| *010             | 5,0                           | 5,5                              | 5,9                             | 2,8                               | 12,5                          | 18,3                          | 18,8                                             |
| *011             | 3,8                           | 3,2                              | 2,1                             | 2,0                               | –                             | –                             | 0,5                                              |
| *012             | 2,1                           | 4,5                              | 1,6                             | 1,2                               | 10,9                          | 11,1                          | 1,0                                              |
| *016             | 2,5                           | 1,4                              | 3,1                             | 2,0                               | –                             | –                             | 1,0                                              |
| *017             | 3,4                           | 2,7                              | 3,3                             | 2,0                               | н/о<br>n/d                    | –                             | 1,9                                              |
| *018             | 5,5                           | 2,7                              | 4,6                             | 6,9                               | н/о<br>n/d                    | –                             | 0,5                                              |
| *019             | 0,4                           | 1,8                              | 0,3                             | 2,0                               | н/о<br>n/d                    | –                             | 3,9                                              |
| *027             | 1,3                           | 1,8                              | 1,5                             | 0,8                               | н/о<br>n/d                    | 13,6                          | 5,3                                              |
| *029             | –                             | –                                | 0,2                             | –                                 | н/о<br>n/d                    | –                             | –                                                |
| *033             | –                             | –                                | –                               | –                                 | н/о<br>n/d                    | –                             | 0,5                                              |
| *045             | –                             | –                                | –                               | –                                 | н/о<br>n/d                    | –                             | 8,2                                              |
| *051             | –                             | 2,3                              | –                               | –                                 | н/о<br>n/d                    | –                             | –                                                |
| *053             | 0,8                           | –                                | –                               | –                                 | н/о<br>n/d                    | –                             | –                                                |
| *057             | –                             | –                                | –                               | 0,4                               | н/о<br>n/d                    | н/о<br>n/d                    | –                                                |
| *067             | –                             | –                                | 0,2                             | –                                 | н/о<br>n/d                    | н/о<br>n/d                    | –                                                |
| *068             | 0,4                           | –                                | 0,2                             | –                                 | н/о<br>n/d                    | н/о<br>n/d                    | –                                                |
| Ref.             |                               | [3]                              | [10]                            | [2]                               | [6]                           | [8]                           | [9]                                              |

Примечание. Частоты аллелей указаны в процентах. Во втором столбце представлены данные, полученные в рамках данной работы. «н/о» – аллель не был описан на момент исследования; \* – в Японии часть аллелей (8,5%) не удалось определить; \*\* и \*\*\* – у некоторых доноров была обнаружена делеция гена MICA, соответственно, 2,3% в Корее и 3,9% в Северном Китае.

Note. Alleles frequencies are presented in percents. The results of the current work are presented in the second column. “n/d”, this allele had not been described at the moment of work publication; \*, in Japan a part of alleles (8.5%) had not been discriminated; \*\* and \*\*\*, in some donors a deletion of MICA gene has been detected: 2.3% in Korea and 3.9% in North China, respectively.

аллели 005, 013, 014). 2. Большинство методов генотипирования *MICA* имеют ограничения, не позволяющие различать определенные аллели. Так, используемый нами метод [11] не позволяет различать пары аллелей \*009 и \*049, \*010 и \*069. 3. Многие аллели встречаются крайне редко, что можно оценить, сравнивая полученные результаты с данными по другим популяциям (табл. 1).

Наиболее часто встречающимися аллелями явились \*008 (35,7%), \*002 (19,3%) и \*009 (10,1%), что характерно для европейских стран и заметно отличается от восточных стран (Китай, Корея, Япония). По всей видимости, основные различия в распределениях частот аллелей *MICA* выявляют-

ся, скорее, на уровне рас, чем наций. По африканскому континенту на данный момент информации мало; полноценных исследований распределения аллелей *MICA* там пока не проведено.

Таким образом, нами впервые было выявлено распределение аллелей *MICA* в российской популяции. Обнаружено высокое сходство в распределении аллелей среди европейских стран, в то время как народы монголоидной расы демонстрируют ряд существенных отличий. Полученные данные позволят проводить исследования роли тех или иных аллелей *MICA* в опухолевых заболеваниях и патологиях, вызванных вирусными инфекциями.

## Список литературы / References

1. Chen D., Gyllenstein U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer. *Carcinogenesis*, 2014, Vol. 35, no. 12, pp. 2633-2642.
2. Ďurmanová V., Tirpakova J., Stuchlikova M., Shawkatova I., Kuba D., Sapak M., Buc M. Characterization of MICA gene polymorphism of HLA complex in the Slovak population. *Ann. Hum. Biol.*, 2011, Vol. 38, no. 5, pp. 570-576.
3. Fürst D., Solgi G., Recker K., Mytilineos D., Schrezenmeier H., Mytilineos J. Sequence-based typing of major histocompatibility complex class I chain-related gene A alleles by use of exons 2-5 information. *Tissue Antigens*, 2011, Vol. 77, no. 3, pp. 201-205.
4. González S., Groh V., Spies T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2006, Vol. 298, pp. 121-138.
5. Guo S.W., Thompson E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 1992, Vol. 48, no. 2, pp. 361-372.
6. Komatsu-Wakui M., Tokunaga K., Ishikawa Y., Kashiwase K., Moriyama S., Tsuchiya N., Ando H., Shiina T., Geraghty D.E., Inoko H., Juji T. MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype. *Immunogenetics*, 1999, Vol. 49, no. 7-8, pp. 620-628.
7. Molinero L.L., Marcos C.Y., Mirbaha F., Fainboim L., Stastny P., Zwirner N.W. Codominant expression of the polymorphic MICA alloantigens encoded by genes in the HLA region. *Eur. J. Immunogenet. Off. J. Br. Soc. Histocompat. Immunogenet.*, 2002, Vol. 29, no. 4, pp. 315-319.
8. Pyo C.W., Hur S.S., Kim Y.K., Choi H.B., Kim T.Y., Kim T.G. Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA in the Korean population. *Hum. Immunol.*, 2003, Vol. 64, no. 3, pp. 378-384.
9. Tian W., Cai J.H., Wang F., Li L.X. MICA polymorphism in a northern Chinese Han population: the identification of a new MICA allele, MICA\*059. *Hum. Immunol.*, 2010, Vol. 71, no. 4, pp. 423-427.
10. Wenda S., Faé I., Sanchez-Mazas A., Nunes J.M., Mayr W.R., Fischer G.F. The distribution of MICA alleles in an Austrian population: Evidence for increasing polymorphism. *Hum. Immunol.*, 2013, Vol. 74, no. 10, pp. 1295-1299.
11. Zou Y., Stastny P. High resolution MICA genotyping by sequence-based typing (SBT). *Methods Mol. Biol.*, 2012, Vol. 882, pp. 183-195.

### Авторы:

**Каневский Л.М.** — к.б.н., научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Гречихина М.В.** — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

### Authors:

**Kanevskiy L.M.**, PhD (Biology), Research Associate, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Grechikhina M.V.**, Junior Research Associate, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Кузьмина Е.Г.** — к.б.н., доцент, заведующая лабораторией клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

**Мушкарина Т.Ю.** — научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

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

**Стрельцова М.А.** — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Коваленко Е.И.** — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Kuzmina E.G.**, PhD (Biology), Associate Professor, Head, Clinical Immunology Laboratory, A. Tsyb Medical Radiological Research Center — Branch of National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russian Federation

**Mushkarina T.Yu.**, Research Associate, Clinical Immunology Laboratory, A. Tsyb Medical Radiological Research Center — Branch of National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russian Federation

**Spelkov A.A.**, Student, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Streltsova M.A.**, Junior Research Associate, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Kovalenko E.I.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 26.09.2018

Отправлена на доработку 17.10.2018

Принята к печати 29.10.2018

Received 26.09.2018

Revision received 17.10.2018

Accepted 29.10.2018

## ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТЕЙ HLA У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Рамильева И.Р.<sup>1</sup>, Буркитбаев Ж.К.<sup>2</sup>, Абдрахманова С.А.<sup>1</sup>,  
Турганбекова А.А.<sup>1</sup>, Баймукашева Д.К.<sup>1</sup>, Жибурт Е.Б.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения  
Республики Казахстан, г. Нур-Султан, Республика Казахстан

<sup>2</sup> ТОО «Национальный научный онкологический центр», г. Нур-Султан, Республика Казахстан

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

**Резюме.** В статье показаны исследования по изучению распределения генетического полиморфизма антигенов гистосовместимости у пациентов с диагнозом «острый миелоидный лейкоз» (ОМЛ) и доноров (здоровых лиц) в Республике Казахстан, также особенности распределения HLA-A\*, \*B, Cw\*, DRB1\*, DQB1\* антигенов у больных с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). HLA-типирование и обработка данных выполнены в РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии», г. Нур-Султан. Всего обследовано 3808 человек, из них: 3621 здоровых доноров крови и 187 пациентов с диагнозом ОМЛ. Все пациенты находились на лечении в клинике АО «Национальный научный центр онкологии и трансплантологии», г. Нур-Султан, и диагноз был определен на основании протокола AML-2013KZ. Геномную ДНК для проведения типирования HLA-антигенов выделяли из лейкоцитов периферической крови протеиназным методом с использованием колонок с силикагелевой мембраной и с помощью набора реагентов PROTRANS DNA BOX (Protrans, Германия). Типирование (HLA-A, B, C, DRB1, DQB1) пациентов и доноров крови выполнены методом полимеразной цепной реакции, применялись коммерческие наборы реагентов фирмы Protrans — PROTRANS HLA-A\*/B\*/DRB1\* Cycloplate System, PROTRANS HLA-C\* Cycloplate System, PROTRANS HLA-DQB1\* Cycloplate System.

HLA-A\*31 (OR = 1,8; CI 1,16-2,79; p < 0,01) чаще встречается в группе пациентов в сравнении с контрольной группой, что позволяет предположить наличие связи ОМЛ с данным антигеном. В контрольной группе было отмечено увеличение частоты встречаемости антигена HLA-A\*02 (OR = 0,55; CI 0,41-0,75; p < 0,01). Указанный антиген можно рассматривать как имеющий протективный эффект в развитии ОМЛ.

Изучение большого комплекса гистосовместимости, в состав которого входят лейкоцитарные антигены человека, существенно расширило представления об HLA-антигенах, о том, что они могут иметь сильные ассоциативные связи с одним заболеванием и умеренно или слабо выраженные — с другим. Анализ литературных данных показал, что для миелоидного лейкоза характерно снижение частоты встречаемости антигенов HLA-B13, B14, B40, чаще всего определяются антигены B16, Bw 22, B27. В данном исследовании с ОМЛ ассоциированы HLA-A\*31, B\*37. Фенотипы с антигенами

### Адрес для переписки:

Рамильева Индира Рамильевна  
РГП на ПХВ «Научно-производственный центр  
трансфузиологии» Министерства здравоохранения  
Республики Казахстан  
010000, Республика Казахстан, Нур-Султан, ул. Керей,  
Жанибек хандар, 10.  
Тел: 8 (7172) 54-33-00, (701) 622-53-74.  
E-mail: omninpct16@mail.ru; Ramilyeva\_84@mail.ru

### Address for correspondence:

Ramilyeva Indira R.  
Scientific and Production Center of Transfusiology  
010000, Republic of Kazakhstan, Nur-Sultan, Kerey,  
Zhanibek Khandar str., 10.  
Phone: +7 (7172) 54-33-00, (701) 622-53-74.  
E-mail: omninpct16@mail.ru; Ramilyeva\_84@mail.ru

### Образец цитирования:

И.Р. Рамильева, Ж.К. Буркитбаев, С.А. Абдрахманова,  
А.А. Турганбекова, Д.К. Баймукашева, Е.Б. Жибурт  
«Характер распределения специфичностей HLA  
у пациентов с острым миелоидным лейкозом»  
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5.  
С. 965-972. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-965-972  
© Рамильева И.Р. и соавт., 2019

### For citation:

I.R. Ramilyeva, Zh.K. Burkitbaev, S.A. Abdrakhmanova,  
A.A. Turganbekova, D.K. Baimukasheva, E.B. Zhiburt  
“Distribution pattern for HLA specificities in the patients with  
acute myeloid leukemia”, Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5,  
pp. 965-972. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-965-972  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-965-972

HLA-A\*02, B\*27, C\*02, DRB1\*01, \*04, DQB1\*06 обладают протективным эффектом в отношении развития данной патологии.

Проведенное исследование характеризует особенности распределения генов гистосовместимости у пациентов с ОМЛ, обнаружение HLA-маркеров, определяющие риск или устойчивость к возникновению данного заболевания. Установлены характерные специфические маркеры системы HLA у пациентов с ОМЛ населения республики, которые обуславливают максимальный риск развития заболевания.

*Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, антигены, HLA-система, молекулярно-генетический метод*

## DISTRIBUTION PATTERN FOR HLA SPECIFICITIES IN THE PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Ramilyeva I.R.<sup>a</sup>, Burkitbaev Zh.K.<sup>b</sup>, Abdrakhmanova S.A.<sup>a</sup>,  
Turganbekova A.A.<sup>a</sup>, Baimukasheva D.K.<sup>a</sup>, Zhiburt E.B.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Scientific and Production Center of Transfusiology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

<sup>b</sup> National Scientific Cancer Center, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

<sup>c</sup> N. Pirogov National Medical and Surgical Center, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The article presents a study on the distribution of gene polymorphisms in the histocompatibility antigens among the patients diagnosed with AML, and healthy donors in the Republic of Kazakhstan, as well as features of the HLA-A\*, \*B, Cw\*, DRB1\*, DQB1\* distribution among the patients with acute myeloid leukemia (AML). HLA typing and data processing were performed at the Research and Production Center of Transfusiology, Nur-Sultan. A total of 3808 people were examined, including 3621 healthy blood donors and 187 patients diagnosed with AML. Genomic DNA for HLA typing was isolated from peripheral blood leukocytes by proteinase method using columns with silica membrane and using a set of reagents PROTRANS DNA BOX (Protrans, Germany). Typing of HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 in the patients and blood donors was performed by polymerase chain reaction using commercial reagent kits from Protrans (PROTRANS HLA-A\*/B\*/DRB1\* Cycloplate System, PROTRANS HLA-C\* Cycloplate System, PROTRANS HLA-DQB1\* Cycloplate System).

HLA-A\*31 (OR = 1.8; CI 1.16-2.79;  $p < 0.01$ ) proved to be more common in the group of patients compared to the control group, which suggesting an association between AML and presence of this antigen. The control group showed an increased frequency of HLA-A\*02 antigen (OR = 0.55; CI 0.41-0.75;  $p < 0.01$ ). This antigen may be, therefore, exert a protective effect in AML development.

The studies of major histocompatibility complex which include HLA genes, did significantly expanded the understanding of HLA antigens which may have strong associative links with distinct diseases, and moderately or poorly expressed links in other disorders. Analysis of the literature data showed that myeloid leukemia is characterized by decreased frequency of HLA-B13, B14, B40 antigens, most often determined by antigens B16, Bw 22, B27. In this study, HLA-A\*31, B\*37 were associated with AML. Phenotypes with antigens HLA-A\*02, B\*27, C\*02, DRB1\*01, \*04, DQB1\*06 have a probable protective effect on the development of this pathology.

The study has determined some features of histocompatibility gene distribution in AML patients, detection of HLA-markers that determine the risk or resistance to the occurrence of this disease. We have established characteristic specific markers of HLA system among AML patients in Kazakhstan, which may be associated with higher risk of the disease.

*Keywords: acute myeloblastic leukemia, antigens, HLA-system, molecular genetic method*

## Введение

Достижения в области изучения большого комплекса гистосовместимости, в состав которого входят лейкоцитарные антигены человека, существенно расширили представления о строении системы HLA. В настоящее время большой

фактический материал свидетельствует о том, что HLA-антиген может иметь сильные ассоциативные связи с одним заболеванием и умеренно или слабо выраженные — с другим [2, 3, 10, 13].

По литературным данным, для миелоидного лейкоза характерно снижение частоты встречае-



мости антигенов HLA-B13, B14, B40, чаще всего определялись антигены B16, Bw 22, B27. Однако статистически достоверны были различия для антигена B40. Исследователями также было установлено, что у больных с диагнозом «острый миелоидный лейкоз» в возрасте от 1 до 6 лет по сравнению с другими группами значительно увеличена частота встречаемости антигенов A2, A9, B5, B15, B40. Анализ частоты встречаемости этих антигенов в зависимости от продолжительности заболевания показал, что такие антигены, как A2 и B15, чаще встречаются у больных с более доброкачественным течением заболевания, а антигены A3, A10 встречаются реже у той же группы больных [4].

Острый миелоидный лейкоз (далее — ОМЛ) — это злокачественная опухоль миелоидного роста крови, которая характеризуется поражением костного мозга морфологически незрелыми кроветворными (бластными) клетками с вытеснением ими нормальных элементов и инфильтрацией различных тканей и органов [1].

Среди гемобластозов острые лейкозы занимают одно из первых мест по частоте встречаемости. Заболеваемость острыми лейкозами составляет в среднем 5 случаев на 100 000 населения в год. При этом ОМЛ составляет 75% из всех острых лейкозов. [9].

Целью исследования является изучение распределения генетического полиморфизма антигенов гистосовместимости у пациентов с диагнозом «ОМЛ» и доноров (здоровых лиц) в Республике Казахстан.

## Материалы и методы

Была изучена частота встречаемости HLA-антигенов I класса (HLA-A, B) и II-класса (HLA-DRB1, DQB1) у больных с ОМЛ и у доноров, проживающих в Казахстане. HLA-типирование и обработка данных выполнены в РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии», г. Нур-Султан.

Всего обследовано 3808 человек, из них: 3621 здоровых доноров крови и 187 пациентов с диагнозом «ОМЛ».

Исходя из данных исследования, средний возраст доноров (контрольная группа) составил 41 год (диапазон от 18 до 64 лет), а пациентов (опытная группа) — 25 лет (диапазон от 2 до 65 лет). Также пациенты были распределены по половому признаку, из них: 91 мужчин (48,6%), 96 женщин (51,3%), среди доноров преобладали лица мужского пола — 2136 (59%) и 1485 (41%) соответственно.

Геномную ДНК для проведения типирования HLA-антигенов выделяли из лейкоцитов периферической крови протеиназным методом с ис-

пользованием колонок с силикагелевой мембраной и с помощью набора реагентов PROTRANS DNA BOX (Protrans, Германия). Типирование (HLA-A, B, C, DRB1, DQB1) пациентов и доноров крови выполнено методом полимеразной цепной реакции, применялись коммерческие наборы реагентов фирмы Protrans — PROTRANS HLA-A\*/B\*/DRB1\* Cycloplate System, PROTRANS HLA-C\* Cycloplate System, PROTRANS HLA-DQB1\* Cycloplate System.

Все пациенты находились на лечении в клинике АО «Национальный научный центр онкологии и трансплантологии», г. Нур-Султан, и диагноз был определен на основании протокола AML-2013KZ.

Результаты оценены с использованием дескриптивных статистик, непараметрического  $\chi^2$ -критерия, отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (95% ДИ).

## Результаты

Результаты исследования представлены в таблицах 1-5.

HLA-A\*31 (OR = 1,8; CI 1,16-2,79;  $p < 0,01$ ) чаще встречается в группе пациентов в сравнении с контрольной группой, что позволяет предположить наличие связи ОМЛ с данным антигеном.

В контрольной группе было отмечено увеличение частоты встречаемости антигена HLA-A\*02 (OR = 0,55; CI 0,41-0,75;  $p < 0,01$ ). Указанный антиген можно рассматривать как имеющий протективный эффект в развитии ОМЛ.

В ходе нашего исследования антиген данного локуса A\*36 не был обнаружен.

Увеличение частоты встречаемости антигена HLA-B\*37 (OR = 2,12; CI 1,17-3,82;  $p < 0,05$ ) позволяет констатировать ассоциацию ОМЛ с данным антигеном системы HLA.

В контрольной группе было отмечено увеличение частоты встречаемости антигенов HLA-B\*27 (OR = 0,42; CI 0,2-0,9;  $p < 0,05$ ), что позволяет предположить их протективный эффект в отношении развития данной патологии. Следует отметить, что при нашем исследовании не были обнаружены антигены данного локуса B\*42, \*59, \*78, \*81, \*82, \*83.

Присутствие антигена HLA-C\*02 (OR = 0,37; CI 0,2-0,69;  $p < 0,01$ ) чаще установлено в контрольной группе, что позволяет предположить его протективный эффект в отношении развития ОМЛ.

Присутствие антигенов HLA-DRB1\*01 (OR = 0,55; CI 0,33-0,91;  $p < 0,05$ ), \*04 (OR = 0,7; CI 0,49-1,01;  $p < 0,05$ ), \*16 (OR = 0,27; CI 0,07-1,09;  $p < 0,05$ ) чаще установлено в контрольной группе, следовательно, можно предположить их про-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ HLA-АНТИГЕНОВ ЛОКУСА А У ПАЦИЕНТОВ С ОМЛ И ДОНОРОВ

TABLE 1. DISTRIBUTION OF HLA ANTIGENS OF LOCUS A IN PATIENTS WITH AML AND DONORS

| Антигены HLA<br>HLA antigens | Пациенты<br>Patients |      | Доноры<br>Donors |      | $\chi^2$   | p        | ОШ (ДИ 95%)<br>Odds ratio<br>(confidence interval 95%) |
|------------------------------|----------------------|------|------------------|------|------------|----------|--------------------------------------------------------|
|                              | n                    | %    | n                | %    |            |          |                                                        |
| A*01                         | 28                   | 15,0 | 706              | 19,5 | 2,34       | p > 0,05 | 0,73 (0,48-1,10)                                       |
| A*02                         | 66                   | 35,3 | 1802             | 49,8 | 14,90      | p < 0,01 | 0,55 (0,41-0,75)                                       |
| A*03                         | 26                   | 13,9 | 703              | 19,4 | 3,49       | p > 0,05 | 0,67 (0,44-1,02)                                       |
| A*11                         | 23                   | 12,3 | 522              | 14,4 | 0,65       | p > 0,05 | 0,83 (0,53-1,30)                                       |
| A*23                         | 8                    | 4,3  | 148              | 4,1  | 0,05       | p > 0,05 | 1,05 (0,51-2,17)                                       |
| A*24                         | 52                   | 27,8 | 1036             | 28,6 | 0,06       | p > 0,05 | 0,96 (0,69-1,33)                                       |
| A*25                         | 9                    | 4,8  | 158              | 4,4  | 0,07       | p > 0,05 | 1,11 (0,56-2,21)                                       |
| A*26                         | 13                   | 7,0  | 325              | 9    | 0,90       | p > 0,05 | 0,76 (0,43-1,35)                                       |
| A*29                         | 4                    | 2,1  | 77               | 2,1  | 0          | p > 0,05 | 1,01 (0,36-2,78)                                       |
| A*30                         | 10                   | 5,3  | 219              | 6    | 0,15       | p > 0,05 | 0,88 (0,46-1,68)                                       |
| A*31                         | 25                   | 13,4 | 286              | 7,9  | 7,1        | p < 0,01 | 1,8 (1,16-2,79)                                        |
| A*32                         | 14                   | 7,5  | 168              | 4,6  | 3,17       | p > 0,05 | 1,66 (0,94-2,93)                                       |
| A*33                         | 12                   | 6,4  | 317              | 8,8  | 1,23       | p > 0,05 | 0,71 (0,39-1,30)                                       |
| A*34                         | 0                    | 0    | 6                | 0,2  | 0,31       | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| A*36                         | 0                    | 0    | 0                | 0    | нз*<br>ns* | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| A*43                         | 0                    | 0    | 1                | 0    | 0,05       | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| A*66                         | 0                    | 0    | 26               | 0,7  | 1,35       | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| A*68                         | 11                   | 5,9  | 234              | 6,5  | 0,1        | p > 0,05 | 0,9 (0,49-1,69)                                        |
| A*69                         | 0                    | 0    | 6                | 0,2  | 0,31       | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| A*74                         | 0                    | 0    | 4                | 0,1  | 0,20       | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| A*80                         | 0                    | 0    | 1                | 0    | 0,05       | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |

Примечание. нз\* – не значимо.

Note. ns\*, not significant.

тективный эффект в отношении развития данной патологии.

В данном локусе среди пациентов не выявлено часто встречающихся антигенов, тогда как у здоровых лиц преобладал HLA-DQB1\*06 (OR = 0,69; CI 0,51-0,94; p < 0,05), что позволяет предположить наличие его протективного эффекта в отношении развития ОМЛ.

