

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

Том 21, № 3. С. 373-580

2019

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

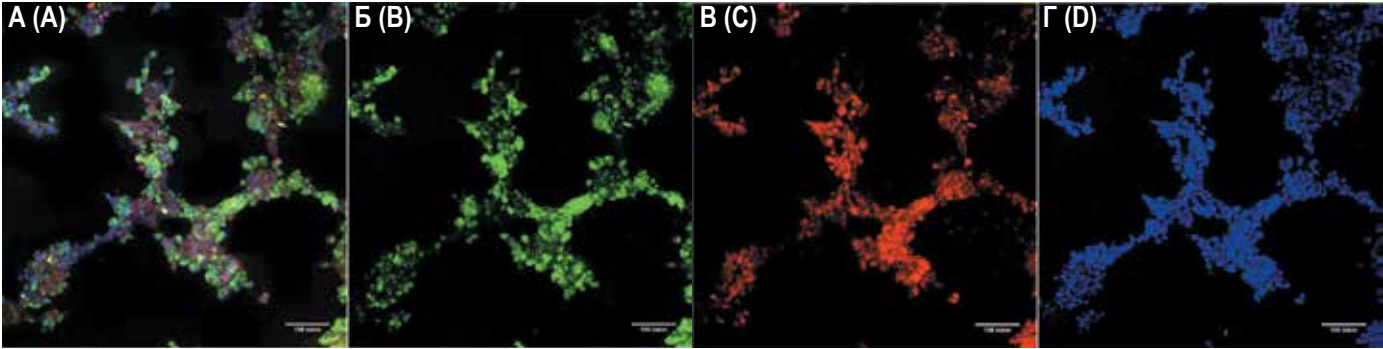


Figure 2. Mutual arrangement of endothelial cells and trophoblast cells in cell strands, x200
Note. A, superposition of green (endothelial cells), red (trophoblast cells) and blue (nuclei stained with DAPI) channels. B, endothelial cells stained with Calcein AM. C, trophoblast cells stained with SNARF-1. D, nuclei, endothelial cells and trophoblast cells stained with DAPI.

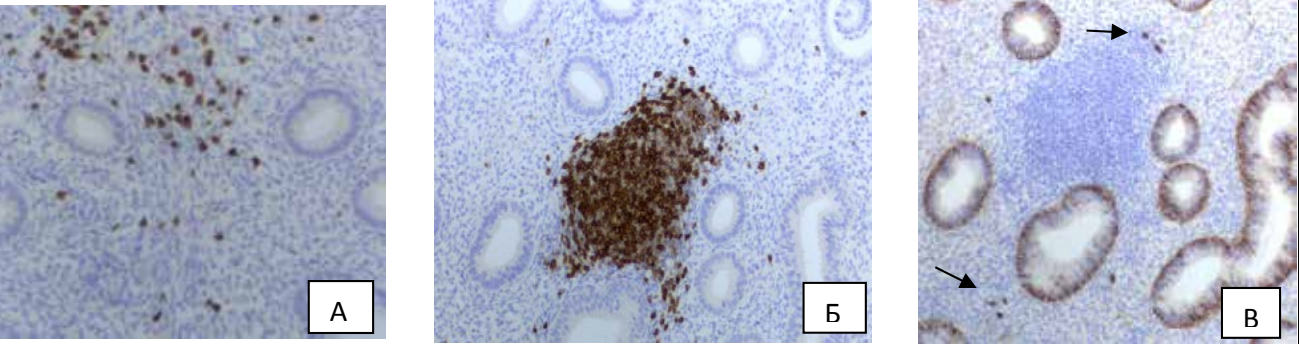


Рисунок 1. Результаты ROC-анализа для биомаркеров CD138⁺ ПК и CD20⁺В-лимфоцитов в эндометрии, характеризующих хронический эндометрит.
Примечание. Обозначения: AUC – площадь под ROC-кривой; COP – оптимальная точка отсечения; ДЗ – доверительная зона; границы ДИ указаны в виде подстрочных индексов.

Figure 1. Results of ROC analysis for the biomarkers of CD138⁺ PC and CD20⁺B lymphocytes in the endometrium, characterizing of chronic endometritis.

Note. Notations: AUC, area under ROC-curve; COP, cut-off-point; CZ, confidence zone.