## Обсуждение

Исследуя HLA-A локус, было выявлено, что HLA-A\*31 (OR = 1,8, CI 1,16-2,79, p < 0,01) чаще присутствует в группе пациентов, нежели в контрольной группе. Эти результаты дают повод предположить наличие связи ОМЛ с данным антигеном.

А в контрольной группе нами было замечено увеличение частоты встречаемости антигена HLA-A\*02 (OR = 0,55, CI 0,41-0,75, p < 0,01). Указанный антиген можно рассматривать как имею-

щий протективный эффект в развитии ОМЛ. Авторами аналогичных зарубежных публикаций была описана протективная роль гена HLA-A\*11 (исследование Ozdilli K. и соавт. в турецкой популяции) [11].

Данные об увеличении частоты встречаемости антигена HLA-B\*37 (OR = 2,12, CI 1,17-3,82, p < 0,05) позволяют констатировать ассоциацию ОМЛ с данным антигеном системы HLA, в то время как в зарубежной литературе гены HLA-B\*07, \*49 оценивают как гены, имеющие предрасполагающий эффект к развитию ОМЛ [5, 11].

В контрольной группе наблюдалось увеличение частоты встречаемости антигенов HLA-B\*27 (OR = 0,42, CI 0,2-0,9, p < 0,05), что позволяет предположить их протективный эффект в отношении развития данной патологии. По результатам многофакторного исследования Fernandes T. и соавт. демонстрируют HLA-B\*38, \*40 как гены, обладающие протективным эффектом к разви-

**ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ HLA-АНТИГЕНОВ ЛОКУСА В У ПАЦИЕНТОВ С ОМЛ И ДОНОРОВ**

**TABLE 2. DISTRIBUTION OF HLA ANTIGENS OF LOCUS B IN PATIENTS WITH AML AND DONORS**

| Антигены HLA<br>HLA antigens | Пациенты<br>Patients |      | Доноры<br>Donors |      | $\chi^2$ | p        | ОШ (ДИ 95%)<br>Odds ratio<br>(confidence interval 95%) |
|------------------------------|----------------------|------|------------------|------|----------|----------|--------------------------------------------------------|
|                              | n                    | %    | n                | %    |          |          |                                                        |
| B*07                         | 26                   | 13,9 | 519              | 14,4 | 0,03     | p > 0,05 | 0,96 (0,63-1,47)                                       |
| B*08                         | 13                   | 7    | 310              | 8,6  | 0,62     | p > 0,05 | 0,79 (0,45-1,41)                                       |
| B*13                         | 27                   | 14,4 | 505              | 14   | 0,02     | p > 0,05 | 1,04 (0,68-1,58)                                       |
| B*14                         | 7                    | 3,7  | 131              | 3,6  | 0,006    | p > 0,05 | 1,03 (0,48-2,24)                                       |
| B*15                         | 25                   | 13,4 | 475              | 13,2 | 0,006    | p > 0,05 | 1,02 (0,66-1,57)                                       |
| B*18                         | 16                   | 8,6  | 202              | 5,6  | 2,87     | p > 0,05 | 1,58 (0,93-2,68)                                       |
| B*27                         | 7                    | 3,7  | 306              | 8,5  | 5,28     | p < 0,05 | 0,42 (0,2-0,9)                                         |
| B*35                         | 29                   | 15,5 | 721              | 20   | 2,25     | p > 0,05 | 0,73 (0,49-1,10)                                       |
| B*37                         | 13                   | 7    | 123              | 3,4  | 6,45     | p < 0,05 | 2,12 (1,17-3,82)                                       |
| B*38                         | 11                   | 5,9  | 191              | 5,3  | 0,12     | p > 0,05 | 1,12 (0,60-2,09)                                       |
| B*39                         | 5                    | 2,7  | 115              | 3,2  | 0,15     | p > 0,05 | 0,83 (0,34-2,07)                                       |
| B*40                         | 37                   | 19,8 | 571              | 15,8 | 2,07     | p > 0,05 | 1,31 (0,91-1,90)                                       |
| B*41                         | 4                    | 2,1  | 78               | 2,2  | H3*      | p > 0,05 | 0,99 (0,36-2,73)                                       |
| B*42                         | 0                    | 0    | 0                | 0    | H3*      | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| B*44                         | 21                   | 11,2 | 510              | 14,1 | 1,25     | p > 0,05 | 0,77 (0,48-1,22)                                       |
| B*45                         | 0                    | 0,0  | 11               | 0,3  | 0,57     | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| B*46                         | 9                    | 4,8  | 133              | 3,7  | 0,63     | p > 0,05 | 1,32 (0,66-2,64)                                       |
| B*47                         | 0                    | 0    | 9                | 0,2  | 0,46     | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| B*48                         | 9                    | 4,8  | 178              | 4,9  | 0,006    | p > 0,05 | 0,97 (0,49-1,93)                                       |
| B*49                         | 7                    | 3,7  | 128              | 3,5  | 0,02     | p > 0,05 | 1,06 (0,49-2,30)                                       |
| B*50                         | 13                   | 7,   | 193              | 5,4  | 0,89     | p > 0,05 | 1,32 (0,74-2,36)                                       |
| B*51                         | 25                   | 13,4 | 507              | 14,1 | 0,07     | p > 0,05 | 0,94 (0,61-1,45)                                       |
| B*52                         | 11                   | 5,9  | 204              | 5,7  | 0,02     | p > 0,05 | 1,04 (0,56-1,95)                                       |
| B*53                         | 1                    | 0,5  | 18               | 0,5  | 0,005    | p > 0,05 | 1,07 (0,14-8,07)                                       |
| B*54                         | 3                    | 1,6  | 87               | 2,4  | 0,50     | p > 0,05 | 0,66 (0,21-2,11)                                       |
| B*55                         | 3                    | 1,6  | 118              | 3,3  | 1,60     | p > 0,05 | 0,48 (0,15-1,53)                                       |
| B*56                         | 0                    | 0    | 45               | 1,2  | 2,36     | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| B*57                         | 7                    | 3,7  | 193              | 5,4  | 0,92     | p > 0,05 | 0,69 (0,32-1,48)                                       |
| B*58                         | 15                   | 8    | 265              | 7,3  | 0,12     | p > 0,05 | 1,1 (0,64-1,89)                                        |
| B*59                         | 0                    | 0    | 0                | 0    | H3*      | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| B*67                         | 0                    | 0    | 10               | 0,3  | 0,52     | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| B*73                         | 0                    | 0    | 12               | 0,3  | 0,62     | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| B*78                         | 0                    | 0    | 0                | 0    | H3*      | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| B*81                         | 0                    | 0    | 0                | 0    | H3*      | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| B*82                         | 0                    | 0    | 0                | 0    | H3*      | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |
| B*83                         | 0                    | 0    | 0                | 0    | H3*      | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

**ТАБЛИЦА 3. ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ HLA-АНТИГЕНОВ ЛОКУСА C У ПАЦИЕНТОВ С ОМЛ И ДОНОРОВ**

TABLE 3. DISTRIBUTION OF HLA ANTIGENS OF LOCUS C IN PATIENTS WITH AML AND DONORS

| Антигены HLA<br>HLA antigens | Пациенты<br>Patients |      | Доноры<br>Donors |      | $\chi^2$ | p        | ОШ (ДИ 95%)<br>Odds ratio<br>(confidence interval 95%) |
|------------------------------|----------------------|------|------------------|------|----------|----------|--------------------------------------------------------|
|                              | n                    | %    | n                | %    |          |          |                                                        |
| C*01                         | 22                   | 11,8 | 492              | 13,7 | 0,59     | p > 0,05 | 0,84 (0,53-1,32)                                       |
| C*02                         | 11                   | 5,9  | 512              | 14,3 | 10,52    | p < 0,01 | 0,37 (0,20-0,69)                                       |
| C*03                         | 52                   | 27,8 | 1058             | 29,5 | 0,26     | p > 0,05 | 0,92 (0,66-1,28)                                       |
| C*04                         | 28                   | 15   | 689              | 19,2 | 2,1      | p > 0,05 | 0,74 (0,49-1,11)                                       |
| C*05                         | 7                    | 3,7  | 200              | 5,6  | 1,16     | p > 0,05 | 0,66 (0,30-1,42)                                       |
| C*06                         | 56                   | 29,9 | 934              | 26,1 | 1,38     | p > 0,05 | 1,21 (0,88-1,67)                                       |
| C*07                         | 60                   | 32,1 | 1356             | 37,9 | 2,52     | p > 0,05 | 0,78 (0,57-1,06)                                       |
| C*08                         | 22                   | 11,8 | 414              | 11,6 | 0,007    | p > 0,05 | 1,02 (0,65-1,61)                                       |
| C*12                         | 38                   | 20,3 | 676              | 18,9 | 0,24     | p > 0,05 | 1,1 (0,76-1,58)                                        |
| C*14                         | 8                    | 4,3  | 134              | 3,7  | 0,14     | p > 0,05 | 1,15 (0,55-2,38)                                       |
| C*15                         | 11                   | 5,9  | 356              | 9,9  | 3,33     | p > 0,05 | 0,57 (0,31-1,05)                                       |
| C*16                         | 5                    | 2,7  | 116              | 3,2  | 0,18     | p > 0,05 | 0,82 (0,33-2,03)                                       |
| C*17                         | 4                    | 2,1  | 89               | 2,5  | 0,09     | p > 0,05 | 0,86 (0,31-2,36)                                       |
| C*18                         | 0                    | 0    | 1                | 0    | 0,052    | p > 0,05 | 0 (0-0)                                                |

**ТАБЛИЦА 4. ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ HLA-АНТИГЕНОВ ЛОКУСА DRB1 У ПАЦИЕНТОВ С ОМЛ И ДОНОРОВ**

TABLE 4. DISTRIBUTION OF HLA ANTIGENS OF LOCUS DRB1 IN PATIENTS WITH AML AND DONORS

| Антигены HLA<br>HLA antigens | Пациенты<br>Patients |      | Доноры<br>Donors |      | $\chi^2$ | p        | ОШ (ДИ 95%)<br>Odds ratio<br>(confidence interval 95%) |
|------------------------------|----------------------|------|------------------|------|----------|----------|--------------------------------------------------------|
|                              | n                    | %    | n                | %    |          |          |                                                        |
| DRB1*01                      | 17                   | 9,1  | 553              | 15,4 | 5,50     | p < 0,05 | 0,55 (0,33-0,91)                                       |
| DRB1*03                      | 30                   | 16   | 665              | 18,5 | 0,71     | p > 0,05 | 0,84 (0,56-1,26)                                       |
| DRB1*04                      | 38                   | 20,3 | 960              | 26,7 | 3,73     | p > 0,05 | 0,7 (0,49-1,01)                                        |
| DRB1*07                      | 53                   | 28,3 | 887              | 24,7 | 1,28     | p > 0,05 | 1,21 (0,87-1,67)                                       |
| DRB1*08                      | 18                   | 9,6  | 365              | 10,2 | 0,05     | p > 0,05 | 0,94 (0,57-1,55)                                       |
| DRB1*09                      | 16                   | 8,6  | 208              | 5,8  | 2,45     | p > 0,05 | 1,52 (0,90-2,59)                                       |
| DRB1*10                      | 11                   | 5,9  | 133              | 3,7  | 2,31     | p > 0,05 | 1,63 (0,86-3,06)                                       |
| DRB1*11                      | 43                   | 23   | 643              | 17,9 | 3,12     | p > 0,05 | 1,37 (0,96-1,95)                                       |
| DRB1*12                      | 14                   | 7,5  | 288              | 8    | 0,08     | p > 0,05 | 0,93 (0,53-1,62)                                       |
| DRB1*13                      | 37                   | 19,8 | 738              | 20,5 | 0,060    | p > 0,05 | 0,95 (0,66-1,38)                                       |
| DRB1*14                      | 18                   | 9,6  | 410              | 11,4 | 0,56     | p > 0,05 | 0,83 (0,50-1,36)                                       |
| DRB1*15                      | 37                   | 19,8 | 861              | 23,9 | 1,70     | p > 0,05 | 0,78 (0,54-1,13)                                       |
| DRB1*16                      | 2                    | 1,1  | 140              | 3,9  | 3,93     | p < 0,05 | 0,27 (0,07-1,09)                                       |

ТАБЛИЦА 5. ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ HLA-АНТИГЕНОВ ЛОКУСА DQB1 У ПАЦИЕНТОВ С ОМЛ И ДОНОРОВ

TABLE 5. DISTRIBUTION OF HLA ANTIGENS OF LOCUS DQB1 IN PATIENTS WITH AML AND DONORS

| Антигены HLA<br>HLA antigens | Пациенты<br>Patients |      | Доноры<br>Donors |      | $\chi^2$ | p        | ОШ (ДИ 95%)<br>Odds ratio<br>(confidence interval 95%) |
|------------------------------|----------------------|------|------------------|------|----------|----------|--------------------------------------------------------|
|                              | n                    | %    | n                | %    |          |          |                                                        |
| DQB1*02                      | 71                   | 38   | 1340             | 37,5 | 0,02     | p > 0,05 | 1,02 (0,75-1,38)                                       |
| DQB1*03                      | 112                  | 59,9 | 2319             | 64,8 | 1,91     | p > 0,05 | 0,81 (0,60-1,09)                                       |
| DQB1*04                      | 14                   | 7,5  | 282              | 7,9  | 0,04     | p > 0,05 | 0,95 (0,54-1,65)                                       |
| DQB1*05                      | 48                   | 25,7 | 1128             | 31,5 | 2,86     | p > 0,05 | 0,75 (0,54-1,05)                                       |
| DQB1*06                      | 65                   | 34,8 | 1555             | 43,5 | 5,52     | p < 0,05 | 0,69 (0,51-0,94)                                       |

тию ОМЛ в турецкой и мексиканской популяциях [8, 11]. Присутствие антигена HLA-C\*02 (OR = 0,37, CI 0,2-0,69, p < 0,01) чаще установлено в контрольной группе, что позволяет предположить его протективный эффект в отношении развития ОМЛ. В аналогичных публикациях выделяют ген HLA-C\*03, который был отмечен как предрасполагающий к развитию ОМЛ [14].

Присутствие антигенов HLA-DRB1\*01 (OR = 0,55, CI 0,33-0,91, p < 0,05), \*04 (OR = 0,7, CI 0,49-1,01, p < 0,05), \*16 (OR = 0,27, CI 0,07-1,09, p < 0,05) чаще установлено в контрольной группе, что позволяет рассматривать их протективный эффект в отношении развития данной патологии, что нашло подтверждение в аналогичных зарубежных публикациях о роли HLA-DRB1\*04 гена [12].

Согласно литературным данным, выделяют гены HLA-DRB1\*03, \*07, \*08, \*11, \*13, \*15 как предрасполагающие к развитию ОМЛ, что не было выявлено среди наших пациентов [6, 7, 11, 12].

В HLA-DQB1\*06 локусе среди пациентов не было отмечено достоверных значений, тогда как у здоровых лиц преобладал HLA-DQB1\*06 (OR = 0,69, CI 0,51-0,94, p < 0,05), что позволяет предположить наличие его протективного эффекта в отношении развития ОМЛ. Группа исследователей отмечает среди бразильской, иранской популяций HLA-DQB1\*03, \*04 как защитный ген в отношении развития ОМЛ [7, 12].

По результатам исследования следует отметить, что многочисленные подобные публикации

подтверждают наши данные, однако имеются и противоречивые выводы. Это обусловлено недостаточностью обследованных когорт, что является основой для дальнейшего исследования. Полученные данные могут быть использованы при изучении данной патологии, ассоциированной с HLA-антигенами.

## Заключение

Проведенный анализ выявил характерный профиль распределения специфичностей системы HLA у пациентов с ОМЛ. Изучение распределения антигенов системы HLA у пациентов с ОМЛ позволило констатировать существование ассоциативных связей между наличием в фенотипе пациентов HLA-A\*31, B\*37 и развитием ОМЛ. Предположительно установлена протективная роль в отношении данной патологии ряда антигенов HLA-A\*02, B\*27, C\*02, DRB1\*01, \*04, DQB1\*06.

Проведенное исследование характеризует особенности распределения генов гистосовместимости у пациентов с ОМЛ, обнаружение HLA-маркеров, определяющие риск или устойчивость к возникновению данного заболевания. Установлены характерные специфические маркеры системы HLA у пациентов с ОМЛ населения республики, которые обуславливают максимальный риск развития заболевания.

## Список литературы / References

1. Волкова М.А., Клиническая онкогематология. М.: Медицина, 2001. 576 с. [Volkova M.A. Clinical oncohematology]. Moscow: Medicine, 2001. 576 p.
2. Ковалева Л.Г. Острый лейкоз. М.: Медицина, 1990. [Kovaleva L.G. Acute leukemia]. Moscow: Medicine, 1990.
3. Лебедева Л.Л. Генетический полиморфизм антигенов гистосовместимости здорового детского населения московского региона и при острых лейкозах у детей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010.

[Lebedeva L.L. Genetic polymorphism of histocompatibility antigens of healthy children in the Moscow region and in acute leukemia in children: Extended abstract of candidate's thesis]. Moscow, 2010.

4. Шабалин В.Н., Серова Л.Д. Клиническая иммунология. Л.: Медицина, 1988. С. 76-78. [Shabalin V.N., Serova L.D. Clinical Immunology]. Leningrad: Medicine, 1988, pp. 76-78.

5. Barion L.A., Tsuneto L.T., Testa G.V., Lieber S.R., Persoli L.B., Marques S.B., Vigorito A.C., Aranha F.J., Eid K.A., Oliveira G.B., Miranda E.C., Souza C.A., Visentainer J.E. Association between HLA and leukemia in a mixed Brazilian population. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 2007, Vol. 53, no. 3, pp. 252-256.

6. Cao H.X., Zhao L., Zhou L.X. HLA-DRB1 allele polymorphism associated with susceptibility to leukemia in Han nationality of Gansu. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2005, Vol. 13, no. 5, pp. 788-792.

7. Fernandes T.A., Fukai R., Souza C.A., Lorand-Metze I., Magna L.A., Kraemer M.H. Molecular identification of the HLA-DRB1-DQB1 for diagnosis and follow-up of acute leukemias. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2010, Vol. 44, no. 2, pp. 69-73.

8. Fernández-Torres J., Flores-Jiménez D., Arroyo-Pérez A., Granados J., López-Reyes A. HLA-B\*40 allele plays a role in the development of acute leukemia in Mexican population: a case-control study. *Biomed. Res. Int.*, 2013, Vol. 2013, 705862. doi: 10.1155/2013/705862.

9. Jemal A., Thomas A., Murray T. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.*, 2002, Vol. 52, no. 1, pp. 23-47.

10. Lukens J.N. In: Wintrobe's Clinical Hematology. 9th ed., London, 1993, pp. 1873-1891.

11. Ozdilli K., Oguz F.S., Anak S., Kekik C., Carin M., Gedikoglu G. The frequency of HLA class I and II alleles in Turkish childhood acute leukaemia patients. *J. Int. Med. Res.*, 2010, Vol. 38, no. 5, pp. 1835-1844.

12. Sarafnejad A., Khosravi F., Alimoghadam K., Dianat S., Ansari Pour B., Moradi B., Dorkhosh S., Amirzargar A. HLA class II allele and haplotype frequencies in Iranian patients with acute myelogenous leukemia and control group. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2006, Vol. 5, no. 3, pp. 115-119.

13. Scheinberg D.A., Maslak P., Weiss M. Acute leukemias. In: DeVita V.T. Jr, Hellman S., Rosenberg S.A., editors. *Cancer principles and practice of oncology*. 5th ed., Philadelphia, 1997, pp. 2293-2321.

14. Yoon J. Acute myeloid leukemia is a disease associated with HLA-C3. *Acta Haematol.*, 2015, Vol. 133, no. 2, pp. 164-167.

**Авторы:**

**Рамильева И.Р.** — врач отделения иммунологического типирования тканей (HLA) РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Нур-Султан, Республика Казахстан

**Буркитбаев Ж.К.** — к.м.н., председатель правления ТОО «Национальный научный онкологический центр», г. Нур-Султан, Республика Казахстан

**Абдрахманова С.А.** — к.м.н., директор РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Нур-Султан, Республика Казахстан

**Турганбекова А.А.** — заведующая отделением иммунологического типирования тканей (HLA) РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Нур-Султан, Республика Казахстан

**Баймукашева Д.К.** — врач отделения иммунологического типирования тканей (HLA), РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Нур-Султан, Республика Казахстан

**Жибурт Е.Б.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой трансфузиологии и проблем переливания крови, Институт усовершенствования врачей ФГБОУ ВО «Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

**Authors:**

**Ramilyeva I.R.**, Doctor Med., Department of Immunological Tissue Typing (HLA), Scientific and Production Center of Transfusiology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

**Burkitbaev Zh.K.**, PhD (Medicine), Chairman, Managing Board, National Scientific Cancer Center, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

**Abdrakhmanova S.A.**, PhD (Medicine), Director, Scientific and Production Center of Transfusiology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

**Turganbekova A.A.**, Head, Department of Immunological Tissue Typing (HLA), Scientific and Production Center of Transfusiology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

**Baimukasheva D.K.**, Doctor Med., Department of Immunological Tissue Typing (HLA), Scientific and Production Center of Transfusiology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

**Zhiburt E.B.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Transfusiology and Blood Transfusion Problems, Institute of Postgraduate Education, N. Pirogov National Medical and Surgical Center, Moscow, Russian Federation

Поступила 24.09.2018

Отправлена на доработку 10.10.2018

Принята к печати 08.03.2019

Received 24.09.2018

Revision received 10.10.2018

Accepted 08.03.2019

## **ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ТЯЖЕСТИ ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВ НА СОСТОЯНИЕ НЕЙРОПЕПТИДНО-ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА**

**Герцев А.В.<sup>1,2</sup>, Ищук В.Н.<sup>1,2</sup>, Закревский Ю.Н.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Объединенное стратегическое командование «Север», Россия

**Резюме.** Встречаемость ИБС в сочетании с тревожно-депрессивными нарушениями широко распространена в клинической практике. У таких пациентов расстройства аффективного спектра значительно утяжеляют течение кардиологической патологии в виде прогрессирования атеросклеротического процесса и отягощают прогноз. Особое значение в проатерогенном действии в очагах атеросклероза отведено маркерам иммунного воспаления, и прежде всего цитокинам. Основными регуляторами таких процессов на нейроиммунном уровне являются эндогенные опиатные пептиды. Отмечена их роль в стабилизации содержания цитокинов при развитии воспаления в атеросклеротической бляшке и в процессе адаптации сердечной мышцы к стрессовым воздействиям. Несмотря на наличие достоверных данных о роли маркеров иммунного воспаления в атерогенезе, обоснованности регулирующего значения в этом процессе опиатных пептидов, до сих пор открытыми остаются вопросы о влиянии расстройств аффективного спектра на нейропептидно-цитокиновый статус иммунной системы у пациентов с хронической формой ИБС, а также в каком диапазоне будут проследиваться эти изменения при болевой и безболевой ишемии миокарда. В связи с чем целью настоящего исследования явилась оценка влияния тяжести тревожно-депрессивных нарушений на нейропептидно-цитокиновый статус иммунной системы у больных с хронической формой ИБС при различных клинических вариантах ее течения, а также сравнительная характеристика степени этих изменений при болевой и безболевой ишемии миокарда.

Были сформированы группы, которые, в свою очередь, распределены на подгруппы по наличию у них в процентном соотношении болевых и безболевых эпизодов стенокардии: 1-я (n = 36) — пациенты с хронической ИБС, протекающей на фоне тревожно-депрессивных расстройств умеренного характера; 2-я (n = 34) — обследуемые с хронической ИБС и тревожно-депрессивными нарушениями легкой степени; 3-я (n = 20) — пациенты с хронической ИБС без тревожно-депрессивных расстройств;

### **Адрес для переписки:**

Герцев Алексей Владимирович  
ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия  
имени С.М. Кирова»  
195220, Россия, Санкт-Петербург, ул. Гжатская, 5,  
корп. 3, кв. 177.  
Тел.: 8 (902) 135-41-42.  
E-mail: starcom50@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Gertsev Alexey V.  
S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg,  
Russian Federation  
195220, Russian Federation, St. Petersburg,  
Gzhatskaya str., 5, bldg 3, apt 177.  
Phone: 7 (902) 135-41-42.  
E-mail: starcom50@mail.ru

### **Образец цитирования:**

А.В. Герцев, В.Н. Ищук, Ю.Н. Закревский  
«Особенности влияния тяжести тревожно-депрессивных расстройств на состояние нейропептидно-цитокинового статуса иммунной системы при различных вариантах клинического течения хронической ишемической болезни сердца»  
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5.  
С. 973–980. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-973-980  
© Герцев А.В. и соавт., 2019

### **For citation:**

A.V. Gertsev, V.N. Ischuk, Yu.N. Zakrevsky "Impact of anxiety and depressive disorders on the neuropeptide-cytokine status of immune system in various variants of the clinical course of chronic ischemic heart disease", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 973–980.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-973-980  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-973-980

4-я (n = 22) — контроль (здоровые лица). По наличию болевых и безболевых эпизодов стенокардии авторами выделено: в 1-й группе пациентов болевая форма ИБС выявлена у 44% обследованных (n = 17), безболевая форма ИБС установлена у 56% больных (n = 19); во 2-й группе пациентов болевая форма ИБС — у 52% обследованных (n = 18), безболевая форма ИБС — у 48% (n = 16); в 3-й группе болевая форма ИБС подтверждена у 37% больных (n = 8), безболевая форма ИБС — у 63% пациентов (n = 12). Во всех группах исследовали состояние психофизиологического статуса (психологическое тестирование), уровень вегетативной регуляции ( $\beta$ -эндорфин), оценивали функцию сердечно-сосудистой системы (СМЭКГ) и показатели содержания в периферической крови TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-4, IL-10.

В ходе проведенного клинико-лабораторного обследования авторами установлено, что у пациентов с хронической формой ИБС тревожно-депрессивные нарушения оказывают прямое патологическое воздействие на нейропептидно-цитокиновый статус иммунной системы в виде подавления  $\beta$ -эндорфина, повышения уровня содержания провоспалительных и снижения противовоспалительных цитокинов. При этом наиболее значимые изменения происходят у обследуемых с безболевой ишемией миокарда.

Ключевые слова: ишемическая болезнь, атеросклероз, тревожность, депрессия,  $\beta$ -эндорфин, цитокины

## IMPACT OF ANXIETY AND DEPRESSIVE DISORDERS ON THE NEUROPEPTIDE-CYTOKINE STATUS OF IMMUNE SYSTEM IN VARIOUS VARIANTS OF THE CLINICAL COURSE OF CHRONIC ISCHEMIC HEART DISEASE

Gertsev A.V.<sup>a, b</sup>, Ischuk V.N.<sup>a, b</sup>, Zakrevsky Yu.N.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> "North" Joint Strategic Command, Russian Federation

**Abstract.** Occurrence of coronary artery disease in combination with anxiety-depressive disorders is common in clinical practice. In such patients, affective disorders significantly may cause progression of atherosclerotic processes, thus complicating the course of cardiac pathology and prognosis. Distinct markers of immune inflammation, first of all, cytokines are of particular importance for the pro-atherogenic effects in atherosclerotic foci. Endogenous opiate peptides are considered the main regulators of these processes at the neuroimmune level. Their role for stabilization of cytokine levels in evolving inflammation in atherosclerotic plaque, and during adaptation of heart muscle to stressful effects was previously shown. Despite reliable data on the role of immune inflammatory markers in atherogenesis, the validity of the regulatory role of opiate peptides in this process, questions still exist about the effects of affective disorders upon neuropeptide-cytokine status of the immune system in the patients with chronic ischemic heart disease (IHD). Another issue concerns the ranges of these changes in painful and painless forms of myocardial ischemia.

Therefore, the purpose of our study was to assess the impact of severity of anxiety-depressive disorders upon the neuropeptide-cytokine status of immune system in patients with various clinical variants of chronic IHD, as well as comparisons of these changes expressed in painful and painless myocardial ischemia.

Appropriate groups were formed, then being divided into subgroups, according to the percentage of painful and painless episodes of angina pectoris: Group 1 (n = 36) included patients with chronic coronary artery disease occurring and moderate-grade anxiety/depression; Group 2 (n = 34) consisted of patients with chronic coronary artery disease and mild anxiety-depressive disorders; Group 3 (n = 20) included patients with chronic coronary artery disease without anxiety and depressive disorders; Group 4 (n = 22) represented controls (healthy persons). As based on presence of painful and painless episodes of stenocardia, the following subgroups were specified: in the 1<sup>st</sup> group of patients, painful form of IHD was detected in 44% of cases (n = 17); painless form of IHD was detected in 56% of patients (n = 19); in the 2<sup>nd</sup> group of patients, painful form of IHD is in 52% of the examined persons (n = 18), painless form of IHD was revealed in 48% of cases (n = 16); in the 3<sup>rd</sup> group, the painful form of IHD was confirmed in 37% of patients (n = 8), painless form of IHD was observed in 63% of patients (n = 12). In all these groups, the following parameters were evaluated: the state of psychophysiological status determined by psychological testing, the levels of vegetative regulation ( $\beta$ -endorphin), the function of cardiovascular system (SMECG), and the levels of peripheral blood TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-4, IL-10 were also measured.



As based on the data of clinical and laboratory examination, we have suggested that, in the patients with chronic IHD, anxiety and depressive disorders exert a direct pathological effect on the neuropeptide-cytokine status of immune system expressed as suppression of  $\beta$ -endorphin, increased level of pro-inflammatory cytokines and a decrease in anti-inflammatory factors. Meanwhile, these changes are especially pronounced in the patients with painless myocardial ischemia.

*Keywords: ischemic disease, atherosclerosis, anxiety, depression,  $\beta$ -endorphin, cytokines*

## Введение

Тревожно-депрессивные нарушения в коморбидности с заболеваниями сердечно-сосудистой системы широко распространены в клинике внутренних болезней. При этом наибольшую актуальность в клинической практике приобрело наличие тревожно-депрессивных расстройств у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) [11]. У таких пациентов расстройства аффективного спектра значительно утяжеляют течение кардиологической патологии, способствуют прогрессированию атеросклеротических процессов и приводят к более раннему возникновению осложнений в виде инфаркта миокарда и инсультов [2, 9]. Среди основных патофизиологических механизмов воздействия тревожно-депрессивных расстройств на атеросклеротический процесс у больных с ИБС следует рассматривать такие, как нарушение взаимодействий между вегетативной нервной и иммунной системами, активация в атеросклеротической бляшке иммунного воспаления, формирование дисбаланса между действием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [1, 6].

Отмечено особое значение маркеров иммунной системы, и прежде всего цитокинов, оказывать проатерогенное действие в очагах атеросклероза [10]. Так, TNF $\alpha$  усиливает экспрессию на эндотелии молекул адгезии, активирует макрофаги, нейтрофилы, способствует секреции простагландинов и обуславливает синтез белков острой фазы воспаления [4, 5]. IL-1 $\beta$  запускает каскад воспалительных процессов после повреждения эндотелиальной стенки, а IL-6 способствует активации эндотелия, усиливает ее адгезивную способность к тромбоцитам и лейкоцитам, что приводит к пролиферации гладкомышечных элементов сосудистого русла [12, 13].

Регуляторами провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при атеросклеротическом процессе являются эндогенные опиатные пептиды вегетативной нервной системы (ВНС) [3]. Особая роль здесь принадлежит опиоидным пептидам из группы пропиомеланокортина, и в первую очередь  $\beta$ -эндорфину. Отмечена способность  $\beta$ -эндорфина к регуляции продукции цитокинов при развитии воспалительных процессов во время стресса и депрессивных нарушениях [7]. Кроме того,  $\beta$ -эндорфин участвует в формировании устойчивой противовоспалительной активности при прогрессировании им-

мунного воспаления и тем самым поддерживает компенсаторно-приспособительный характер иммунной системы на фоне неблагоприятных внешних и внутренних условий [14, 15]. Высокая активность  $\beta$ -эндорфина повышает устойчивость миокарда к ишемическим повреждениям на фоне эмоциональных нагрузок, а также в процессе адаптации сердечной мышцы к стрессовым воздействиям [8].

Таким образом, из вышесказанного следует, что атеросклеротические изменения в миокарде являются следствием сложных процессов нейроиммунных взаимодействий, при которых основная роль отведена цитокиновым звеньям иммунной системы и эндогенным опиатным пептидам. Их участие в атеросклеротическом процессе, как правило, строго коррелирует с наличием хронических стрессов в анамнезе и, как следствие, будет являться неблагоприятным прогностическим фактором не только в формировании тревожно-депрессивных нарушений, но и в плане прогрессирования кардиологической патологии.

Тем не менее до настоящего времени открытыми остаются вопросы о влиянии расстройств аффективного спектра на нейропептидно-цитокиновый статус иммунной системы у пациентов с хронической формой ИБС, а также в каком диапазоне будут проследиваться эти изменения при болевой и безболевой ишемии миокарда. Полученные данные будут способствовать раскрытию дополнительных звеньев патогенеза при атеросклеротическом процессе на уровне нейроиммунных взаимодействий, что позволит объективизировать целесообразность применения в терапии больных с ИБС и тревожно-депрессивными нарушениями не только стандартных кардиотропных средств, но и препаратов психотропного действия в комплексе с лечением психотерапевтической направленности.

В связи с этим **целью настоящего исследования** явилась оценка влияния тяжести тревожно-депрессивных нарушений на нейропептидно-цитокиновый статус иммунной системы у больных с хронической формой ИБС при различных клинических вариантах ее течения, а также сравнительная характеристика степени этих изменений при болевой и безболевой ишемии миокарда.

## Материалы и методы

Провели клиническое обследование 90 больных (мужчин) в возрасте от 45 до 58 лет, средний

возраст —  $(51,0 \pm 6,4)$  лет. Все обследуемые представлены пациентами с хронической формой ИБС, протекающей с болевыми и безболевыми эпизодами стенокардии (I25 по МКБ-10) в коморбидности с тревожно-депрессивными расстройствами (F41.2 по МКБ-10) различной степени выраженности. Длительность наблюдения за больными составила  $22 \pm 7,3$  суток.

Исследования проводили в клинике военно-морской терапии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, углубленное лабораторное обследование — в научно-исследовательской лаборатории клеточного и гуморального иммунитета Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова МЧС России (Санкт-Петербург).

Для решения задач, поставленных в настоящей работе, сформированы группы больных в коморбидности с тревожно-депрессивными нарушениями:

1-я ( $n = 36$ ) — пациенты с хронической ИБС, протекающей на фоне тревожно-депрессивных расстройств умеренного характера; 2-я ( $n = 34$ ) — обследуемые с хронической ИБС и тревожно-депрессивными нарушениями легкой степени; 3-я ( $n = 20$ ) — пациенты с хронической ИБС без тревожно-депрессивных расстройств; 4-я ( $n = 22$ ) — контроль (здоровые лица).

Критерием исключения являлись пациенты с активным воспалительным процессом, онкологическими заболеваниями и с заболеваниями иммунной системы.

С целью исследования степени влияния тяжести тревожно-депрессивных нарушений на состояние нейропептидно-цитокинового статуса иммунной системы при различных вариантах течения хронической ИБС было проведено клинико-лабораторное исследование. В группах обследования исследовали состояние психофизиологического статуса, уровень вегетативной регуляции, оценивали функцию сердечно-сосудистой системы и показатели содержания в периферической крови цитокинов провоспалительного и противовоспалительного спектра.

Психологические и психофизиологические процессы исследовали с помощью стандартизированного многофакторного исследования личности (СМИЛ), являющегося адаптивным вариантом Миннесотского многопрофильного личностного опросника (ММПИ), 8-цветового теста Люшера, шкал самооценки Спилбергера—Ханнина реактивной и личностной тревожности.

Проанализировали показатели следующих шкал теста СМИЛ: HS (ипохондрическая фиксация), D (склонность к депрессивным реакциям), HY (склонность к истероидным реакциям), PD (психопатические отклонения), PA (склонность к паранойальным реакциям), PT (склонность к психоастеническим реакциям).

Использовали показатели теста Люшера: ЛрСТР (наличие стрессового состояния), ЛрТР (тревожность), Лр85 (концентричность/эксцентричность), ЛрНО-1 (отклонение от аутогенной нормы), ЛрN-1 (отклонение от общей нормы), ЛрЛИЧ (баланс личностных свойств), ЛрВНС (вегетативный индекс, характеризующий баланс вегетативной нервной системы).

Наличие хронической ИБС верифицировали в стационарных условиях посредством исследования сердечно-сосудистой системы с применением объективных данных (жалобы, анамнез) и инструментальных методов исследования (ЭКГ, суточное мониторирование ЭКГ с нагрузочными пробами, ЭхоКГ).

Для оценки функции сердечно-сосудистой системы при ИБС в настоящей работе оценивали показатели суточного мониторирования ЭКГ.

Использовали стандартное расположение электродов на грудной клетке с целью получения модифицированных грудных отведений  $V_1$  и  $V_5$ . Последующий анализ результатов позволял выявлять характер нарушений ритма и проводимости, транзиторное снижение сегмента S-T, суточную циркадность показателей variability ритма сердца. Оценивали показатели: количество, продолжительность болевых и безболевых приступов стенокардии, глубину депрессии сегмента S-T, ЧСС в начале ишемических эпизодов. Ишемическими изменениями ЭКГ считали горизонтальную или косовосходящую депрессию сегмента S-T на 1,0-1,5 мм и более, подъем ST-сегмента на 2 мм, а также преходящую инверсию зубца T.

Во всех группах обследования в стационарных условиях было установлено наличие болевых и безболевых эпизодов стенокардии, среди которых выделили: в 1-й группе пациентов болевую форму ИБС у 44% обследованных ( $n = 17$ ), безболевая форма ИБС установлена у 56% больных ( $n = 19$ ); во 2-й группе пациентов болевая форма ИБС выявлена у 52% обследованных ( $n = 18$ ), безболевая форма ИБС — у 48% ( $n = 16$ ); в 3-й группе болевая форма ИБС подтверждена у 37% обследованных ( $n = 8$ ), безболевая форма ИБС — у 63% пациентов ( $n = 12$ ). Во всех группах болевые и безболевые эпизоды ишемии миокарда по своему эквиваленту, согласно принятой классификации Канадского общества кардиологов, соответствовали I-II функциональному классу стенокардии.

Состояние надсегментарного аппарата ВНС оценивали путем определения уровня содержания в периферической крови опиоидного пептида из группы пропиеомеланокортина —  $\beta$ -эндорфина с применением зарубежных тест-систем фирмы BioSource International (США, Калифорния). Чувствительность метода составила 0,04-0,06 пг/мл.

Цитокиновый статус иммунной системы исследовали с применением тест-систем отечественного и зарубежного производства по определению в сыворотке крови пациентов цитокинов провоспалительного (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) и противовоспалительного (IL-4, IL-10) спектра методом иммуноферментного анализа. Применяли тест-системы фирмы BioSource International (США, Калифорния) для определения в сыворотке крови IL-1 $\beta$ , IL-4 и фирмы ProCon (Санкт-Петербург) — TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10. Чувствительность тест-систем для определения цитокинов — 2 пг/мл,  $\beta$ -эндорфина — 0,04-0,06 пг/мл.

Математическую обработку данных осуществили на IBM-совместимом персональном компьютере. Электронную базу данных создали в программной среде Microsoft Excel 2007, статистический анализ выполнили с помощью пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0 (StatSoft, США). Предварительно оценивали соответствие исследуемых выборок закону нормального распределения. Определяли среднее арифметическое и его стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ), 95%-доверительный интервал для среднего ( $M \pm m$ ).

## Результаты

### Психический и психофизиологический статус

Изученные нами индивидуально-личностные особенности с помощью теста СМЛЛ показали, что у обследуемых 1-й группы имело место более значимое повышение значений по шкалам невротической триады D, HS, HY, а также шкал PD, PA и Pt, что свидетельствует о более высоком депрессивном состоянии у этих больных по сравнению с пациентами группы 2 ( $p < 0,05$ ). По данным 8-цветового теста Люшера в 1-й группе по отношению к пациентам 2-й группы наиболее значимые различия наблюдались по показателям стрессового состояния, тревожности, концентричности/эксцентричности, вегетативного индекса и отклонения от общей нормы ( $p < 0,05$ ). При анализе шкал теста Спилберга—Ханина было установлено, что у пациентов 1-й группы имеет место повышенная реактивная тревожность, которая проявлялась в виде стойкой напряженности, беспокойством, нарушением внимания и тревогой ( $p < 0,05$ ). Личностная тревожность у этих больных характеризовалась склонностью воспринимать большой круг ситуаций как угрожающие, опасные и прямо коррелировала с наличием невротического конфликта, эмоциональными и невротическими срывами ( $p < 0,05$ ).

Во 2-й группе реактивная и личностная тревожность проявлялась легкими беспокойствами, напряжением, меньшей склонностью к переживаниям и большей устойчивостью к воздействию стрессорных социальных факторов.

В 3-й группе каких-либо значимых отклонений от основных показателей по шкалам теста СМЛЛ, 8-цветового теста Люшера, реактивной и личностной тревожности по тесту Спилберга—Ханина выявлено не было, что значимо отличалось от аналогичных показателей 1-й и 2-й групп обследуемых ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, выявленные изменения психического и психофизиологического статуса в 1-й группе обследуемых свидетельствуют о наличии у них стойких (умеренных) депрессивных реакций, стрессового состояния, психопатических и психоастенических проявлений личности, а также неустойчивости вегетативной регуляции в виде симпатикотонического типа (эрготропный тонус) вегетативных влияний. Кроме того, тест Спилберга—Ханина показал, что в группе этих испытуемых имеют место реактивная и личностная тревожности, которые нами расценены как умеренные.

### Оценка функции сердечно-сосудистой системы

После проведения суточного мониторингирования ЭКГ в группах обследуемых были получены следующие результаты:

— у больных с хронической ИБС и умеренными тревожно-депрессивными нарушениями количество болевых и безболевых эпизодов ишемии миокарда за сутки при ходьбе, а также на фоне малых физических нагрузок (лестничная проба) значимо превышали аналогичные показатели во 2-й и 3-й группах обследуемых ( $p < 0,05$ ). Продолжительность болевых и безболевых эпизодов ишемии миокарда у таких больных также значимо превышала аналогичные показатели больных 2-й и 3-й групп ( $p < 0,05$ );

— у пациентов с хронической ИБС и тревожно-депрессивными нарушениями легкой степени количество болевых и безболевых эпизодов ишемии миокарда за сутки, а также их продолжительность значимо были выше имеющихся изменений, чем в группе обследуемых без тревожно-депрессивных расстройств ( $p < 0,05$ ).

Из вышесказанного следует заключить, что у пациентов с хронической ИБС и умеренными тревожно-депрессивными нарушениями отмечается большее количество болевых и безболевых эпизодов ишемии миокарда, которые по продолжительности становились длительнее и провоцировались меньшими физическими нагрузками, чем в группах других больных.

### Состояние надсегментарной области ВНС

При анализе уровня содержания  $\beta$ -эндорфина в периферической крови в группах обследования нами было выявлено достоверно значимое снижение данного показателя в 1-й группе пациентов по отношению ко 2-й ( $p < 0,05$ ) и 3-й ( $p < 0,05$ ) группам. Значимое снижение  $\beta$ -эндорфина также было установлено у пациентов во 2-й группе по отношению к обследуемым группы 3 ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

**ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ  $\beta$ -ЭНДОРФИНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИБС С БОЛЕВЫМИ И БЕЗБОЛЕВЫМИ ПРИСТУПАМИ ИШЕМИИ МИОКАРДА,  $M \pm SD$ , пг/мл**

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE LEVEL OF  $\beta$ -ENDORPHIN IN CHRONIC ISCHEMIC HEART DISEASE WITH PAIN AND PAINLESS ATTACKS OF MYOCARDIAL ISCHEMIA,  $M \pm SD$ , pg/ml

| Показатель<br>Index                     | Группы обследуемых<br>Groups of subjects |                    |        |                        |                     |        |                        |                      |        |
|-----------------------------------------|------------------------------------------|--------------------|--------|------------------------|---------------------|--------|------------------------|----------------------|--------|
|                                         | 1-я<br>1 <sup>st</sup>                   |                    |        | 2-я<br>2 <sup>nd</sup> |                     |        | 3-я<br>3 <sup>rd</sup> |                      |        |
|                                         | n = 17                                   | n = 19             | p      | n = 18                 | n = 16              | p      | n = 8                  | n = 12               | p      |
| $\beta$ -эндорфин<br>$\beta$ -endorphin | 1721,0 $\pm$ 512,1                       | 2602,0 $\pm$ 414,3 | < 0,05 | 2423,0 $\pm$ 511,6*    | 3042,0 $\pm$ 315,7* | < 0,05 | 3412,0 $\pm$ 458,2*#   | 4630,0 $\pm$ 381,5*# | < 0,05 |

Примечание. Различия значимы при  $p < 0,05$  по сравнению: \* – с 1-й группой; # – со 2-й группой.

Note. Differences are significant for  $p < 0.05$  compared to: \*, with the 1<sup>st</sup> group; #, with the 2<sup>nd</sup> group.

**ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИБС С БОЛЕВЫМИ И БЕЗБОЛЕВЫМИ ПРИСТУПАМИ ИШЕМИИ МИОКАРДА,  $M \pm SD$ , пг/мл**

TABLE 2. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE LEVEL OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN CHRONIC ISCHEMIC HEART DISEASE WITH PAIN AND PAINLESS ATTACKS OF MYOCARDIAL ISCHEMIA,  $M \pm SD$ , pg/ml

| Показатель<br>Index | Группы обследуемых<br>Groups of subjects |                |        |                        |                 |        |                        |                  |        |
|---------------------|------------------------------------------|----------------|--------|------------------------|-----------------|--------|------------------------|------------------|--------|
|                     | 1-я<br>1 <sup>st</sup>                   |                |        | 2-я<br>2 <sup>nd</sup> |                 |        | 3-я<br>3 <sup>rd</sup> |                  |        |
|                     | n = 17                                   | n = 19         | p      | n = 18                 | n = 16          | p      | n = 8                  | n = 12           | p      |
| TNF $\alpha$        | 36,1 $\pm$ 5,1                           | 41,2 $\pm$ 3,8 | < 0,05 | 28,9 $\pm$ 7,6*        | 32,3 $\pm$ 5,1* | < 0,05 | 21,4 $\pm$ 6,3*#       | 26,3 $\pm$ 3,4*# | < 0,05 |
| IL-1 $\beta$        | 4,3 $\pm$ 1,1                            | 5,1 $\pm$ 1,0  | < 0,05 | 3,8 $\pm$ 0,9*         | 4,2 $\pm$ 1,1*  | < 0,05 | 2,9 $\pm$ 1,0*#        | 3,6 $\pm$ 0,7*#  | < 0,05 |
| IL-6                | 18,8 $\pm$ 7,4                           | 23,6 $\pm$ 4,2 | < 0,05 | 14,2 $\pm$ 2,1*        | 19,3 $\pm$ 2,4* | < 0,05 | 11,2 $\pm$ 1,3*#       | 14,3 $\pm$ 1,5*# | < 0,05 |

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

**ТАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИБС С БОЛЕВЫМИ И БЕЗБОЛЕВЫМИ ПРИСТУПАМИ ИШЕМИИ МИОКАРДА,  $M \pm SD$ , пг/мл**

TABLE 3. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE LEVEL OF ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN CHRONIC ISCHEMIC HEART DISEASE WITH PAIN AND PAINLESS ATTACKS OF MYOCARDIAL ISCHEMIA,  $M \pm SD$ , pg/ml

| Показатель<br>Index | Группы обследуемых<br>Groups of subjects |                |        |                        |                 |        |                        |                  |        |
|---------------------|------------------------------------------|----------------|--------|------------------------|-----------------|--------|------------------------|------------------|--------|
|                     | 1-я<br>1 <sup>st</sup>                   |                |        | 2-я<br>2 <sup>nd</sup> |                 |        | 3-я<br>3 <sup>rd</sup> |                  |        |
|                     | n = 17                                   | n = 19         | p      | n = 18                 | n = 16          | p      | n = 8                  | n = 12           | p      |
| IL-4                | 2,1 $\pm$ 0,4                            | 1,8 $\pm$ 0,3  | < 0,05 | 3,2 $\pm$ 0,3*         | 2,8 $\pm$ 0,4*  | < 0,05 | 4,1 $\pm$ 0,8*#        | 3,6 $\pm$ 0,7*#  | < 0,05 |
| IL-10               | 23,2 $\pm$ 8,3                           | 18,1 $\pm$ 6,2 | < 0,05 | 29,7 $\pm$ 7,1*        | 25,3 $\pm$ 6,7* | < 0,05 | 36,2 $\pm$ 6,0*#       | 32,1 $\pm$ 5,6*# | < 0,05 |

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Кроме того, было отмечено повышение уровня  $\beta$ -эндорфина в группах пациентов с хронической ИБС, протекающей с безболевыми эпизодами стенокардии, по отношению к обследуемым с хронической ИБС и болевым синдромом ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, установлено прямое патологическое воздействие тяжести тревожно-де-

прессивных нарушений на уровень содержания  $\beta$ -эндорфина в виде подавления его активности на периферии. Повышение уровня содержания  $\beta$ -эндорфина у обследуемых с безболевым ишемией миокарда свидетельствует, скорее всего, о компенсаторной реакции в виде активации надсегментарной области ВНС, вследствие более

неблагоприятного в прогностическом плане течения данной патологии.

#### Состояние иммунной регуляции

Все показатели цитокинов провоспалительного и противовоспалительного спектра в группах обследования изменялись в широких пределах (табл. 2, 3). Так, установлено, что у больных с хронической ИБС, протекающей с умеренными тревожно-депрессивными нарушениями, отмечается повышение показателей, отражающих активность воспаления — TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ( $p < 0,05$ ), угнетение IL-4, IL-10 ( $p < 0,05$ ) по отношению к обследуемым другим группам.

Помимо этого, авторами установлено, что у пациентов с хронической ИБС и безболевыми эпизодами ишемии миокарда имеет место более значимое повышение активности TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и подавление IL-4 и IL-10, чем при болевой форме стенокардии напряжения ( $p < 0,05$ ).

Результаты проведенного клинко-лабораторного обследования позволяют резюмировать, что у больных с хронической формой ИБС тревожно-депрессивные нарушения оказывают прямое патологическое воздействие на цитокиновый статус иммунной системы, и эти изменения прямо коррелируют со степенью тяжести расстройств аффективного спектра.

Выявленные изменения на уровне цитокинового пула иммунной системы при безболевой

ишемии миокарда в данном случае свидетельствуют о более неблагоприятном течении в атеросклеротическом процессе у таких больных.

## Выводы

1. Отмечено влияние тяжести тревожно-депрессивных расстройств на клиническое течение хронической формы ишемической болезни сердца. Так, у больных с ишемической болезнью сердца и тревожно-депрессивными нарушениями умеренного характера установлено большее количество болевых и безболевых эпизодов стенокардии, которые по продолжительности становились длительнее и провоцировались меньшими физическими нагрузками.

2. Выявлено прямое патологическое воздействие расстройств тревожно-депрессивного спектра на нейроиммунные процессы: снижение уровня содержания  $\beta$ -эндорфина; повышение цитокинов провоспалительного (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) и угнетение цитокинов противовоспалительного (IL-4, IL-10) спектра.

3. Отмечен регуляторный дисбаланс на уровне нейропептидно-цитокинового звена иммунной системы при безболевой ишемии миокарда, что свидетельствует о более неблагоприятном в прогностическом плане течении данной патологии.

## Список литературы / References

1. Васюк Ю.А., Довженко Т.В., Школьник Е.Л., Ющук Е.Н. Депрессивные и тревожные расстройства в кардиологии. М.: Анахарсис, 2009. 200 с. [Vasyuk Yu.A., Dovzhenko T.V., Shkolnik E.L., Yushchuk E.N. Depressive and anxiety disorders in cardiology]. Moscow: Anaharsis, 2009. 200 p.
2. Васюк Ю.А., Довженко Т.В. Особенности патогенетической взаимосвязи депрессии и сердечно-сосудистых заболеваний // Психические расстройства в общественной медицине, 2007. Т. 2, № 1. С. 1-11. [Vasyuk Yu.A., Dovzhenko T.V. Features pathogenetic relationship of depression and cardiovascular diseases. *Psikhicheskie rasstroystva v obshchestvennoy meditsine = Mental Disorders in General Medicine*, 2007, Vol. 2, no. 1, pp. 1-11. (In Russ.)]
3. Гейн С.В., Горшкова К.Г., Тендрякова С.П. Роль бета-эндорфина в регуляции продукции провоспалительных цитокинов моноцитами периферической крови *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2007. № 2. С. 175-178. [Gein S.V., Gorshkov K.G., Tendryakova S.P. The role of beta-endorphin in the regulation of the production of proinflammatory cytokines by monocytes *in vitro* peripheral blood. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2007, no. 2, pp. 175-178. (In Russ.)]
4. Гордеева Е.К., Каде А.Х. Изменение цитокинового статуса при стабильной стенокардии напряжения // Медицинский вестник Юга России, 2016. № 1. С. 15-21. [Gordeeva E.K., Kade A.Kh. Changes in cytokine status with stable exertional angina. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii = Medical Bulletin of the South of Russia*, 2016, no. 1, pp. 15-21. (In Russ.)]
5. Закирова А.Н., Закирова Н.Э., Николаева И.Е., Хамидуллина Р.М., Фахретдинова Е.Р. Иммуновоспалительные реакции при стабильном течении ишемической болезни сердца // Медицинский вестник Башкортостана, 2012. Т. 7, № 4. С. 26-28. [Zakirova A.N., Zakirova N.E., Nikolaeva I.E., Khamidullina R.M., Fakhretdinova E.R. Immunoinflammatory reactions with a stable course of coronary heart disease. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Medical Bulletin of Bashkortostan*, 2012, Vol. 7, no. 4, pp. 26-28. (In Russ.)]
6. Калинина Н.М., Парцерняк С.А., Герцев А.В., Ищук В.Н. Влияние тяжести расстройств тревожно-депрессивного спектра на основные нейроиммунные звенья патогенеза у больных с сочетанной сердечно-сосудистой патологией // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях, 2009. № 3. С. 26-31. [Kalinina N.M., Partsernyak S.A., Gertsev A.V., Ischuk V.N. The effect of the severity of anxiety-depressive spectrum disorders on the main neuroimmune pathogenesis in patients with combined cardiovascular pathology. *Mediko-biologicheskie i sotsialno-psikhologicheskie problemy bezopasnosti*

*v chrezvychaynykh situatsiyakh = Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations*, 2009, no. 3, pp. 26-31. (In Russ.)]

7. Лишманов Ю.Б., Цибульников С.Ю., Нарыжная Н.В., Коробов М.В., Маслов Л.Н. Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции толерантности сердца к стрессорному повреждению // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2017. Т. 163, № 1. С. 32-35. [Lishmanov Yu.B., Tsibulnikov S.Yu., Naryzhnaya N.V., Korobov M.V., Maslov L.N. The role of the endogenous opioid system in regulating the tolerance of the heart to stress damage. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2017, Vol. 163, no. 1, pp. 32-35. (In Russ.)]

8. Маслов Л.Н., Мухомедзянов А.В., Лишманов Ю.Б. Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции функционального состояния сердца // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2016. Т. 102, № 9. С. 1017-1029. [Maslov L.N., Mukhomedzyanov A.V., Lishmanov Yu.B. The role of the endogenous opioid system in the regulation of the functional state of the heart. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*, 2016, Vol. 102, no. 9, pp. 1017-1029. (In Russ.)]

9. Семиглазова М.В., Краснов В.Н., Довженко Т.В., Лебедев А.В. Особенности диагностики и терапии тревожно-депрессивных расстройств у пациентов с инфарктом миокарда // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2012. Т. 112, № 11 (2). С. 91-95. [Semiglazova M.V., Krasnov V.N., Dovzhenko T.V., Lebedev A.V. Features of diagnosis and treatment of anxiety-depressive disorders in patients with myocardial infarction. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2012, Vol. 112, no. 11 (2), pp. 91-95. (In Russ.)]

10. Сергеева Е.Г. Провоспалительные цитокины у больных ишемической болезнью сердца в зависимости от степени распространенности атеросклероза и их динамика на фоне терапии медостатином // Регионарное кровообращение и микроциркуляция, 2002. Т. 1, № 4. С. 40-43. [Sergeeva E.G. Proinflammatory cytokines in patients with ischemic heart disease, depending on the prevalence of atherosclerosis and their dynamics during therapy with medostatin. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya = Regional Blood Circulation and Microcirculation*, 2002, Vol. 1, no. 4, pp. 40-43. (In Russ.)]

11. Смулевич А.Б., Сыркин А.Л., Дробизhev М.Ю., Иванов С.В. Психокardiология. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. 780 с. [Smulevich A.B., Syrkin A.L., Drobizhev M.Yu., Ivanov S.V. *Psihokardiologiya*. Moscow: Medical News Agency, 2005. 780 p.

12. Шамсиддинова А.С., Хужамбердиев М.А., Рахматиллаев Т.Б. Маркеры иммунного воспаления при остром коронарном синдроме // Медицина: вызовы сегодняшнего дня, 2013. С. 51-54. [Shamsiddinova A.S., Khuzhamberdiev M.A., Rakhmatillaev T.B. Markers of immune inflammation in acute coronary syndrome. *Meditsina: vyzovy segodnyashnego dnya = Medicine: Today's Challenges*, 2013, pp. 51-54. (In Russ.)]

13. Alwi I., Santoso T., Suyono S., Sutrisna B., Kresno S.B. The cut-off point of interleukin-6 level in acute coronary syndrome. *Acta Med. Indones*, 2007, Vol. 39, no. 4, pp. 174-178.

14. Kubryak O.V., Umriukhin A.E., Pertsov S.S., Sudakov S.K., Emeljanova I.N., Antipova O.S., Guseva A.L. Increased  $\beta$ -endorphin level in blood plasma as an indicator of positive response to depression treatment. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2012, Vol. 153, no. 5, pp. 758-760.

15. Li Y., Lefever M.R., Muthu D., Polt R., Bidlack J.M., Bilsky E.J. Opioid glycopeptide analgesics derived from endogenous enkephalins and endorphins. *Future Med. Chem.*, 2012, Vol. 4, no. 2, pp. 205-226.

#### Авторы:

**Герцев А.В.** — к.м.н., начальник терапевтического отделения 1469 ВМКГ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»; научно-исследовательская лаборатория клеточного и гуморального иммунитета ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

**Ищук В.Н.** — к.м.н., доцент кафедры курортологии и физиотерапии (с курсом медицинской реабилитации) ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»; научно-исследовательская лаборатория клеточного и гуморального иммунитета ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

**Закревский Ю.Н.** — д.м.н., начальник медицинской службы Объединенного стратегического командования «Север», Россия

#### Authors:

**Gertsev A.V.**, PhD (Medicine), Head, Therapeutic Department VMKG 1469, S. Kirov Military Medical Academy; Research Laboratory for Cellular and Humoral Immunity, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Ischuk V.N.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Balneology and Physical Therapy with a Course of Medical Rehabilitation, S. Kirov Military Medical Academy; Research Laboratory for Cellular and Humoral Immunity, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Zakrevsky Yu.N.**, PhD, MD (Medicine), Chief Medical Officer, "North" Joint Strategic Command, Russian Federation

Поступила 09.12.2018  
Отправлена на доработку 26.12.2018  
Принята к печати 08.04.2019

Received 09.12.2018  
Revision received 26.12.2018  
Accepted 08.04.2019

## **ЖЕЛЕЗИСТО-ЛИМФОИДНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В ТОЛЩЕ ЯЗЫКА И В СТЕНКАХ ГЛОТКИ У ЧЕЛОВЕКА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

**Олсуфьева А.В., Бодрова И.В., Васянина К.А., Олсуфьев С.С.**

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

**Резюме.** Статья имеет целью изучение железисто-лимфоидных взаимоотношений пищеварительного тракта в постнатальном онтогенезе и представляет особый интерес для клинической иммунологии. Макроскопическим и гистологическим методом нами исследованы слюнные железы, полученные от трупов 299 человек (язычные железы), начиная от новорожденных и до периода долгожительства, исследованы трупы представителей мужского и женского пола. Материал забирали в судебно-медицинских моргах Бюро СМЭ Департамента здравоохранения г. Москвы, что разрешено Постановлением Правительства РФ, Федеральный закон № 323, ст. 47, 4180-1, 355н. В фактический материал для исследования не включали случаи, когда при судебно-медицинском исследовании трупа выявляли патологические изменения пищеварительной системы. Микропрепараты (поперечные срезы) были окрашены гематоксилином-эозином и пикрофуксином по ван Гизону.

Малые слюнные железы, язычные и глоточные, располагаясь в толще языка и стенках глотки, выполняют важную эндокринную функцию — участвуют в обеспечении реакций местного иммунитета в ротовой полости. Множество публикаций посвящено регенеративным изменениям слизистой оболочки рта под действием секреторного иммуноглобулина А, который выполняет основную роль в регуляции местного иммунитета. В статье отражены важные аспекты возрастных изменений малых желез (язычных и глоточных). Характерная немногочисленность желез в детском возрасте обусловлена однотипностью питания в данном возрастном периоде, а снижение выработки секреторного иммуноглобулина А закономерно ведет к возникновению частых воспалительных процессов в полости рта и глотки. С возрастом устья желез расширяются и увеличивается их количество, что влечет за собой усиление местного иммунитета в ротовой полости и ротовой части глотки. Начиная с пожилого и старческого возраста наблюдаются инволютивные изменения, которые сопровождаются снижением выработки секреторного иммуноглобулина А и, соответственно, снижением показателей местного и гуморального иммунитета. Эти результаты полностью отражают топографические взаимоотношения желез с клетками лимфоидного ряда, и приведенные данные весьма актуальны для клинической иммунологии.

**Ключевые слова:** полость рта, местный иммунитет, лимфоидная ткань, слюнные железы, язык, глотка, секреторный IgA

### **Адрес для переписки:**

Олсуфьева Анна Викторовна  
ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный  
медицинский университет имени И.М. Сеченова»  
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский  
университет)  
125009, Россия, Москва, ул. Моховая, 11, стр. 10.  
Тел.: 8 (926) 396-52-24.  
E-mail: anna.anatom@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Olsufieva Anna V.  
First Moscow State I. Sechenov Medical University  
125009, Russian Federation, Moscow, Mokhovaya str., 11,  
bldg 10.  
Phone: 7 (926) 396-52-24.  
E-mail: anna.anatom@mail.ru

### **Образец цитирования:**

А.В. Олсуфьева, И.В. Бодрова, К.А. Васянина,  
С.С. Олсуфьев «Железисто-лимфоидные  
взаимоотношения в толще языка и в стенках глотки  
у человека в постнатальном онтогенезе»  
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5.  
С. 981-986. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-981-986  
© Олсуфьева А.В. и соавт., 2019

### **For citation:**

A.V. Olsufieva, I.V. Bodrova, K.A. Vasyanina, S.S. Olsufiev  
“Relationships between glandular and lymphoid tissues in  
human tongue and pharyngeal walls in postnatal ontogenesis”,  
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,  
2019, Vol. 21, no. 5, pp. 981-986.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-981-986  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-981-986

# RELATIONSHIPS BETWEEN GLANDULAR AND LYMPHOID TISSUES IN HUMAN TONGUE AND PHARYNGEAL WALLS IN POSTNATAL ONTOGENESIS

Olsufieva A.V., Bodrova I.V., Vasianina K.A., Olsufiev S.S.

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

**Abstract.** The article aims for description of glandular/lymphoid interactions within digestive tract over the postnatal ontogenesis which is of special importance for clinical immunology. We have examined lingual salivary glands obtained from 299 autopsies, using macroscopic and histological techniques. Their age ranged from newborns to senile individuals; both males and females were included. The biological material was sampled at the local pathology departments at the Moscow Bureau for Forensic and Medical Expertise, according to approval by Russian federal law (No. 323, art. 47, 4180-1, 355H). The cases with pathological changes of digestive system revealed upon autopsies were excluded from evaluation. The transverse tissue sections were stained with H&E and picro fuchsin by van Gieson technique.

The minor salivary lingual and pharyngeal glands, being located in the depth of tongue and pharyngeal walls, perform an important endocrine function, i.e they participate in oral immunity responses. A lot of publications concerns regenerative changes of oral mucosa caused by secretory IgA which plays a main role in regulation of local immunity. The article describes important age-dependent changes of both lingual and pharyngeal minor salivary glands. Typical scarcity of the glands in childhood may be caused by the uniform nutrition at this age, whereas decreased secretory IgA production, is generally leading to development of common inflammatory events in the oropharyngeal area. With increasing age, the glandular apertures become wider and more numerous, thus leading to increased local immunity in oral cavity and oropharynx. Sufficient involutional changes are observed in old and senile age cohorts, accompanied by diminished secretory IgA production, and, respectively, by decreased indexes of local and humoral immunity. These results are entirely reflecting topographical interrelations between the glands and lymphoid cells, and appropriate data are quite important for clinical immunology.

**Keywords:** oral cavity, local immunity, lymphoid tissue, salivary glands, tongue, pharynx, secretory IgA

## Введение

В последние десятилетия активно развивается такая отрасль клинической иммунологии, как иммунология полости рта. Столь стремительное развитие данного направления можно объяснить, в частности, появлением множества новых данных о противомикробной активности иммуноглобулина А в полости рта [5]. Как известно, его количество в слюне превышает все показатели в сравнении с другими иммуноглобулинами, что позволило задуматься о высокой значимости этого компонента слюны при обеспечении местного иммунитета. В полости рта слюна вырабатывается большими и малыми слюнными железами, при этом 30% всей вырабатываемой слюны приходится на работу малых слюнных желез [2]. В состав секрета, вырабатываемого этими органами, входит множество пищеварительных ферментов, антибактериальные компоненты, такие как лизоцим, а также иммунные клетки. Наличие всех этих компонентов обеспечивает скорейшее восстановление целостности слизистой оболочки в полости рта при ее травматизации и инфицировании. Среди факторов, определяющих резистентность слизистых в полости рта, важное зна-

чение имеет секреторный иммуноглобулин А [1]. Железистые структуры стенок полых внутренних органов играют значительную роль в процессах жизнедеятельности как в норме, так и при патологии [3]. В последние годы значительно расширились и углубились научные представления о морфофизиологии желез пищеварительного тракта, включая и малые железы, располагающиеся в его стенках, в нашем случае в стенках глотки [9]. Ранее физиологическая роль глоточных желез ограничивалась, по мнению многих авторов, защитой слизистой оболочки органа при помощи секрета от повреждений при прохождении воздушной струи и пищевого комка, сейчас данное положение пересматривается. В научной литературе глоточные железы рассматриваются с точки зрения их эндокринной активности [6] в плане участия их, так же как и язычных желез, в реализации механизмов местного иммунитета. Таким образом, секрет малых желез не только способствует скорейшей регенерации слизистой оболочки в полости рта, но и принимает участие в формировании «барьера» при проникновении антигенов в верхние дыхательные пути и начальные отделы пищеварительной системы [3, 5]. Хо-



рошо изучены железы тонкой и толстой кишки и их топографические взаимоотношения с лимфоидной тканью человека и животных в норме и в экспериментальных условиях [11].

Однако до настоящего времени морфология язычных желез и желез глотки человека, а также их взаимоотношения с лимфоидной тканью изучены недостаточно. В связи с этим данные об особенностях железисто-лимфоидных взаимоотношений в толще языка и верхних отделах глотки приобретают особую научно-практическую значимость. Актуальность этого вопроса определяется участием желез, наряду с иммунными структурами, в обеспечении механизмов гомеостаза, что доказано многочисленными публикациями о железисто-лимфоидных микротопографических взаимоотношениях в слизистой оболочке различных внутренних органов [4].

## Материалы и методы

Макроскопическим и гистологическим методом нами исследованы слюнные железы, полученные от трупов 299 человек (язычные железы), начиная от новорожденных и до периода долгожительства, исследованы трупы представителей мужского и женского пола. Материал забирали в судебно-медицинских моргах Бюро СМЭ Департамента здравоохранения г. Москвы, что разрешено Постановлением Правительства РФ, Федеральный закон № 323, ст. 47, 4180-1, 355н. В фактический материал для исследования не включали случаи, когда при судебно-медицинском исследовании трупа выявляли патологические изменения пищеварительной системы. Микропрепараты (поперечные срезы) были окрашены гематоксилином-эозином и пикрофуксином по ван Гизону.

### Собственные данные

Начальные части желез задней трети языка находятся в толще мускулатуры и рыхлой волокнистой соединительной ткани, они располагаются под язычной миндалиной (глубже ее) (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). Возле задних язычных желез и в их строме у людей пожилого, старческого возрастов и у долгожителей обычно определяется жировая ткань (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки). Взаимоотношения желез языка и его лимфоидной ткани аналогичны для всех отделов этого органа, но несколько изменяются на протяжении постнатального онтогенеза человека. У новорожденных в толще языка железисто-лимфоидные взаимоотношения минимальные. Возле выводных протоков желез и их начальных отделов в период новорожденности и у грудных детей клетки лимфоидного ряда (лимфоциты, макрофаги, плазматические клетки и др.) немногочисленные; в строме железы эти клетки выявляются также эпизодически и в небольшом количестве,

скопления клеток лимфоидного ряда в строме желез в эти возрастные периоды не наблюдается.

Лимфоидные узелки и диффузная лимфоидная ткань выявляются и в рыхлой волокнистой соединительной ткани, между мышечными волокнами, около начальных отделов желез всех трех групп (передних, средних и задних желез языка). Клетки лимфоидного ряда и их скопления, обычно неправильной формы, определяются и в толще рыхлой волокнистой соединительной ткани, разделяющей начальные части и их группы (дольки желез) (рис. 3, см. 2-ю стр. обложки). Эти клетки определяются как в строме железы возле исчерченных выводных протоков (рис. 4, см. 2-ю стр. обложки), так и возле общего выводного протока желез (рис. 5, см. 2-ю стр. обложки).

Эти клетки, преимущественно лимфоциты, в виде ободка из 3-5 рядов окружают выводные протоки на всем их протяжении. Возле задней части общего выводного протока (его устья) определяются лимфоидные узелки с центром размножения и без него.

В старческом возрасте и у долгожителей возле общего выводного протока железы и выводных протоков 1-го порядка лимфоидные узелки определяются редко (не более чем на 5-7% микропрепаратов) и в малом количестве, центры размножения у этих лимфоидных узелков всегда отсутствуют. Диффузная лимфоидная ткань возле всех желез языка в эти возрастные периоды также не выражена. В строме самого начального отдела язычных желез в эти возрастные периоды клетки лимфоидного ряда малочисленные (рис. 6, см. 2-ю стр. обложки).

По данным Усмановой А.М. (2003), при изучении глоточных желез в том же аспекте и определении их топографических взаимоотношений с лимфоидной тканью глотки были выявлены следующие последовательности в их локализации. На протяжении всего периода новорожденности и у грудных детей лимфоидная ткань всегда определяется как в собственной пластинке слизистой оболочки, так и в подслизистой основе этого органа. Вместе с тем, несмотря на постоянное наличие желез в этом возрасте, лимфоидные клетки возле выводных протоков и начальных отделов немногочисленны. В строме глоточных желез у новорожденных и грудных детей лимфоидные клетки единичные. Они постоянно выделяются возле желез лишь начиная с подросткового возраста. После юношеского возраста можно видеть выраженные железисто-лимфоидные ассоциации. В юношеском, зрелом и пожилом возрастах клетки лимфоидного ряда имеются постоянно и возле начальных отделов железы, образуя скопления неправильной формы в строме самих начальных отделов. Лимфоциты также можно видеть между glanduloцитами начальных частей.

В старческом возрасте, а также в период долгожительства лимфоидные узелки в стенках глотки не встречаются. Возле выводных протоков желез и в строме в эти возрастные периоды лимфоидные клетки немногочисленные.

## Обсуждение и выводы

На протяжении постнатального онтогенеза топографические взаимоотношения язычных желез и лимфоидной ткани в толще языка имеют возрастные особенности. У новорожденных клетки лимфоидного ряда относительно немногочисленны возле желез. В подростковом, зрелом и пожилом возрасте клетки лимфоидного ряда и их скопления постоянные около начальных отделов желез, в их строме и возле выводных протоков. В старческом возрасте и у долгожителей клетки лимфоидного ряда рядом с язычными железами имеются непостоянно и в небольшом количестве. Аналогичные возрастные особенности железисто-лимфоидных взаимоотношений ранее были описаны в стенках пищевода [12], гортани [7] и некоторых других органов. Вероятно, относительно небольшое содержание осуществляющих иммунный надзор клеток лимфоидного ряда, располагающихся возле язычных желез в первые месяцы жизни, может быть связано с однотипностью питания в этом возрасте (его режима, набора пищевых продуктов и др.) по сравнению с другими возрастными периодами.

Уменьшение количества лимфоидной ткани в слизистой оболочке языка в старческом возрасте является проявлением общей редукции лимфоидной ткани в эти возрастные периоды. Усмановой А.М. [10] было также выявлено, что железисто-лимфоидные взаимоотношения в стенках глотки существенно варьируют на протяжении постнатального онтогенеза человека. Показано, что у новорожденных и в грудном возрасте, несмотря на существенное развитие лимфоидных структур, лимфоидные образования крайне редко выявляются в непосредственной близости от слюнных желез. Лишь в обла-

сти слюнной и трубной миндалин у детей этих возрастных групп лимфоидные клетки имеются почти постоянно. Немногочисленность иммунных клеток возле слюнных желез, так же как и возле язычных слюнных желез, обусловлена, вероятно, опять же однотипностью питания в данном возрастном периоде. В юношеском, зрелом и старческом возрасте железисто-лимфоидные взаимоотношения наиболее ярко выражены как у язычных, так и у слюнных желез. Отдельные иммуноциты выявляются и в эпителии начальных частей желез, распределяясь при этом между секреторными клетками. Лимфоидные клетки всегда окружают проксимальные отделы протокового аппарата железы. Вероятно, такая микротопография может быть объяснена непосредственной ролью этих клеток в продукции иммуноглобулинов А, которые выделяются через выводной проток желез вместе с ее секретом на поверхность слизистой оболочки [8]. По мнению Усмановой А.М., уменьшение выраженности железисто-лимфоидных взаимоотношений в стенках глотки у людей старческого возраста и в период долгожительства может быть связано как с общей инволюцией лимфоидной ткани в данных возрастных периодах, так и с общими особенностями образа жизни и питания. Таким образом, пищеварительная система занимает особое место в формировании общего и местного иммунитета [13].

Именно такими топографическими взаимоотношениями малых желез и клеток лимфоидного ряда и их скоплений обусловлено наличие в секрете этих органов лимфоцитов, которые, наравне с секреторным иммуноглобулином А, обеспечивают реакции местного иммунитета в полости рта. В связи с этим в клинической иммунологической практике также необходимы фундаментальные знания о нормальной морфологии малых желез для более точного понимания механизмов развития процессов, связанных с обеспечением местного иммунитета в полости рта и ротовой части глотки.

## Список литературы / References

1. Базарный В.В., Веневская Е.А., Попова И.Г., Косарева О.В., Мандра Ю.В. Оценка секреторного иммунитета при герпетическом поражении полости рта // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. № 7. С. 62-63. [Bazarnyi V.V., Venevskaya E.A., Popova I.G., Kosareva O.V., Mandra Yu.V. Evaluation of secretory immunity under herpetic lesions of the oral cavity. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, no. 7, pp. 62-63. (In Russ.)]
2. Боровский Е.В., Леус П.А. Кариес зубов. М.: Медицина, 1979. 342 с. [Borovsky E.V., Leus P.A. Dental caries]. Moscow: Medicine, 1979. 342 p.
3. Ибодов С.Т., Никитюк Д.Б. Макро-микроскопические характеристики железистого аппарата двенадцатиперстной кишки человека // Вестник Авиценны, 2011. № 1 (46). С. 102-105. [Ibodov S.T., Nikityuk D.B. Macro-microscopic features of glandular apparatus of human's duodenum. *Vestnik Avitsenny = Bulletin of Avicenna*, 2011, no. 1 (46), pp. 102-105. (In Russ.)]

4. Калинина Н.М., Хмельницкая Н.М., Тырнова Е.В., Воробьев К.В., Алешина Г.М., Кокряков В.Н. Иммунологические механизмы хронического воспаления слизистой оболочки полости носа // Медицинская иммунология, 1999. Т. 1, № 3-4. С. 37. [Kalinina N.M., Khmel'nitskaya N.M., Tyrnova E.V., Vorobyev K.V., Alezhina G.M., Kokryakov V.N. Immunological mechanisms of chronic inflammation of the nasal mucosa. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 1999, Vol. 1, no. 3-4, p. 37. (In Russ.)]
5. Караев З.О., Гасанова Ф.М. Местный гуморальный иммунитет у больных кандидозом слизистых оболочек полости рта и кандидоносителей // Проблемы медицинской микологии, 2008. Т. 10, № 3. С. 9-11. [Karaev Z.O., Gasanova F.M. The local humoral immunity in patients with candidiasis of mucous membranes of the oral cavity and *Candida* carriers. *Problemy meditsinskoy mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2008, Vol. 10, no. 3, pp. 9-11. (In Russ.)]
6. Ключкова С.В., Алексеева Н.Т., Никитюк Д.Б., Кварацхелия А.Г. Макро-микроскопическая структурная характеристика желез глотки человека // Журнал анатомии и гистопатологии, 2016. Т. 5, № 3. С. 35-37. [Klochkova S.V., Alekseeva N.T., Nikityuk D.B., Kvaratskhelia A.G. Macro-microscopic structural characteristics of the pharyngeal glands of a person. *Zhurnal anatomii i gistopatologii = Journal of Anatomy and Histopathology*, 2016, Vol. 5, no. 3, pp. 35-37. (In Russ.)]
7. Плявинь Л.А. Особенности топографии скоплений лимфоидной ткани в стенках пищевода человека в разные возрастные периоды. В кн.: Тез. докл. 14-й Всесоюз. конф. по физиологии пищеварения и всасывания. Тернополь, 1986. С. 22-23. [Plyavin L.A. Peculiarities of the topography of the accumulations of lymphoid tissue in the walls of the esophagus of a person in different age periods. In: Abstracts of the 14<sup>th</sup> All-Union Conference on physiology of digestion and absorption]. Ternopol, 1986, pp. 22-23.
8. Сапин М.Р., Никитюк Д.Б. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. М.: Джангар, 2000. 184 с. [Sapin M.R., Nikityuk D.B. Immune system, stress and immunodeficiency]. Moscow: Dzhangar, 2000. 184 p.
9. Сапин М.Р., Николенко В.Н., Чава С.В., Алексеева Н.Т., Никитюк Д.Б. Вопросы классификации и морфогенез малых желез стенок полых внутренних органов // Журнал анатомии и гистопатологии, 2013. Т. 2, № 1. С. 9-17. [Sapin M.R., Nikolenko V.N., Chava S.V., Alekseeva N.T., Nikityuk D.B. Classification and morphogenesis of small glands of the walls of the internal organs. *Zhurnal anatomii i gistopatologii = Journal of Anatomy and Histopathology*, 2013, Vol. 2, no. 1, pp. 9-17. (In Russ.)]
10. Усманова А.М. К микроанатомической характеристике желез глотки человека // Медико-биологические проблемы Приднестровья: матер. науч.-практич. конф. Тирасполь, 2002. С. 35. [Usmanova A.M. To microanatomic characteristics of the glands of the human pharynx / Medical and biological problems of Transnistria: Materials of the scientific-practical conference]. Tiraspol, 2002, p. 35.
11. Четвертков В.С., Никитюк Д.Б., Швецов Э.В., Чава С.В. Структурные характеристики железистого аппарата двенадцатиперстной кишки мышей после облучения // Астраханский медицинский журнал, 2012. Т. 7, № 4. С. 266-270. [Chetvertkov V.S., Nikityuk D.B., Shvetsov E.V., Chava S.V. Structure characteristics of the duodenum of mice after irradiation. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal = Astrakhan Medical Journal*, 2012, Vol. 7, no. 4, pp. 266-270. (In Russ.)]
12. Шадлинский В.Б., Аллахвердиев М.Г., Мовсумов Н.Т., Гусейнова Г.А., Исаев А.Б., Хыдыров Э.Е., Гусейнов Б.М. Макромикроскопическая и микроанатомическая характеристика лимфоидных образований некоторых внутренних органов в постнатальном онтогенезе // Аллергология и иммунология, 2016. Т. 17, № 1. С. 45. [Shadlinsky V.B., Allahverdiev M.G., Movsumov N.T., Guseynova G.A., Isaev A.B., Khydyrov Ye.E., Guseynov B.M. Macromicroscopic and microanatomic characterization of lymphoid formations of some internal organs in postnatal ontogenesis. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2016, Vol. 17, no. 1, p. 45. (In Russ.)]
13. Щеплягина Л.А., Круглова И.В. Местный иммунитет: педиатру на заметку // Поликлиника, 2011. № 6. С. 100-101. [Shalagina L.A., Kruglova I.V. Local immunity: pediatrician note. *Poliklinika = Polyclinic*, 2011, no. 6, pp. 100-101. (In Russ.)]

---

**Авторы:**

**Олсуфьева А.В.** — к.м.н., старший преподаватель кафедры анатомии человека ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Бодрова И.В.** — д.м.н., доцент кафедры лучевой диагностики и лучевой терапии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

---

**Authors:**

**Olsufieva A.V.**, PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Anatomy, First Moscow State I. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

**Bodrova I.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Radiation Diagnostics and Radiation Therapy, First Moscow State I. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

**Васянина К.А.** — к.м.н., старший преподаватель кафедры анатомии человека ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Vasianina K.A.**, PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Anatomy, First Moscow State I. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

**Олсуфьев С.С.** — студент 1 курса фармацевтического факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Olsufiev S.S.**, Student, Faculty of Pharmacy, First Moscow State I. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 25.09.2018  
Отправлена на доработку 17.10.2018  
Принята к печати 29.10.2018

---

Received 25.09.2018  
Revision received 17.10.2018  
Accepted 29.10.2018

## ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ МЫШИ, РАСПОЗНАЮЩИХ ПЕРВИЧНЫЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА КРОЛИКА К ПРОИЗВОДНЫМ МОРФИНА

Трофимов А.В.<sup>1</sup>, Ищенко А.М.<sup>1</sup>, Рак А.Я.<sup>1,2</sup>, Сергеева В.Е.<sup>1</sup>,  
Симбирцев А.С.<sup>1</sup>, Гамалея Н.Б.<sup>3</sup>, Берзина А.Г.<sup>3</sup>, Станкова Н.В.<sup>4</sup>,  
Ульянова Л.И.<sup>3</sup>, Климова Т.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>4</sup> ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Антиидиотипические антитела (Ab2), согласно сетевой теории Ерне, представляют собой иммуноглобулины второго поколения, которые вырабатываются на идиотип антитела к определенному антигену. Несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию свойств этих белков, их роль в регуляции иммунной системы организма до конца не известна. Она может заключаться в поддержании или блокировании минимального иммунного ответа на антиген. Исследование Ab2 имеет большую практическую и научную значимость. Особые свойства Ab2, а именно способность частично воспроизводить структуру первичного антигена и при иммунизации индуцировать появление третичных антител, которые, подобно антителам первого поколения, связываются с антигеном, нашли применение в создании на их основе вакцин, в частности для лечения опухолей. В свете наличия ряда ограничений на проведение исследований, связанных с психоактивными веществами, перспективной представляется также разработка на основе Ab2 вакцин против наркотической зависимости. В литературе описаны антиидиотипические антитела, полученные с этой целью, обладающие кокаин-подобной структурой. В данной работе были получены мышинные моноклональные антиидиотипические антитела (mAb2), имитирующие структуру различных производных морфина. В качестве первичных антител для иммунизации были использованы выделенные методом аффинной хроматографии кроличьи поликлональные антитела к 6-гемисукцинильному производному морфина, конъюгированному с бычьим сывороточным альбумином. В результате слияния лимфоцитов им-

### Адрес для переписки:

Трофимов Александр Викторович  
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»  
ФМБА России  
197110, Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7.  
Тел.: 8 (904) 632-07-27.  
E-mail: a.v.trofimov@hpb.spb.ru

### Address for correspondence:

Trofimov Alexander V.  
State Research Institute of Highly Pure Biopreparations,  
Federal Medical-Biological Agency  
197110, Russian Federation, St. Petersburg,  
Pudzhskaya str., 7.  
Phone: 7 (904) 632-07-27.  
E-mail: a.v.trofimov@hpb.spb.ru

### Образец цитирования:

А.В. Трофимов, А.М. Ищенко, А.Я. Рак, В.Е. Сергеева,  
А.С. Симбирцев, Н.Б. Гамалея, А.Г. Берзина,  
Н.В. Станкова, Л.И. Ульянова, Т.А. Климова  
«Получение и свойства антиидиотипических  
моноклональных антител мыши, распознающих  
первичные поликлональные антитела кролика  
к производным морфина» // Медицинская иммунология,  
2019. Т. 21, № 5. С. 987-996.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-987-996

© Трофимов А.В. и соавт., 2019

### For citation:

A.V. Trofimov, A.M. Ischenko, A.Ya. Rak, V.E. Sergeeva,  
A.S. Simbirtsev, N.B. Gamaleya, A.G. Berzina, N.V. Stankova,  
L.I. Ulyanova, T.A. Klimova "Preparation and properties  
of murine anti-idiotypic monoclonal antibodies recognizing  
primary rabbit polyclonal antibodies against morphine  
derivatives", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 987-996.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-987-996

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-987-996

мунизированных мышей с клетками миеломы мыши линии Sp2/0 по методике Мильштейна–Кёлера были получены четыре гибридомных клона. После наработки в животных продуцируемые клетками гибридом mAb2 были аффинно очищены. Нами исследованы физико-химические и антигенные свойства выделенных антител. Показано, что полученные mAb2 отличаются по иммунологической специфичности, в различной степени конкурируя с производными морфина за связывание с антителами первого поколения. Проверена возможность использования полученных mAb2 в качестве аналогов антигенов при постановке твердофазного иммуноферментного анализа с целью определения титра первичных антител к морфину в сыворотках крови лабораторных животных, иммунизированных производными морфина. На основе полученных антиидиотипических антител предполагается разработка тест-систем по определению антител, специфичных к опиатам, в сыворотке крови людей при проведении специфической вакцинации с лечебной или профилактической целью без применения в анализе наркотических препаратов как антигенов, иммобилизованных на твердой фазе.

*Ключевые слова:* антиидиотипические антитела, антитела, иммуноферментный анализ, моноклональные антитела, морфин, поликлональные антитела

## PREPARATION AND PROPERTIES OF MURINE ANTI-IDIOTYPIC MONOCLONAL ANTIBODIES RECOGNIZING PRIMARY RABBIT POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST MORPHINE DERIVATIVES

Trofimov A.V.<sup>a</sup>, Ischenko A.M.<sup>a</sup>, Rak A.Ya.<sup>a, b</sup>, Sergeeva V.E.<sup>a</sup>, Simbirtsev A.S.<sup>a</sup>, Gamaleya N.B.<sup>c</sup>, Berzina A.G.<sup>c</sup>, Stankova N.V.<sup>d</sup>, Ulyanova L.I.<sup>c</sup>, Klimova T.A.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> National Center of Biomedical Technologies, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Anti-idiotypic antibodies (Ab2), according to the network theory of Jerne, are second-generation immunoglobulins that are produced against the idotype of an antibody to a specific antigen. Despite the large number of works devoted to the study of the properties of these proteins, their role in the regulation of the immune system is not fully known. It may consist in maintaining or blocking a minimal immune response to the antigen. The study of Ab2 is of great practical and scientific importance. The special properties of Ab2, namely, the ability to partially reproduce the structure of the primary antigen and, upon immunization, induce the appearance of tertiary antibodies, which, like first-generation antibodies, can bind to the antigen, have found application in the development of Ab2-based vaccines, in particular, for the treatment of tumors. In view of the presence of a number of limitations on research related to psychoactive substances, the development of Ab2-based vaccines against drug addiction also seems promising. To example, anti-idiotypic antibodies obtained for this purpose possessing a cocaine-like structure are described in the literature. In this work, murine monoclonal anti-idiotypic antibodies (mAb2) mimicking the structure of various morphine derivatives were obtained. Rabbit polyclonal antibodies to the 6-hemisuccinyl derivative of morphine conjugated with bovine serum albumin isolated by affinity chromatography were used as primary antibodies for immunization. Four hybridoma clones were obtained as a result of the fusion of immunized mice lymphocytes with mouse Sp2/0 mouse myeloma cells by the Milstein-Köhler method. After growth in animals, mAb2 produced by hybridoma cells were affinity purified. We investigated the physicochemical and antigenic properties of the isolated antibodies. It was shown that the obtained mAb2 differ in immunological specificity, competing in different degree with morphine

derivatives for binding to first-generation antibodies. We tested the possibility of using the obtained mAb2 as antigen analogues in the solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay to determine the titer of primary antibodies against morphine in the blood serum of laboratory animals immunized with morphine derivatives. Based on the obtained anti-idiotypic antibodies, it is proposed to develop test systems to determine the serum opiate-specific antibodies in people after specific vaccination for therapeutic or prophylactic purposes to avoid the use of drugs as antigens immobilized on the solid phase in the analysis.

*Keywords: antibodies, anti-idiotypic antibodies, ELISA, monoclonal antibodies, morphine, polyclonal antibodies*

## Введение

Антиидиотипические антитела (вторичные — Ab2), согласно сетевой теории Ерне, представляют собой антитела, которые вырабатываются на идиотип — антигенные детерминанты активных центров антитела (Ab1) к определенному антигену (Ag) [9]. Антиидиотипические антитела, способные имитировать специфические антигены при активной иммунизации, индуцируют в организме иммунизированного животного гуморальный и клеточный ответ на этот специфический антиген. В настоящее время эти свойства Ab2 нашли применение в создании на их основе вакцин, в частности для лечения опухолей [6, 7, 8].

Известно, что Ab2, являющиеся «внутренним образом» молекул кокаина, при вакцинации мышей способны индуцировать появление в их крови третичных антител (Ab3), способных аналогично Ab1 задерживать вводимый кокаин в кровяном русле и значимо снижать концентрацию кокаина в мозге на 36% [12]. Было показано также, что иммунизация крыс антиидиотипическими Ab2 к производным морфина способствует снижению у животных признаков зависимости [3, 4].

Ab2 можно также использовать в перспективе в качестве имитаторов некоторых веществ при создании диагностических тест-систем в производственных масштабах. В частности, они могут найти применение в качестве иммунодиагностических реагентов при детекции антител к наркотикам в сыворотке крови людей, поскольку применение для этих целей самих наркотических веществ нежелательно для практики в силу ряда ограничений.

**Целью настоящего исследования** было получение и изучение свойств антиидиотипических антител к поликлональным антителам кролика, иммунизированного конъюгатом 6-гемисукцинильного производного морфина с бычьим сывороточным альбумином (GSM-BSA).

## Материалы и методы

Первичные антитела Ab1 к 6-гемисукцинильному производному морфина (GSM), конъюги-

рованному с бычьим сывороточным альбумином (BSA), были получены в результате иммунизации кролика препаратом GSM-BSA по схеме, описанной ранее в работе [1]. Поликлональные антитела к GSM выделяли с помощью аффинной хроматографии на иммуносорбенте, приготовленном на основе цианбром-активированной сефарозы 4B (Sigma-Aldrich) по модифицированной методике [5]. В качестве лиганда использовался конъюгат производного морфина с лизоцимом.

Ab1 к трем производным морфина были также получены ранее в результате иммунизации мини-свиней светлогорской популяции [2]. Антиидиотипические моноклональные антитела к поликлональным Ab1 кролика, обозначенным нами как Ra-GSM, получали по следующей методике. Мышей линии Balb/c (ФГУП ПЛЖ «Рапполово», Россия) иммунизировали антигеном Ra-GSM, эмульгированным в полном адъюванте Фрейнда (ПАФ), в дозе 10 мкг на мышь, в подожженный апоневроз задних конечностей. Через 23 дня животных повторно иммунизировали той же дозой антигена в неполном адъюванте Фрейнда. На 30-й день после второй иммунизации животным вводили внутривенно 5 мкг антигена в физиологическом растворе. На четвертый день после инъекции животных умерщвляли цервикальной дислокацией и выделяли спленоциты и лимфоциты паховых и брюшных лимфоузлов. Полученные клетки смешивали с клетками миеломы мыши линии SP 2/0 в соотношении 2:1. Гибридизацию клеток проводили 50% раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 1500 дальтон в течение 1,5 мин с последующим 4-кратным добавлением через 1 мин среды RPMI-1640 (Sigma, США) в объеме, равном объему раствора ПЭГ. После слияния клетки дважды отмывали культуральной средой и высевали в 96-луночные культуральные планшеты с суточными перитонеальными макрофагами ( $5 \times 10^3$  клеток на лунку) из расчета  $5 \times 10^4$  клеток на лунку по миеломе. Селекцию гибридов проводили в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma, США), содержащей:

$10^{-4}$  М гипоксантина,  $4 \times 10^{-7}$  М аминоптерина и  $1,6 \times 10^{-5}$  М тимидина [11].

В таблице 1 представлена схема проведения иммуноферментного анализа (ИФА) для отбора клонов, продуцирующих mAb2.

Первичный отбор позитивных клонов проводили по связыванию моноклональных антител (mAb2), секретируемых гибридами, с антигенами Ra-GSM и Ra-IgG в ИФА. Для этого в лунки полистирольных планшетов Corning (Sigma, США) адсорбировали Ra-GSM или Ra-IgG в 20 мМ боратном буфере с pH 8,0 (содержащем 0,15 М NaCl) в концентрации 1,5 мкг/мл в течение 20 часов во влажной камере при комнатной температуре. По окончании сорбции планшеты отмывали промывочным буфером (20 мМ боратный буфер с pH 8,0, содержащий 0,15 М NaCl и 0,05% Tween-20). Затем в каждую лунку вносили по 100 мкл промывочного буфера, содержащего 1 мг/мл БСА, и по 50 мкл культуральных сред, содержащих mAb2. Планшеты инкубировали в течение 1 часа на шейкере при 37 °С. По окончании инкубации проводили отмывку не связавшихся с антигеном антител промывочным буфером и вносили в лунки раствор иммуноглобулинов козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Германия) согласно приложенной инструкции. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37 °С на шейкере, после чего тщательно отмывали и проводили окрашивание с помощью раство-

ра субстрата тетраметилбензидина (ХЕМА, Россия). Культуральные среды клонов, показавшие специфическое связывание только с Ra-GSM, повторно тестировались в конкурентном анализе по ингибированию связывания антиидиотипических mAb2 с Ra-GSM в присутствии конкуратора GSM-лизоцим.

По результатам первичного скрининга было отобрано 130 гибридных клонов, из которых только 4 клон (обозначены как АИ-1, АИ-2, АИ-3 и АИ-4) продуцировали специфические антитела, связывание которых с Ra-GSM угнеталось GSM-лизоцимом. Культуры были трехкратно реклонированы для отбора стабильных клонов и криоконсервированы. Определение изотипа mAb2 проводили с помощью набора ISO-2 (Sigma-Aldrich, Германия) согласно инструкции, предложенной производителем.

Для наработки mAb2 гибридомы культивировали в перитонеальной полости сингенных мышей (Balb/c), доза клеток при перевивке составляла  $2-3 \times 10^6$  клеток на мышь. На 14-20-й день мышей умерщвляли цервикальной дислокацией и отбирали асцитную жидкость, из которой выделяли mAb2 методом аффинной хроматографии на иммуносорбенте MabSelect-сефароза (General Electrics, США) согласно инструкции, предложенной производителем.

Для изучения свойств полученных mAb2 на их основе были приготовлены иммуносорбенты с использованием цианбром-активированной се-

**ТАБЛИЦА 1. СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОТБОРА ПРОДУЦЕНТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ (mAb2)**

TABLE 1. SCHEME OF THE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE SELECTION OF MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES (mAb2) PRODUCERS

| 1 стадия ИФА<br>1 <sup>st</sup> stage of ELISA<br>Сорбция антигена<br>Antigen sorption | 2 стадия ИФА<br>2 <sup>nd</sup> stage of ELISA<br>Добавление в лунки<br>Adding to the wells | 3 стадия ИФА<br>3 <sup>rd</sup> stage of ELISA<br>Добавление ферментной метки<br>Enzyme label adding | Результат реакции,<br>оцениваемый по ОП450<br>Reaction result,<br>as estimated by OD450 |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Ra-GSM                                                                                 | КС**<br>СМ**                                                                                | ГАМ-Пх****<br>ГАМ-Рх****                                                                             | +                                                                                       |
| Ra-IgG*                                                                                | КС**<br>СМ**                                                                                | ГАМ-Пх<br>ГАМ-Рх                                                                                     | —                                                                                       |
| Ra-GSM                                                                                 | КС + GSM-лизоцим***<br>СМ + GSM-lysozyme***                                                 | ГАМ-Пх<br>ГАМ-Рх                                                                                     | —                                                                                       |

Примечание. \* Ra-IgG – IgG-фракция иммуноглобулинов неиммунизированного кролика; \*\* КС – культуральная среда, содержащая mAb2; \*\*\* GSM-лизоцим – конъюгат 6-гемисукцинильного производного морфина с лизоцимом; \*\*\*\* ГАМ-Пх – антитела козы к IgG мыши, меченные пероксидазой хрена.

Note. \* Ra-IgG, IgG-fraction of non-immunized rabbit immunoglobulins; \*\* CM, culture medium containing mAb2; \*\*\* GSM-lysozyme, conjugate of morphine 6-hemisuccinyl derivative with lysozyme; \*\*\*\* GAM-Px, goat antibodies against mouse IgG, labeled with horseradish peroxidase.



**ТАБЛИЦА 2. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ  
(mAb2)**

TABLE 2. IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF MONOCLONAL  
ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES (mAb2)

| Наименование<br>клона<br>Clone name | Изотип<br>Isotype | Подавление<br>связывания mAb2<br>с Ra-GSM<br>Suppression of mAb2<br>binding with Ra-GSM |     |     |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
|                                     |                   | конкураторы<br>competitors                                                              |     |     |
|                                     |                   | GSM                                                                                     | KMM | FAM |
| <b>АИ-1</b><br>AI-1                 | IgG1              | 80%                                                                                     | 20% | 64% |
| <b>АИ-2</b><br>AI-2                 | IgG2a             | 97%                                                                                     | 96% | 96% |
| <b>АИ-3</b><br>AI-3                 | IgG2a             | 13%                                                                                     | 14% | 18% |
| <b>АИ-4</b><br>AI-4                 | IgG1              | 67%                                                                                     | 15% | 56% |

**ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИЯ БЕЛКА В ЭЛЮАТАХ  
СЫВОРОТКИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ  
В РЕЗУЛЬТАТЕ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОАФФИННОЙ  
ХРОМАТОГРАФИИ**

TABLE 3. PROTEIN CONCENTRATION IN THE ELUATES OF  
THE BLOOD SERUM OF ANIMALS OBTAINED AS A RESULT  
OF IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY

| Сорбенты<br>Sorbents                   | Концентрация в элюатах<br>сыывороток, мкг/мл<br>Concentration in blood serum<br>eluates, µg/ml |        |       |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------|
|                                        | Ra                                                                                             | Ra-GSM | Pig-M |
| <b>АИ-1-сефароза</b><br>AI-1-sepharose | < 5                                                                                            | 140    | 144   |
| <b>АИ-2-сефароза</b><br>AI-2-sepharose | < 5                                                                                            | 137    | 136   |
| <b>АИ-3-сефароза</b><br>AI-3-sepharose | < 5                                                                                            | 141    | 135   |
| <b>АИ-4-сефароза</b><br>AI-4-sepharose | < 5                                                                                            | 122    | 134   |
| <b>Ig-сефароза</b><br>Ig-sepharose     | < 5                                                                                            | < 5    | < 5   |

**ТАБЛИЦА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ АНТИТЕЛ КРОЛИКА, ИММУНИЗИРОВАННОГО GSM-BSA,  
ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОСОРБЕНТОВ АИ-1- И АИ-4-СЕФАРОЗА**

TABLE 4. DETERMINATION OF GSM-BSA IMMUNIZED RABBIT ANTIBODIES, OBTAINED USING AI-1- AND AI-4-SEPHAROSE  
IMMUNOSORBENTS

| Ra-АИ,<br>мкг/мл<br>Ra-AI,<br>µg/ml | Оптическая плотность (ОП) при 450 нм<br>Optical density (OD), 450 nm    |                    |                             |                    |                             |                    |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|
|                                     | Антиген, сорбированный на твердой фазе<br>Antigen sorbed on solid phase |                    |                             |                    |                             |                    |
|                                     | КММ-лизоцим<br>KMM-lisozyme                                             |                    | GSM-лизоцим<br>GSM-lisozyme |                    | FAM-лизоцим<br>FAM-lisozyme |                    |
|                                     | Ra АИ-1<br>Ra AI-1                                                      | Ra АИ-4<br>Ra AI-4 | Ra АИ-1<br>Ra AI-1          | Ra АИ-4<br>Ra AI-4 | Ra АИ-1<br>Ra AI-1          | Ra АИ-4<br>Ra AI-4 |
| 0                                   | 0,035                                                                   | 0,033              | 0,034                       | 0,030              | 0,026                       | 0,03               |
| 0,01                                | 0,077                                                                   | 0,065              | 0,095                       | 0,078              | 0,041                       | 0,034              |
| 0,1                                 | 0,42                                                                    | 0,449              | 0,450                       | 0,476              | 0,130                       | 0,074              |
| 1                                   | 2,151                                                                   | 1,964              | 2,239                       | 1,932              | 0,793                       | 0,299              |

фарозы 4В по методике [5] и конъюгат биотина с белком сыворотки мини-свиньи, иммунизированной КММ-, GSM- и FAM-БСА, который был элюирован с сорбента АИ-1-сефароза [10].

Для определения специфичности полученных mAb2 были использованы сыворотки: неиммунного кролика (Ra); кролика (Ra-GSM), иммунизированного GSM-BSA и мини-свиньи (Pig-M), иммунизированной одновременно конъюгатами трех производных морфина: 6-гемисукциниль-

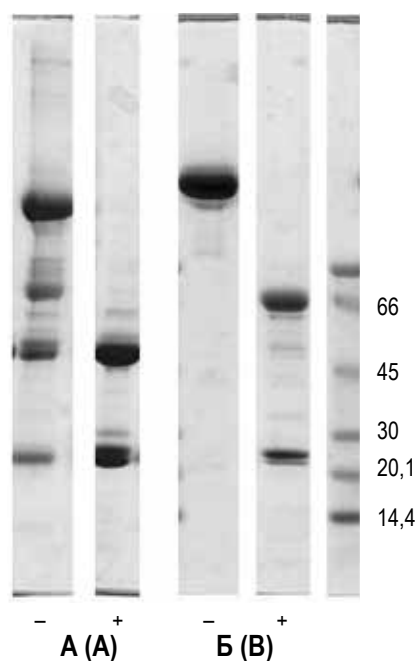
ного (GSM), 3-О-карбоксиметильного (КММ) и 2-р-карбокси-фенилазометильного (FAM) с BSA [2].

Через колонку с сорбированными на сефарозе АИ-1, 2, 3 и 4 (АИ-сефароза) пропускали однократно 1,0 мл сыворотки, в ряде экспериментов трижды. В качестве контроля использовали сорбированные на сефарозе мышинные иммуноглобулины (Ig-сефароза). После нанесения образца колонку отмывали фосфатно-солевым буфером

**ТАБЛИЦА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ БИОТИНИЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ЭЛЮАТА СЫВОРОТКИ МИНИ-СВИНЬИ, ИММУНИЗИРОВАННОЙ КММ-BSA, GSM-BSA И FAM-BSA, ПОЛУЧЕННОГО С СОРБЕНТА АИ-1-СЕФАРОЗА**

**TABLE 5. DETERMINATION OF THE SPECIFICITY OF KMM-BSA, GSM-BSA, AND FAM-BSA IMMUNIZED MINI-PIG BIOTINYLATED PROTEINS OF SERUM ELUATE OBTAINED FROM AI-1-SEPHAROSE SORBENT**

| Pig-M-биотин,<br>нг/мл<br>Pig-M-biotine,<br>ng/ml | Оптическая плотность (ОП) при 450 нм<br>Optical density (OD), 450 nm    |                             |                             |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                                                   | Антиген, сорбированный на твердой фазе<br>Antigen sorbed on solid phase |                             |                             |
|                                                   | КММ-лизоцим<br>KMM-lisozyme                                             | GSM-лизоцим<br>GSM-lisozyme | FAM-лизоцим<br>FAM-lisozyme |
| 0                                                 | 0,016                                                                   | 0,018                       | 0,014                       |
| 4                                                 | 0,035                                                                   | 0,099                       | 0,0365                      |
| 20                                                | 0,0845                                                                  | 0,263                       | 0,094                       |
| 100                                               | 0,139                                                                   | 0,826                       | 0,1875                      |
| 500                                               | 0,465                                                                   | 2,0505                      | 0,583                       |

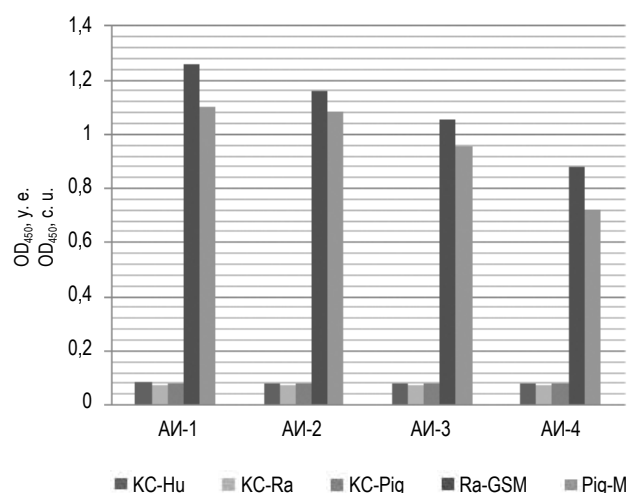


**Рисунок 1. Электрофореграмма препаратов первичных антител к производным морфина, выделенных из сывороток кролика и мини-свиньи с помощью иммуноаффинной хроматографии**

Примечание. А – элюат сыворотки Ra-GSM; В – элюат сыворотки Pig-M. + – восстановленные условия; - – невосстановленные условия.

Figure 1. Electrophoregram of primary anti-morphine antibody preparations isolated from rabbit and mini-pig sera by immunoaffinity chromatography

Note. A, eluate of Ra-GSM serum; B, eluate of the Pig-M serum. +, reduced conditions; -, non-reduced conditions.



**Рисунок 2. Определение антител к производным морфина в контрольных сыворотках крови человека, кролика, мини-свиньи и в сыворотках крови иммунизированных животных**

Примечание. KC-Hu; -Ra; -Pig – контрольные сыворотки крови человека, кролика, мини-свиньи соответственно. Ra-GSM – сыворотка кролика, иммунизированного GSM-BSA. Pig-M – сыворотка мини-свиньи, иммунизированной GSM-BSA, КММ-BSA и FAM-BSA.

Figure 2. Detection of antibodies to the morphine derivatives in control sera from human, rabbit, mini-pig, and in sera from the immunized animals

Note. KC-Hu; -Ra; -Pig, control blood sera, from human blood, rabbit, mini-pig respectively. Ra-GSM, serum from a rabbit immunized with GSM-BSA. Pig-M, serum from a mini-pig immunized with GSM-BSA, KMM-BSA, and FAM-BSA.

(ФСБ) с pH 7,2. Для удаления с сорбента неспецифически связавшихся компонентов сыворотки через колонку пропускали фосфатно-солевой буфер (pH 7,2), содержащий 1 М хлорида натрия. Затем колонку снова промывали ФСБ, после чего проводили элюцию 0,1 М глициновым буфером с pH 2,5. Все элюаты собирали в объемах 1,0 мл, нейтрализовали до pH 7,2-7,4 и диализовали против 0,15 М раствора хлорида натрия. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм с учетом коэффициента молярной экстинкции для IgG1, IgG4.

Анализ аффинно выделенных препаратов проводили методом электрофореза в денатурирующих условиях в 4-20% градиентном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН) в присутствии или без добавления восстанавливающего агента по ранее описанной методике [13].

Для определения At1 к производным морфина в сыворотке иммунных животных были приготовлены конъюгаты mAb2 с пероксидазой хрена по ранее описанной методике [10].

## Результаты

В таблице 2 представлены данные по изотипу полученных mAb2, а также их иммунологическая специфичность по отношению к трем производным морфина.

В таблице 3 приведены концентрации белка, полученного из 1 мл сыворотки животных: Ra, Ra-GSM и Pig-M, с использованием иммуноаффинных сорбентов АИ-1-, 2-, 3- и 4-сефароза и Ig-сефароза.

Определение специфичности выделенных антител проводили в микропланшетах с сорбированными конъюгатами производных морфина КММ-, GSM- и FAM-лизозим.

В таблице 4 представлены результаты ИФА белков в элюатах Ra-GSM, полученных с имуносорбентов АИ-1- и АИ-4-сефароза, где в качестве детектирующего конъюгата использовали антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США).

В таблице 5 представлены результаты ИФА белков в элюатах Pig-M, которые предварительно конъюгировали с биотином, на последней стадии анализа меченые антитела детектировали раствором стрептавидин-пероксидазы.

Результаты исследования выделенных препаратов антител кролика и мини-свиньи методом денатурирующего электрофореза в градиентном полиакриламидном геле (4-20%) представлены на рисунке 1.

Для того чтобы определить, насколько полно можно выделить пул поликлональных антител к производным морфина, через сорбенты АИ-1-, 2-, 3- и 4-сефароза пропускали сыворотки крови лабораторных животных до полного удаления специфичных к полученным АИ антител. На первой стадии хроматографии из 1 мл сыворотки удавалось выделить от 0,12 до 0,14 мг антител. Проведение рехроматографии истощенной по антителам сыворотки позволило выделить дополнительно 15-20% антител. В результате третьей хроматографии удалось выделить не более 2-4% антител. Однако иммуоферментный анализ на антигенах КММ, GSM и FAM-лизозим позволил детектировать в истощенных сыворотках до 83-87% антител, специфичных к производным морфина.

Полученные mAb2 были проверены в тест-системе по определению Ab1 к производным морфина в сыворотках иммунизированных животных. Для этого в лунки с сорбированными mAb2 вносили сыворотки неиммунизированного кролика, мини-свиньи, человека, Ra-GSM и Pig-M. Через 1 час инкубации в лунки вносили растворы конъюгатов тех же Ab2, но меченных пероксидазой хрена. Результаты ИФА представлены на рисунке 2.

## Обсуждение

Как видно из таблицы 2, полученные mAb2 антитела отличаются не только по изотипам, но и по иммунологической специфичности. Так, АИ-2 одинаково сильно конкурируют с тремя производными морфина, в то время как конкуренция АИ-3 со всеми производными слабая. АИ-1 и АИ-4 сильнее конкурируют с GSM- и FAM-производными морфина.

Результаты, представленные в таблице 3, свидетельствуют о том, что элюаты сыворотки контрольного кролика не содержат белков, которые специфически связались бы с сорбентами АИ-сефароза. В то же время из сыворотки кролика, иммунизированного GSM-BSA (Ra-GSM), и мини-свиньи (Pig-M), удалось выделить приблизительно одинаковое количество белка на тех же имуносорбентах. При этом элюат с контрольного сорбента Ig-сефароза не содержал белок.

Как видно из таблиц 4 и 5, в элюатах сывороток кролика и мини-свиньи содержатся антитела, которые распознают три производных морфина (КММ, FAM, GSM). Данные результаты подтверждают, что полученные моноклональные антитела распознают первичные антитела (Ab1),

специфичные к производным морфина, то есть являются антиидиотипическими по отношению к Ab1, имеющим данную специфичность, независимо от их видовой принадлежности.

Из рисунка 1 видно, что выделенные белки, которые распознаются антивидовыми конъюгатами к иммуноглобулинам класса IgG, имеют молекулярную массу 160 и 180 кДа и распадаются в восстановленных условиях на две цепи: легкую и тяжелую, то есть относятся к иммуноглобулинам класса IgG.

Результаты, представленные на рисунке 2, наглядно свидетельствуют о положительной реакции mAb2, присутствующих в сыворотках испытуемых животных, с Ab1, что позволяет сделать вывод о возможности создания тест-системы по определению антител к производным морфина у человека без применения в анализе наркотических препаратов как антигенов на твердой фазе. Применение такой тест-системы будет полезно в будущем для контроля напряженности иммунитета (выработки антител к производным

морфина) при иммунизации людей вакцинами для лечения и профилактики зависимости от опиатов.

Таким образом, в результате проведенной работы были впервые получены четыре клона, продуцирующие мышинные моноклональные антиидиотипические антитела (mAb2) к идиотипическим (первичным) антителам кролика (Ab1), иммунизированного одним из трех производных морфина. Данные mAb2, независимо от их видовой принадлежности, способны к распознаванию определенного пула поликлональных Ab1 к производным морфина, который составляет 13-17% от общего количества специфических к антигену антител в сыворотке крови кролика или мини-свиньи. На основе полученных антиидиотипических антител предполагается разработка тест-систем по определению антител, специфичных к опиатам, в сыворотке крови людей при проведении специфической вакцинации с лечебной или профилактической целью.

## Список литературы / References

1. Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Сергеева В.Е., Трофимов А.В., Кротов Г.И., Ульянова Л.И. Получение поликлональных и моноклональных антител к двум производным морфина // Вопросы наркологии, 2016. № 11-12. С. 39-54. [Berzina A.G., Gamaleya N.B., Sergeeva V.E., Trofimov A.V., Krotov G.I., Ulyanova L.I. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against two morphine derivatives. *Voprosy narkologii = Journal of Addiction Problems*, 2016, no. 11-12, pp. 39-54. (In Russ.)]
2. Берзина А.Г., Ульянова Л.И., Гамалея Н.Б., Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д. Изучение иммунного ответа у мини-свиней светлогорской популяции к двум производным морфина // Биомедицина, 2018. № 2. С. 15-21. [Berzina A.G., Ulyanova L.I., Gamaleya N.B., Stankova N.V., Kapanadze G.D. The study of the immune response of mini-pigs of the Svetlogorsk population to two morphine derivatives. *Biomeditsina = Biomedicine*, 2018, no. 2, pp. 15-21. (In Russ.)]
3. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Шестаков К.А., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Фокин Ю.В. Иммуноген для лечения и профилактики зависимости от опиатов. Патент на изобретение RU № 2548802, 2015. [Gamaleya N.B., Berzina A.G., Shestakov K.A., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Fokin Yu.V. Immunogen for the treatment and prevention of opiate dependence. Patent RU 2548802, 2015].
4. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Ульянова Л.И. Методологические основы создания вакцины для иммунотерапии зависимости от опиатов // Вопросы наркологии, 2017. № 4-5. С. 32-56. [Gamaleya N.B., Berzina A.G., Ulyanova L.I. Methodological bases for creating a vaccine for immunotherapy of opioid use disorder. *Voprosy narkologii = Journal of Addiction Problems*, 2017, no. 4-5, pp. 32-56. (In Russ.)]
5. Кулаев Д.В., Насибов С.М., Маркин С.С., Бобков Ю.Г., Семенов М.П. Хроматографический способ выделения альфа-фетопротеина // Патент на изобретение RU № 2094078, 1997. [Kulaev D.V., Nasibov S.M., Markin S.S., Bobkov Yu.G., Semenov M.P. Chromatographic method of alfa-fetoprotein isolation. Patent RU 2094078, 1997].
6. Barucca A., Capitani M., Cesca M., Tomassoni D., Kazmi U., Concetti F., Vincenzetti L., Concetti A., Venanzi F.M. Recombinant DNA technology for melanoma immunotherapy: anti-Id DNA vaccines targeting high molecular weight melanoma-associated antigen. *Mol. Biotechnol.*, 2014, Vol. 56, no. 11, pp. 1032-1039.
7. Basak S., Eck S., Gutzmer R., Smith A.J., Birebent B., Purev E., Staib L., Somasundaram R., Zaloudik J., Li W., Jacob L., Mitchell E., Speicher D., Herlyn D. Colorectal cancer vaccines: antiidiotypic antibody, recombinant protein, and viral vector. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000, Vol. 910, Iss. 1, pp. 237-252.
8. Bellati F., Napoletano C., Ruscito I., Antonilli M., Gasparri M.L., Zizzari I.G., Rahimi H., Rugghetti A., Benedetti Panici P., Nuti M. Past, present and future strategies of immunotherapy in gynecological malignancies. *Curr. Mol. Med.*, 2013, Vol. 13, no. 4, pp. 648-669.

9. Jerne N.K., Cocteau J. Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol. Rev.*, 1984, Vol. 79, no. 1, pp. 5-24.
10. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. Academic Press, 2008, 1323 p.
11. Schabacker D.S., Kirschbaum K.S., Serge M. Exploring the feasibility of an anti-idiotypic cocaine vaccine: analysis of the specificity of anticocaine antibodies (Ab1) capable of inducing Ab2 $\beta$  anti-idiotypic antibodies. *Immunology*, 2000, Vol. 100, no. 1, pp. 48-56.
12. Pandey S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2010, Vol. 1, no. 1, pp. 88-94.
13. Walker J.M. Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.*, 1984, Vol. 1, pp. 57-61.

---

**Авторы:**

**Трофимов А.В.** — руководитель группы лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Ищенко А.М.** — к.б.н., заведующий лабораторией биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Рак А.Я.** — младший научный сотрудник лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России; аспирант ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

**Сергеева В.Е.** — научный сотрудник лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Симбирцев А.С.** — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, научный руководитель ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

---

**Authors:**

**Trofimov A.V.**, Head of a Research Group, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Ischenko A.M.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Rak A.Ya.**, Junior Research Associate, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency; Postgraduate Student, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Sergeeva V.E.**, Research Associate, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Simbirtsev A.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Гамалея Н.Б.** — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Берзина А.Г.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Станкова Н.В.** — к.б.н., заведующая лабораторией спортивной медицины и экстремальных состояний ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Ульянова Л.И.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Климова Т.А.** — к.б.н., специалист лаборатории иммунохимии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Gamaleya N.B.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

**Berzina A.G.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

**Stankova N.V.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Sports Medicine and Extreme Conditions, National Center of Biomedical Technologies, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Ulyanova L.I.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

**Klimova T.A.**, PhD (Biology), Specialist, Immunochemistry Laboratory, V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

Поступила 30.09.2018  
Отправлена на доработку 19.11.2018  
Принята к печати 25.12.2018

Received 30.09.2018  
Revision received 19.11.2018  
Accepted 25.12.2018

## ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИИ *IN VITRO*: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА Е К ИНГАЛЯЦИОННЫМ АЛЛЕРГЕНАМ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМ IMMULITE И PHADIA

Зуева Е.В.<sup>1</sup>, Хамитова И.В.<sup>1</sup>, Меличкина А.М.<sup>1</sup>, Лазаренко Л.Л.<sup>1</sup>,  
Баканина Л.А.<sup>2</sup>, Тотолян Арег А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> СПбГБУЗ «Городская поликлиника № 71», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Аллерген-специфическая диагностика проводится на основе сбора данных семейного и личного анамнеза пациента, по результатам кожного тестирования, провокационных проб и лабораторных методов исследования. В подтверждении диагноза и выявлении патогенетического механизма гиперчувствительности немедленного типа к аллергену ключевую роль играют методы определения специфических IgE-антител (sIgE). Цель исследования – оценить результаты определения специфических IgE-антител к аллергенам e2 эпителия кошки, d1 клеща домашней пыли *D. farinae* и t3 пыльцы березы в сыворотках крови больных, страдающих респираторной аллергией, путем проведения сравнения двух методов Phadia ImmunoCAP и Immulite 3gAllergy, а также определения соответствия результатов этих тест-систем результатам кожных проб. Образцы сыворотки были получены от пациентов поликлиник Санкт-Петербурга, которые страдали респираторной аллергией (n = 50). Образцы анализировали параллельно в двух независимых лабораториях, при этом каждая из лабораторий применяла одну из тест-систем. Ретроспективные результаты кожных проб были получены у двадцати шести из пятидесяти отобранных пациентов. Междутестовое сравнение проведено с помощью определения конкордантности положительных и отрицательных результатов, корреляционного и регрессионного анализов результатов sIgE для каждого аллергена и ROC-анализа для сравнения диагностической специфичности и чувствительности тест-систем по отношению к результатам кожных проб. Проведенное исследование показало, что по критериям согласия и сопряженности результатов тест-система Immulite имела тесную связь с тест-системой Phadia. Как анализ классов, так и анализ количественных значений sIgE показал хорошую положительную корреляцию от 0,79 до 0,99 ( $p < 0,0001$ ) для всех трех аллергенов между двумя тест-системами. Высокая точность совпадения в показателях чувствительности, площади под ROC-кривыми (AUC) и порогах отсечения у обеих тест-систем была получена для аллергена *D. farinae*. По аллергенам эпителия кошки и пыльцы березы наблюдались различия между тест-системами: чувствительность и значения AUC были достоверно больше у Immulite, чем у Phadia для обоих аллергенов.

### Адрес для переписки:

Зуева Елена Викторовна  
ФБУН «Научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.  
Тел.: 8 (921) 382-50-07.  
E-mail: elenazueva9@gmail.com

### Address for correspondence:

Zueva Elena V.  
Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology  
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.  
Phone: 7 (921) 382-50-07.  
E-mail: elenazueva9@gmail.com

### Образец цитирования:

Е.В. Зуева, И.В. Хамитова, А.М. Меличкина,  
Л.Л. Лазаренко, Л.А. Баканина, Арег А. Тотолян  
«Диагностика аллергии *in vitro*: сравнительный анализ  
результатов специфического иммуноглобулина Е  
к ингаляционным аллергенам, полученных с помощью  
тест-систем Immulite и Phadia» // Медицинская  
иммунология, 2019. Т. 21, № 5. С. 997-1004.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-997-1004

© Зуева Е.В. и соавт., 2019

### For citation:

E.V. Zueva, I.V. Khamitova, A.M. Melichkina,  
L.L. Lazarenko, L.A. Bakanina, Areg A. Totolian  
“In vitro allergy diagnosis: a comparative analysis of IgE specific to the  
inhalant allergens, obtained by Immulite and Phadia assay  
systems”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 997-1004.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-997-1004

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-997-1004

Таким образом, междутестовое сравнение дало практически эквивалентные как бинарные, так и количественные результаты определения sIgE-антител к аллергенам кошки, клеща и березы. Сравнение тест-систем по их связи с кожными пробами показало, что результаты анализа Immulite имели более точную, по сравнению с анализом Phadia, связь по аллергенам кошки и березы.

**Ключевые слова:** специфические IgE, ингаляционные аллергены, Phadia, Immulite, кожные пробы

## IN VITRO ALLERGY DIAGNOSIS: A COMPARATIVE ANALYSIS OF IgE SPECIFIC TO THE INHALANT ALLERGENS, OBTAINED BY IMMULITE AND PHADIA ASSAY SYSTEMS

Zueva E.V.<sup>a</sup>, Khamitova I.V.<sup>a</sup>, Melichkina A.M.<sup>a</sup>, Lazarenko L.L.<sup>a</sup>,  
Bakanina L.A.<sup>b</sup>, Totolian Areg A.<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Municipal Polyclinic No. 71, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Allergen-specific diagnostics is carried out on the basis of the data collection from the patient's family and personal history, skin test results, provocative tests and laboratory research methods. Methods for determining specific IgE antibodies (sIgE) play a key role in confirming the diagnosis and identifying the pathogenetic mechanism of an immediate-type hypersensitivity to an allergen. The purpose of the study was to evaluate the results of determining sIgE for allergens of cat epithelium, house dust mite *D. farinae* and birch pollen in the blood serum of patients suffering from respiratory allergy, by comparing two methods of ImmunoCAP Phadia and 3gAllergy Immulite, as well as determining whether the results of these test systems are in concordance with the results of skin tests in the patients. The serum samples were obtained from patients of St. Petersburg adult outpatient clinics, who suffered from respiratory allergies (n = 50). The samples were analyzed in parallel in two laboratories, with each of the laboratories using single test systems. The retrospective skin test results were obtained from twenty six of the fifty selected patients. The inter-method comparison was conducted by determining the concordance of positive and negative results, correlation and regression analysis of sIgE results for each allergen and ROC-analysis to compare the diagnostic specificity and sensitivity of test systems in relation to the results of skin tests. This study showed that, in terms of agreement and contingency of the results, the Immulite test system had a close relationship with the Phadia test system. Both analysis of classes and quantitative sIgE analysis showed a good positive correlation from 0.79 to 0.99 ( $p < 0.0001$ ) between the two test systems for all three allergens. High accuracy of coincidence in terms of sensitivity, area under the ROC curves (AUC) and cut-off threshold in both test systems was obtained for the *D. farinae* allergen. For allergens of cat epithelium and birch pollen, some differences between test systems were observed, i.e., sensitivity and AUC values were significantly higher in Immulite than in Phadia assay for both allergens.

Thus, the inter-method comparison gave almost equivalent binary and quantitative results of the determination of sIgE antibodies to cat, tick and birch allergens. Comparison of *in vitro* test results, and their correlation with skin tests showed that the cat and birch *in vitro* antibody testing with Immulite assay was more closely connected with skin test results, than Phadia assay system.

**Keywords:** specific IgE, inhalation allergens, Phadia, Immulite, skin tests

## Введение

Специфическая аллергодиагностика проводится на основе сбора данных семейного и личного анамнеза пациента, по результатам кожного тестирования, провокационных проб и лабораторных методов исследования. Для подтверждения диагноза и выявления патогенетического механизма гиперчувствительности немедленного типа ключевую роль играют методы определения аллерген-специфических IgE-антител [2]. Первый *in vitro* тест для определения аллерген-специфических иммуноглобулинов класса Е был

предложен в 1967 году [17] как радиоаллергосорбентный тест (RAST). Некоторое время спустя появились аналоги RAST на основе иммуноферментного анализа. В 1973 году ВОЗ был утвержден первый стандарт препарата человеческого IgE, который был использован для построения многократной калибровочной кривой, делая возможными стандартизированные количественные измерения [14]. Появление стандарта IgE способствовало созданию тест-систем второго поколения, диагностические результаты которых стали представлять в международных единицах



МЕ/мл (kЕ/L), одна единица которого составила 2,42 нг IgE. С тех пор на протяжении уже более 40 лет технологии создания новых IgE тест-систем постоянно развиваются и совершенствуются. В 90-е годы были разработаны многочисленные тест-системы второго поколения, которые широко используются в практике и до настоящего времени. Системы второго поколения увеличили чувствительность лабораторных исследований и стали одними из важнейших диагностических инструментов для IgE-опосредованных аллергических заболеваний. Однако использование наборов от разных производителей с различными характеристиками привело к получению противоречивых результатов анализов. Поэтому одной из основных проблем определения IgE-антител на тест-системах второго поколения стал вопрос соответствия их результатов между собой, а также соответствия с клинической симптоматикой и аллергологическим анамнезом. В многочисленных исследованиях, проводимых с целью сравнения методов определения аллерген-специфических IgE между собой, в качестве эталонной была принята тест-система Pharmacia CAP (Uppsala, Sweden) [7, 9, 12, 13, 15, 16]. В настоящее время для определения количественных уровней sIgE преимущество получили полностью автоматизированные, с повышенной чувствительностью тест-системы третьего поколения Phadia ImmunoCAP (Thermo Scientific) и Immulite 3gAllergy (Siemens Medical Solutions Diagnostics). Эти две системы имеют одинаковую калибровочную шкалу 0–100 МЕ/мл, пороговое значение положительных концентраций – 0,1 МЕ/мл, но различаются по своим технологическим характеристикам: формам используемых аллергенов, методам проведения анализа, системам автоматизации. Так, в тест-системе Phadia ImmunoCAP используются твердофазные аллергены, иммобилизованные на нитроцеллюлозную губку сферической формы, а в Immulite 3gAllergy – жидкофазные биотинилированные аллергены, которые в процессе анализа связываются с авидином, мобилизованном на полимерных частицах. Кроме того, эти системы имеют разные методы детекции: у анализатора Phadia – флюоресценция, а у анализатора Immulite – хемилюминисценция. Таким образом, сравнение эффективности этих двух наиболее востребованных на сегодня тест-систем остается актуальным вопросом [6, 8, 11].

**Цель исследования** – оценить результаты определения специфических IgE-антител к аллергенам e2 эпителия кошки, d1 клеща домашней пыли *D. farinae* и t3 пыльцы березы в сыворотках крови больных, страдающих респираторной аллергией, путем проведения сравнения двух методов Phadia ImmunoCAP и Immulite 3gAllergy, а также определения соответствия результатов этих тест-систем результатам кожных проб.

## Материалы и методы

### Пациенты

В исследовании участвовали пациенты аллергологических кабинетов городских поликлиник Санкт-Петербурга. Взятие крови больных и дальнейшие исследования осуществляли в Медицинском центре ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Критериями включения в группу участия были следующие показатели: а) возраст старше 18 лет; б) наличие по данным истории болезни сенсibilизации к аллергенам e1 – эпителия кошки, d2 – клеща домашней пыли *D. farinae* и t3 – пыльцы березы; в) наличие ранее полученных результатов тестов *in vitro* и/или *in vivo* к исследуемым аллергенам. В исследование были включены 50 человек, из них 24 мужчины и 26 женщин в возрасте от 18 до 67 лет, отобранных в период с ноября 2018 по февраль 2019 года. Информированное согласие получено у всех пациентов, включенных в это исследование. Собранная группа пациентов представляла собой популяцию жителей города Санкт-Петербурга с подтвержденными atopическими заболеваниями. Диагноз аллергического ринита был установлен у всех пятидесяти пациентов. У одиннадцати из них диагноз «бронхиальная астма» сочетался с аллергическим ринитом, а у одного пациента диагностировано сочетание ринита с atopическим дерматитом.

### Сыворотки крови и измерение sIgE к аллергенам

В образцах сывороток крови определяли количество IgE-антител к наиболее значимым ингаляционным аллергенам e1, d2 и t3. Сыворотка крови каждого пациента была разделена на три пробирки (типа эппендорф) по 1–1,5 мл, им были присвоены идентификационные номера, а затем пробирки замораживали и хранили при температуре –80 °C. Образцы сывороток были отправлены в две независимые лаборатории, каждая из которых использовала свою тест-систему Immulite 2000 3gAllergy или Phadia 250 ImmunoCAP. Все сыворотки одновременно анализировались вслепую на каждом из анализаторов.

### Кожные пробы

В исследование были включены имеющие ретроспективные результаты кожных проб к трем аллергенам, включенным в исследование (e1, d2, t3). Кожные тесты были выполнены ранее в аллергологических кабинетах городских поликлиник с использованием экстрактов аллергенов производства ФГУП НПО «Микроген» (г. Ставрополь) в соответствии с инструкциями производителя. Реакция кожной пробы считалась положительной, если диаметр волдыря превышал отрицательный контроль на 3 мм и более.

### Статистический анализ

Определение согласия и сопряженности между результатами тест-систем по каждому аллерги-

ну было осуществлено качественным анализом с помощью четырехпольных таблиц сопряженности  $2 \times 2$  бинарных величин. В качестве метода сравнения использовали тест-систему Phadia ImmunoCAP. Были вычислены коэффициент согласия, критерий  $\chi^2$ , коэффициент взаимной сопряженности Пирсона, а также коэффициент ассоциации Юла [1, 3]. Полуколичественное сравнение между классами (классы 0-6) и количественное сравнение уровней sIgE осуществляли с помощью корреляционного анализа Спирмена. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена оценивали по шкале Чеддека: +1 – полная связь; 0,99-0,7 – сильная; 0,7-0,3 – средняя связь; 0,3-0,1 – слабая, 0 – нет связи. Определение взаимосвязи между уровнями sIgE-тестов осуществляли с помощью линейного регрессионного анализа. Для сравнения диагностической специфичности и чувствительности количественных результатов двух тест-систем был проведен анализ ROC-кривых. В качестве клинического эталона были приняты результаты положительных и отрицательных кожных проб. Для ROC-анализа использовали только результаты пациентов, у которых имелся полный набор всех трех тестов (кожные пробы, sIgE Phadia и sIgE Immulite). Анализ ROC-кривых проводили по вычислению значений площадей под кривыми (AUC) и по определению пороговых значений концентраций IgE-антител для каждого аллергена, при которых имелся баланс между чувствительностью и специфичностью. Статистический анализ и графические работы для рисунков выполнялись с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Seattle, США) и программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc).

## Результаты

### Качественный анализ результатов sIgE

Оценка связи между положительными и отрицательными результатами у сравниваемых тест-систем по каждому аллергену представлена в таблице 1. Суммарные коэффициенты согласия составили 0,75 (d2 *D. farinae*), 0,95 (t3 береза) и 1,0 (e1 кошка). Критерий согласия  $\chi^2$  показал наличие достоверной взаимосвязи тест-систем, а значения критерия Пирсона превышали значение 0,5, что свидетельствовало о взаимосвязи по всем аллергенам. Сопряженность между числом совпадающих положительных и отрицательных результатов по всем трем аллергенам имела сильную связь между Phadia и Immulite.

### Корреляционный и регрессионный анализы

Данные анализа корреляции классов и корреляции количественных значений sIgE между Phadia и Immulite приведены в таблице 2. Как анализ классов, так и анализ уровней sIgE показал высокую положительную корреляцию ( $p < 0,0001$ ) между двумя тест-системами для всех трех аллергенов. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена варьировали от 0,79 для аллергена d2 *D. farinae*, 0,91 для аллергена e1 кошки и до 0,99 для аллергена t3 березы, что свидетельствует о значительной связи результатов Phadia и Immulite. Коэффициент детерминации  $R^2$ , показывающий числовую оценку взаимосвязи сравниваемых методов, имел значения 0,78 для аллергена e1 кошки, 0,93 для d2 *D. farinae* и 0,91 для t3 березы, что подтверждает наличие статистически значимой сильной связи результатов. Визуализация данных корреляционного и регрессионного анализов уровней sIgE представлена на рисунке 1. Точки на диаграмме рассеяния находились близко к линиям регрессии, что свидетельствует о тесной положительной корреляционной свя-

**ТАБЛИЦА 1. СОГЛАСИЕ И АССОЦИАЦИЯ МЕЖДУ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ И ОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ РЕЗУЛЬТАТАМИ У СРАВНИВАЕМЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ IMMULITE И PHADIA**

TABLE 1. POSITIVITY AND NEGATIVITY AGREEMENT AND CONTINGENCY BETWEEN IMMULITE И PHADIA

| Аллерген<br>Allergen<br>(n = 50)              | Коэффициент<br>согласия<br>Agreement ratio | Критерий $\chi^2$ (p)<br>Criterion $\chi^2$<br>(p-value) | Критерий<br>сопряженности<br>Пирсона<br>Pearson's contingency<br>test | Коэффициент<br>ассоциации<br>Contingency ratio |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>e2 Эпителий<br/>кошки<br/>Cat</b>          | 1,00 (40/40)                               | 22,22<br>( $< 0,001$ )                                   | 0,55                                                                  | 1,00                                           |
| <b>d1 Клещ<br/>Mite<br/><i>D. farinae</i></b> | 0,75 (18/24)                               | 18,59<br>( $< 0,0001$ )                                  | 0,52                                                                  | 0,90                                           |
| <b>t3 Пыльца<br/>березы<br/>Birch</b>         | 0,95 (38/40)                               | 33,01<br>( $< 0,0001$ )                                  | 0,63                                                                  | 0,99                                           |

**ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ МЕЖДУ КОЛИЧЕСТВЕННЫМИ ЗНАЧЕНИЯМИ КОНЦЕНТРАЦИЙ sIgE И КЛАССАМИ sIgE IMMULITE И PHADIA**

TABLE 2. CORRELATION ANALYSIS BETWEEN OF THE PHADIA'S AND IMMULITE'S sIgE LEVELS AND CLASSES.

| Аллергены<br>Allergens                      | Корреляция уровней sIgE (МЕ/мл)<br>Correlation of sIgE levels (kU/l) |                                                    | Корреляция классов sIgE<br>Intra-class correlation |                                                    |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|                                             | n = 50                                                               | r <sub>s</sub> (95% ДИ)<br>r <sub>s</sub> (95% CI) | p*                                                 | r <sub>s</sub> (95% ДИ)<br>r <sub>s</sub> (95% CI) |
| <b>e2 Эпителий кошки</b><br>Cat             |                                                                      | 0,91<br>(0,85-0,95)                                | < 0,001                                            | 0,86<br>(0,77-0,92)                                |
| <b>d1 Клещ</b><br>Mite<br><i>D. farinae</i> |                                                                      | 0,79<br>(0,65-0,88)                                | < 0,0001                                           | 0,79<br>(0,65-0,88)                                |
| <b>t3 Пыльца березы</b><br>Birch            |                                                                      | 0,99<br>(0,97-0,99)                                | < 0,0001                                           | 0,93<br>(0,88-0,96)                                |

Примечание. \* p – значения рассчитаны с использованием коэффициента корреляции Спирмена.

Note. \* p-values were calculated using Spearman's correlation coefficient.

**ТАБЛИЦА 3. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ, СПЕЦИФИЧНОСТЬ, ОПТИМАЛЬНЫЙ ПОРОГ ОТСЕЧЕНИЯ И АНАЛИЗ ROC-КРИВЫХ СРАВНИВАЕМЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ IMMULITE И PHADIA ОТНОСИТЕЛЬНО РЕЗУЛЬТАТОВ КОЖНЫХ ПРОБ**

TABLE 3. SENSITIVITY, SPECIFICITY, OPTIMAL CUT-OFF THRESHOLD AND ANALYSIS OF ROC CURVES WHEN COMPARING IMMULITE AND PHADIA SYSTEMS WITH SKIN TESTS RESULTS

| Аллергены<br>Allergens<br>(n = 26)          | Тест-система<br>Assay systems | ЧУВ (95% ДИ)<br>SE (95% CI) | СП (95% ДИ)<br>SP (95% CI) | Порог отсечения<br>Cut-off | Площадь под ROC-кривой<br>Area under the ROC curve |          |
|---------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------|----------|
|                                             |                               |                             |                            | МЕ/мл<br>kU/l              | Площадь (95% ДИ)<br>AUC (95% CI)                   | p        |
| <b>e2 Эпителий кошки</b><br>Cat             | Phadia                        | 0,69 (0,48-0,86)            | 0,38 (0,20-0,59)           | 1,02                       | 0,63 (0,46-0,79)                                   | 0,1135   |
|                                             | Immuline                      | 0,77 (0,78-1,00)            | 0,38 (0,20-0,59)           | 1,13                       | 0,76 (0,61-0,91)                                   | 0,0012   |
| <b>d1 Клещ</b><br>Mite<br><i>D. farinae</i> | Phadia                        | 0,65 (0,44-0,83)            | 0,81 (0,61-0,93)           | < 0,78                     | 0,62 (0,46-0,79)                                   | 0,1288   |
|                                             | Immuline                      | 0,65 (0,44-0,83)            | 0,81 (0,61-0,93)           | < 0,76                     | 0,59 (0,43-0,76)                                   | 0,2379   |
| <b>t3 Пыльца березы</b><br>Birch            | Phadia                        | 0,61 (0,41-0,80)            | 0,38 (0,20-0,59)           | 1,77                       | 0,70 (0,56-0,85)                                   | 0,01158  |
|                                             | Immuline                      | 0,81 (0,61-0,93)            | 0,38 (0,20-0,59)           | 1,97                       | 0,83 (0,71-0,95)                                   | < 0,0001 |

зи между количественными результатами sIgE Phadia и Immuline.

#### Анализ характеристических кривых тестов (ROC-анализ)

Результаты всех трех тестов (кожные пробы, sIgE Phadia и sIgE Immuline) были получены у 26-ти пациентов. Для сравнения клинической эффективности тест-систем построены ROC-кривые (рис. 2) и для каждого аллергена были определены пороговые отсечения sIgE, обеспечивающие наивысшие значения чувствительности и специфичности, которые они могут достигнуть совместно. Пороговые значения концентраций IgE-антител и соответствующие им значения чувствительности, специфичности и их 95% довери-

тельные интервалы, площади под ROC-кривыми представлены в таблице 3. Как видно из таблицы, значения AUC у тест-систем по всем аллергенам превышали значение 0,5, что свидетельствует о наличии клинической согласованности результатов sIgE исследуемых тест-систем с кожными пробами. Хорошая точность совпадения между тест-системами в показателях чувствительности, AUC и пороге отсечения была получена для аллергена d2 *D. farinae*. Оптимальный порог отсечения уровней sIgE был практически одинаковым и составлял < 0,76 МЕ/мл для Immuline и < 0,78 МЕ/мл для Phadia. Однако статистическая достоверность ROC-кривых по этому аллергену не обнаружена. У аллергенов e1 эпителия

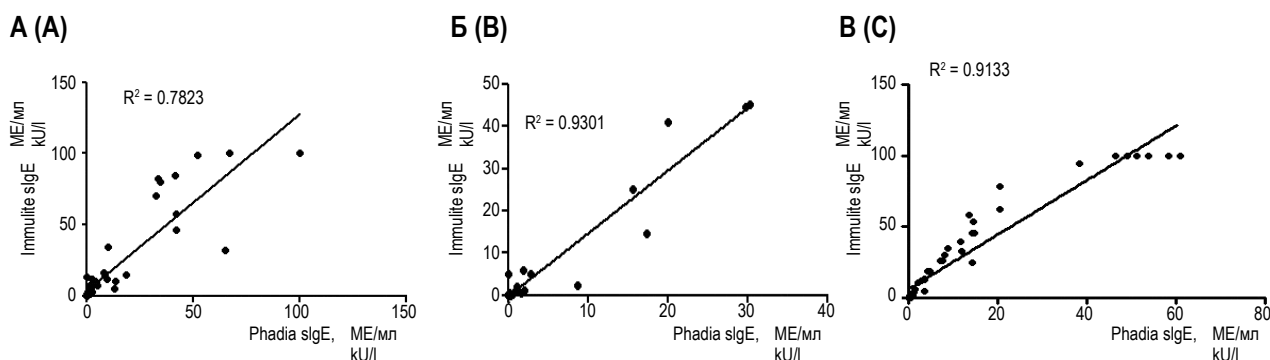


Рисунок 1. Диаграмма рассеяния значений sIgE, полученных с помощью Immulite и Phadia, и график линейной регрессии с величиной коэффициента детерминации  $R^2$

Примечание. А – e2 аллерген кошки, Б – d1 аллерген *D. farinae*, В – t3 аллерген березы.

Figure 1. Scatterplot of sIgE levels obtained by Immulite and Phadia, and the linear regression graph with the value of  $R^2$ -squared determination coefficient

Note. A, e2 cat allergen; B, d1 *D. farinae* allergen; C, t3 birch allergen.

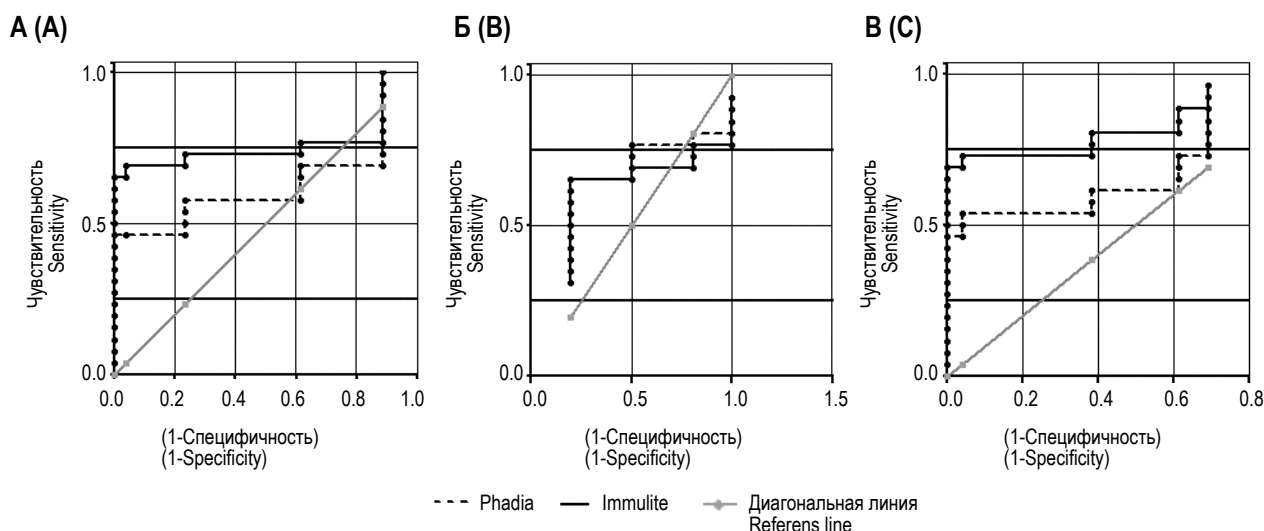


Рисунок 2. Графики ROC-кривых, характеризующие чувствительность и специфичность в зависимости от пороговых значений концентраций sIgE сравниваемых тест-систем Phadia и Immulite относительно результатов кожных проб

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. ROC curves characterizing sensitivity and specificity as a function of Cut-off values of sIgE concentrations when comparing Phadia and Immulite systems with skin tests results

Note. As for Figure 1.

кошки и t3 пылцы березы наблюдались различия между тест-системами: чувствительность была выше у Immulite, значения порогов отсечения были ниже у Phadia. Значения AUC были достоверно больше у Immulite, чем у Phadia по обоим аллергенам, и составили по аллергену e1 кошки 0,76 ( $p < 0,005$ ) для тест-системы Immulite, 0,63 ( $p = 0,114$ ) для Phadia, а по аллергену t3 березы 0,83 ( $p < 0,0001$ ) и 0,70 ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом достоверность ROC-кривой аллергена e2 кошки у Phadia отсутствовала. Визуальная оценка (рис. 2) показала, что расположение ROC-кривых Immulite для аллергенов e1 кошки и t3 березы выше от диагональной линии, чем ROC-кривые Phadia, а для аллергена d2 *D. farinae*

ROC-кривые обеих тест-систем находятся практически на одной высоте.

## Обсуждение

Тесты определения sIgE антител *in vitro* приобрели широкое применение для определения наличия сенсибилизации к тому или иному аллергену у пациентов, страдающих аллергией. Количественная оценка наличия sIgE антител помогает врачу подобрать безопасную начальную дозу при проведении аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) в соответствии с уровнем чувствительности конкретного пациента. Кроме того, оценка сенсибилизации по уровню IgE используется при мониторинге изменения реакции

пациента на аллергены при АСИТ или при исключении тех или иных продуктов из рациона питания [4, 5]. Поэтому очень важно получение надежных и точных результатов sIgE как для постановки правильного диагноза, так и для прогностической оценки развития сенсибилизации.

Мы провели сравнение двух имеющихся на сегодняшний день тест-систем третьего поколения путем сопоставления результатов определения sIgE у 50 жителей Санкт-Петербурга, страдающих респираторной аллергией, и сравнения полученных результатов у 26-ти пациентов из этой группы с клиническими результатами кожных проб. Это перекрестное исследование показало, что по показателям конкордантности и ассоциации положительных и отрицательных результатов тест-система Immulite 2000 3gAllergy имела тесную связь с тест-системой Phadia 250 ImmunoCAP. Корреляционный анализ и представленные диаграммы рассеяния с высокими значениями коэффициентов детерминации показали хорошее согласие между двумя тест-системами.

Кожные пробы являются наиболее распространенным методом определения наличия сенсибилизации к тому или иному аллергену. Несмотря на различие способов определения sIgE, лежащих в основе методов *in vivo* (определение IgE-антител связанных с тучными клетками кожи) и *in vitro* (определение IgE-антител циркулирующих в крови), сравнение исследуемых тест-систем с результатами кожных тестов позволяет установить, есть ли совпадение между тест-системами по их отношению к результатам объективных клинических тестов. Этот подход сравнения представляется уместным, так как нет другого теста, кроме кожных проб, который бы дал возможность иметь объективные результаты чувствительности и специфичности методов определения sIgE *in vitro*. С помощью ROC-анализа, основанного на кожных пробах, было проведено сравнение эффективности тест-систем Phadia и Immulite. Анализ показал, что по аллергену d2 *D. farinae* эффективность тест-систем была практически одинаковой. Для па-

циентов с уровнем sIgE < 0,78 kE/L к аллергену d2 *D. farinae* наблюдалась благоприятная прогностическая ценность отрицательных результатов, то есть хорошая специфичность тестов в диапазоне низких значений sIgE. По аллергенам e1 кошки и t3 березы выявлено различие между тест-системами: сравнительная эффективность Immulite была достоверно выше, чем у Phadia по обоим аллергенам. Кроме того, эффективность ROC-кривой Phadia по аллергену e1 кошки не была достоверной. Значение 0,83 площади под кривой аллергена t3 березы указывает на высокую информативность теста Immulite по определению наличия сенсибилизации. При значениях уровней sIgE к аллергенам e1 кошки и t3 березы выше порога отсечения наблюдалась благоприятная прогностическая ценность положительных результатов, то есть хорошей чувствительности при высоких значениях IgE. Поскольку чувствительность и специфичность тестов может различаться в зависимости от аллергена, важно ориентироваться на значение критической величины IgE, характерной для конкретного аллергена [10], так как она позволяет диагностически правильно различать ложноположительные и ложноотрицательные результаты.

## Заключение

Таким образом, можно заключить, что между тестовое сравнение дало практически эквивалентные совпадения как по наличию положительных и отрицательных бинарных результатов, так и по количественным результатам определения sIgE-антител к аллергенам e1 эпителия кошки, d2 клеща домашней пыли *D. farinae* и t3 пыльцы березы. Сравнение тест-систем Immulite 2000 3gAllergy и Phadia 250 ImmunoCAP по их соответствию с результатами кожных проб показало, что они имели практически одинаковую связь по аллергену d2 *D. farinae*, но метод Immulite показал большую информативность по определению сенсибилизации к аллергенам e1 кошки и t3 березы, чем метод Phadia.

## Список литературы / References

1. Банерджи А. Медицинская статистика понятным языком. М.: Практическая медицина, 2007. 287 с. [Banerjee A. Medical statistics made clear]. Moscow: Practical Medicine, 2007. 287 p.
2. Гушин И.С. Немедленная аллергия клетки. М.: Медицина, 1976. 176 с. [Gushchin I.S. Immediate cell allergy]. Moscow: Medicine, 1976. 176 p.
3. Зайцев В.М., Савельев С.И. Практическая медицинская статистика: учебное пособие. Тамбов: Цифра, 2013. 580 с. [Zaytsev V.M., Savelyev S.I. Practical medical statistics: a tutorial]. Tambov: Tsufra, 2013. 580 p.
4. Клиническая аллергология и иммунология: руководство для практикующих врачей. Под ред. Л.А. Горячкиной, К.П. Кашкина. М.: Миклош, 2011. 430 с. [Clinical allergology and immunology: a manual for practicing physician. Ed. L.A. Goryachkina, K.P. Kashkin]. Moscow: Miklosh, 2011. 430 p.
5. Общая аллергология. Т. 1. Под ред. Г.Б. Федосеева. СПб.: Нормед-Издат, 2001. 816 с. [General allergology. Ed. G.B. Fedoseev] St. Petersburg: Normed-Izdat, 2001. 816 p.
6. Bulat Lokas S., Plavec D., Rikić Pišković J., Živković J., Nogalo B., Turkalj M. Allergen-specific IgE measurement: intermethod comparison of two assay systems in diagnosing clinical allergy. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2017, Vol. 31, no. 3, 9 p.

7. Kleine-Tebbe J., Eickholt M., Gätjen M., Brunnée T., O'Connor A., Kunkel G. Comparison between MAGIC-LITE and CAP-system: two automated specific IgE antibody assays. *Clin. Exp. Allergy*, 1992, Vol. 22, no. 4, pp. 475-484.
8. Lee Y.W., Sohn J.H., Lee J.H., Hong C.S., Park J.W. Allergen-specific IgE measurement with the IMMULITE 2000 system: intermethod comparison of detection performance for allergen-specific IgE antibodies from Korean allergic patients. *Clin. Chim. Acta.*, 2009, Vol. 401, pp. 25-32.
9. Liccardi G., Dente B., Triggiani M., Russo M., Diamare F., Massari A., Pinzarrone R., d'Isanto R., Letizia M., d'Amato M., d'Amato G. A multicenter evaluation of the CARLA System for the measurement of specific IgE antibodies with other different methods and skin prick tests. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 2002, Vol. 12, no. 4, pp. 235-241.
10. Hong S.D., Ryu G., Seo M.Y., Jeong J.I., Kim H.Y., Chung S.K., Dhong H.J. Optimal cut-off values of allergen-specific immunoglobulin E to house dust mites and animal dander based on skin-prick test results: analysis in 16,209 patients with allergic rhinitis. *Am. J. Rhin. Allergy*, 2018, Vol. 32, pp. 23-26.
11. Park K.H., Lee J., Sim D.W., Lee S.C. Comparison of singleplex specific IgE detection immunoassays: ImmunoCAP Phadia 250 and Immulite 2000 3gAllergy. *Ann. Lab. Med.*, 2018, Vol. 38, pp. 23-31.
12. Plebani M., Bernardi D., Basso D., Borghesan F., Faggian D. Measurement of specific immunoglobulin E: inter-method comparison and standardization. *Clin. Chem.*, 1998, Vol. 44, pp. 1974-1979.
13. Ricci G., Capelli M., Miniero R., Menna G., Zannarini L., Dillon P., Masi M. A comparison of different allergometric tests skin prick test, Pharmacia UniCAP and ADVIA Centaur, for diagnosis of allergic diseases in children. *Allergy*, 2003, Vol. 58, pp. 38-45.
14. Rowe D.S., Grab B., Anderson S.G. An International Reference Preparation for human serum immunoglobulin E. *Bull. World Health Organ.*, 1973, Vol. 49, no. 3, pp. 320-321.
15. Sohn M.H., Lee S.Y., Lee K.E., Kim K.E. Comparison of VIDAS stallertest and pharmacia CAP assay for detection of specific IgE antibodies in allergic children. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2005, Vol. 35, no. 1, pp. 318-322.
16. Wang J., Godbold J.H., Sampson H.A. Correlation of serum allergy (IgE) tests performed by different assay systems. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 121, pp. 1219-1224.
17. Wide L., Bennich H., Johansson S.G. Diagnosis of allergy by an *in-vitro* test for allergen antibodies. *Lancet*, 1967, Vol. 2, pp. 1105-1107.

---

**Авторы:**

**Зуева Е.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

**Хамитова И.В.** — заведующая центральной клинической диагностической лабораторией ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

**Меличкина А.М.** — к.м.н., главный врач ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

**Лазаренко Л.Л.** — к.м.н., врач аллерголог-иммунолог ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

**Баканина Л.А.** — врач аллерголог-иммунолог СПбГБУЗ «Городская поликлиника № 71», Санкт-Петербург, Россия

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

---

**Authors:**

**Zueva E.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Khamitova I.V.**, Head, Central Clinical Diagnostic Laboratory, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Melichkina A.M.**, PhD (Medicine), Chief Doctor, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Lazarenko L.L.**, PhD (Medicine), Clinical Allergologist-Immunologist, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Bakanina L.A.**, Clinical Allergologist-Immunologist, Municipal Polyclinic No. 71, St. Petersburg Healthcare Committee, St. Petersburg, Russian Federation

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

---

Поступила 03.07.2019

Отправлена на доработку 13.09.2019

Принята к печати 09.10.2019

---

Received 03.07.2019

Revision received 13.09.2019

Accepted 09.10.2019

# 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 $\beta$  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 $\beta$  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 <a href="http://www.e-library.ru">www.e-library.ru</a> |

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](http://www.elibrary.ru)**

# АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

|                        |     |                        |     |                       |     |                      |     |                        |     |
|------------------------|-----|------------------------|-----|-----------------------|-----|----------------------|-----|------------------------|-----|
| Аак О.В. ....          | 919 | Глушкова А.Н. ....     | 869 | Коряушкина А.В. ....  | 895 | Мушкарина Т.Ю. ....  | 959 | Суркова Е.А. ....      | 911 |
| Абдрахманова С.А. .... | 965 | Гордеева Л.А. ....     | 869 | Костинов М.П. ....    | 877 | Нестерова И.В. ....  | 885 | Суровцева М.А. ....    | 861 |
| Абидов М.Т. ....       | 929 | Гречихина М.В. ....    | 959 | Костянко М.В. ....    | 869 | Никишкина К.В. ....  | 895 | Сухомятина И.Е. ....   | 821 |
| Ажикова А.К. ....      | 807 | Данилова И.Г. ....     | 929 | Кригер А.Б. ....      | 953 | Олсуфьев С.С. ....   | 981 | Телешева Л.Ф. ....     | 895 |
| Алхутова Н.А. ....     | 937 | Деген А.С. ....        | 821 | Кузнецов В.Д. ....    | 919 | Олсуфьева А.В. ....  | 981 | Тихонова М.А. ....     | 835 |
| Баймукашева Д.К. ....  | 965 | Ефимов Г.А. ....       | 847 | Кузьмина Е.Г. ....    | 959 | Останин А.А. ....    | 835 | Тоголян Арег А. ....   | 997 |
| Баканина Л.А. ....     | 997 | Жибурт Е.Б. ....       | 965 | Кузьмина Е.П. ....    | 847 | Павлова М.В. ....    | 911 | Трофимов А.В. ....     | 987 |
| Басанцова Н.Ю. ....    | 911 | Жижица О.Л. ....       | 937 | Курочкина Ю.Д. ....   | 835 | Паскова Е.В. ....    | 953 | Турганбекова А.А. .... | 965 |
| Башкина О.А. ....      | 807 | Зайнетдинова Л.Ф. .... | 895 | Лазаренко Л.Л. ....   | 997 | Пахнова Л.Р. ....    | 807 | Тыринова Т.В. ....     | 835 |
| Белоусов П.В. ....     | 945 | Закревский Ю.Н. ....   | 973 | Лапин С.В. ....       | 911 | Повешенко О.В. ....  | 861 | Ульянова Л.И. ....     | 987 |
| Беляева Е.Н. ....      | 911 | Зинченко Ю.С. ....     | 911 | Леплина О.Ю. ....     | 835 | Поленок Е.Г. ....    | 869 | Учеваткина А.Е. ....   | 919 |
| Берзина А.Г. ....      | 987 | Зуева Е.В. ....        | 997 | Луценко В.А. ....     | 869 | Полищук В.Б. ....    | 877 | Филиппова Л.В. ....    | 919 |
| Боголюбова А.В. ....   | 945 | Ищенко А.М. ....       | 987 | Лыков А.П. ....       | 861 | Постовская А.М. .... | 847 | Фомичев А.В. ....      | 861 |
| Богомолов П.О. ....    | 945 | Ищук В.Н. ....         | 973 | Мазинг А.В. ....      | 911 | Рак А.Я. ....        | 987 | Фролова Е.В. ....      | 919 |
| Богомолова Т.С. ....   | 919 | Камышный А.М. ....     | 821 | Майоров А.Ю. ....     | 945 | Рамильева И.Р. ....  | 965 | Хамаганова Е.Г. ....   | 847 |
| Бодрова И.В. ....      | 981 | Каневский Л.М. ....    | 959 | Малкова А.М. ....     | 911 | Романюк Д.С. ....    | 847 | Хамитова И.В. ....     | 997 |
| Бондаренко Н.А. ....   | 861 | Квятковская С.В. ....  | 895 | Малько Д.Б. ....      | 847 | Сависко А.А. ....    | 877 | Хмелевская А.А. ....   | 847 |
| Борзова Ю.В. ....      | 919 | Ким И.И. ....          | 861 | Маркелова Е.В. ....   | 953 | Самотруева М.А. .... | 807 | Черных Е.Р. ....       | 835 |
| Буркитбаев Ж.К. ....   | 965 | Климко Н.Н. ....       | 919 | Махмутова В.Р. ....   | 919 | Сергеева В.Е. ....   | 987 | Чернявский А.М. ....   | 861 |
| Васильева Г.В. ....    | 877 | Климова Т.А. ....      | 987 | Мацевич М.В. ....     | 945 | Сизиков А.Э. ....    | 835 | Чудилова Г.А. ....     | 885 |
| Васильева Н.В. ....    | 919 | Ковалева С.В. ....     | 885 | Медведева С.Ю. ....   | 929 | Симбирцев А.С. ....  | 987 | Чумасова О.А. ....     | 835 |
| Васянина К.А. ....     | 981 | Коваленко Е.И. ....    | 959 | Мезенцева Е.А. ....   | 895 | Спелков А.А. ....    | 959 | Шафигуллина З.А. ....  | 929 |
| Вафин И.А. ....        | 869 | Коваль Г.Д. ....       | 821 | Меличкина А.М. ....   | 997 | Станкова Н.В. ....   | 987 | Шахгельдян К.И. ....   | 953 |
| Верхбицкая Н.Е. ....   | 869 | Ковязина Н.А. ....     | 937 | Митропанова М.Н. .... | 885 | Старшинова А.А. .... | 911 | Шмитко А.Д. ....       | 877 |
| Гамалея Н.Б. ....      | 987 | Козлова Я.И. ....      | 919 | Мишина Е.Е. ....      | 945 | Степаненко Т.А. .... | 919 | Шульгина М.В. ....     | 919 |
| Гельцер Б.И. ....      | 953 | Коккина К.Ю. ....      | 945 | Морозова О.В. ....    | 821 | Стрельцова М.А. .... | 959 | Яблонский П.К. ....    | 911 |
| Герцев А.В. ....       | 973 | Колпинский Г.И. ....   | 869 | Мун С.А. ....         | 869 | Сулутьян А.Э. ....   | 835 |                        |     |

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

|                                                           |          |                                          |     |                                        |                         |
|-----------------------------------------------------------|----------|------------------------------------------|-----|----------------------------------------|-------------------------|
| аллель-специфичная ПЦР в реальном времени.....            | 847      | кожные пробы .....                       | 998 | РТПЛ .....                             | 847                     |
| аллель-специфичный праймер.....                           | 847      | компоненты молока .....                  | 937 | РТПХ .....                             | 847                     |
| аллергический бронхолегочный аспергиллез.....             | 920      | корь .....                               | 877 | секвенирование .....                   | 960                     |
| анергия .....                                             | 835      | костномозговые стволовые клетки.....     | 861 | секреторный IgA.....                   | 981                     |
| анти-MCV.....                                             | 912      | лимфоидная ткань.....                    | 981 | синусоидальные клетки .....            | 930                     |
| антигены .....                                            | 966      | МАГ .....                                | 847 | системный иммунитет .....              | 895                     |
| антиидиотипические антитела .....                         | 988      | местный иммунитет .....                  | 981 | слюнные железы .....                   | 981                     |
| антитела .....                                            | 869, 988 | микогенная сенсибилизация .....          | 920 | специфические IgE .....                | 937, 998                |
| апоптоз .....                                             | 835      | минорные антигены гистосовместимости ..  | 847 | стеатоз.....                           | 946                     |
| АС-ПЦР-РВ.....                                            | 847      | модифицированный                         |     | стероидные гормоны.....                | 869                     |
| АСП.....                                                  | 847      | цитруллинированный виментин .....        | 912 | тест активации базофилов .....         | 920                     |
| атеросклероз .....                                        | 974      | молекулярно-генетический метод.....      | 966 | тетрахлорметан .....                   | 930                     |
| ауто-СКЛ .....                                            | 835      | моноклональные антитела.....             | 988 | трансплacentарные антитела .....       | 877                     |
| аутоантитела .....                                        | 912      | морфин .....                             | 988 | тревожность.....                       | 974                     |
| бинарный классификатор.....                               | 953      | муковисцидоз .....                       | 920 | туберкулез.....                        | 912                     |
| вакцинация.....                                           | 877      | наружный генитальный эндометриоз .....   | 895 | уреаплазменная инфекция .....          | 895                     |
| виментин .....                                            | 912      | неалкогольная жировая болезнь печени ... | 946 | факторы ангиогенеза .....              | 877                     |
| вирус папилломы человека высокого онкогенного риска ..... | 895      | неалкогольный стеатогепатит.....         | 946 | цитокнины.....                         | 835, 861, 930, 953, 974 |
| врожденные расщелины губы и неба .....                    | 886      | нейроиммунокутаные взаимодействия... 808 |     | экспериментальный сахарный диабет..... | 822                     |
| генотипирование .....                                     | 960      | нейроиммуноэндокринные                   |     | эритропоэтин .....                     | 861                     |
| глотка .....                                              | 981      | взаимодействия .....                     | 808 | эстрадиол .....                        | 869                     |
| гормональные рецепторы .....                              | 869      | нейтрофильные гранулоциты .....          | 886 | язык .....                             | 981                     |
| дексаметазон .....                                        | 835      | нижняя челюсть .....                     | 953 | Ang-1 .....                            | 877                     |
| дендритные клетки.....                                    | 835      | новорожденные .....                      | 877 | <i>Aspergillus fumigatus</i> .....     | 920                     |
| депрессия .....                                           | 974      | ОНП .....                                | 847 | <i>Aspergillus spp.</i> .....          | 920                     |
| дети .....                                                | 886      | острый миелоидный лейкоз.....            | 966 | HA-1 .....                             | 847                     |
| диффузное токсическое повреждение печени.....             | 930      | патологический процесс .....             | 808 | HLA-система .....                      | 966                     |
| иммуноферментный анализ .....                             | 988      | педиатрия .....                          | 937 | Immulate .....                         | 998                     |
| ингалиционные аллергены .....                             | 998      | пентоксифиллин .....                     | 822 | M-клетки .....                         | 822                     |
| интенсивность аллергической реакции ...                   | 937      | пищевая аллергия.....                    | 937 | MHC .....                              | 960                     |
| интерферон-α .....                                        | 835      | поликлональные антитела .....            | 988 | MICA .....                             | 960                     |
| искусственная нейронная сеть .....                        | 953      | полость рта .....                        | 981 | NKG2D .....                            | 960                     |
| ишемическая болезнь .....                                 | 974      | популяционный анализ .....               | 960 | Phadia .....                           | 998                     |
| ишемическая болезнь сердца.....                           | 861      | посттравматический остеомиелит .....     | 953 | TGF-β .....                            | 877                     |
| кишечно-ассоциированная                                   |          | провоспалительные цитокины .....         | 946 | TLR2 .....                             | 822                     |
| лимфоидная ткань.....                                     | 822      | прогестерон .....                        | 869 | TLR4 .....                             | 822                     |
|                                                           |          | рак молочной железы.....                 | 869 | Toll-подобные рецепторы .....          | 946                     |
|                                                           |          | ревматоидный артрит.....                 | 835 | Tr1 .....                              | 835                     |
|                                                           |          | регуляция регенерации .....              | 808 | VEGF .....                             | 877                     |
|                                                           |          | репаративная регенерация .....           | 808 | β-эндорфин .....                       | 974                     |



## **XI Всероссийская школа по клинической иммунологии**

### **«ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»**

**2 – 8 февраля 2020 года**

**Пушкинские Горы, Псковская область**

#### **Организаторы:**

Министерство здравоохранения  
Российской Федерации

Российская Академия Наук

Федеральная служба по надзору  
в сфере защиты прав потребителей  
и благополучия человека

Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга  
Администрация Псковской области

\*\*\*\*\*

ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России

Институт экспериментальной медицины

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

\*\*\*\*\*

Российское научное общество иммунологов

Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов

Российское цитокиновое общество

Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»

Санкт-Петербургское региональное отделение Российской Ассоциации  
Аллергологов и Клинических Иммунологов

#### **В программе школы:**

- Лекции ведущих российских иммунологов
- Лекции зарубежных специалистов
- Семинары по практическим вопросам иммунологии

#### **Пакет слушателя включает:**

- Посещение лекций и семинаров
- Проживание
- 3-разовое питание
- Трансфер Псков – Пушкинские Горы и обратно

**Всем слушателям будут выданы удостоверения о тематическом усовершенствовании установленного образца и зарегистрированные на сайте НМО [www.sovetnmo.ru](http://www.sovetnmo.ru) получают 12 зачетных единиц (кредитов) по специальности: «аллергология и иммунология» или «клиническая лабораторная диагностика»**

#### **Координатор проекта:**

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

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

тел./факс: (812) 232-00-66

e-mail: [totolian@spbraaci.ru](mailto:totolian@spbraaci.ru)

**Заявки подавать до 31 декабря 2019 года.**

**Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна**

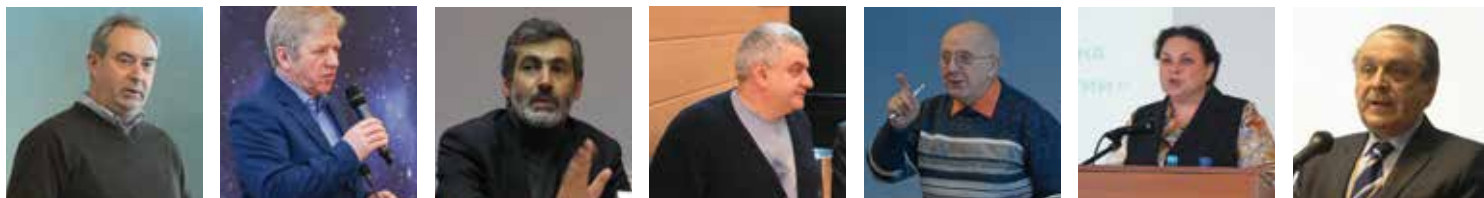
Тел./факс: (812) 233-08-58

e-mail: [shkola@spbraaci.ru](mailto:shkola@spbraaci.ru)

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

[www.spbraaci.ru](http://www.spbraaci.ru)

[www.allergologi-immunologi.ru](http://www.allergologi-immunologi.ru)



**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:**  
РОСПЕЧАТЬ – 83030  
ПРЕССА РОССИИ – 42311

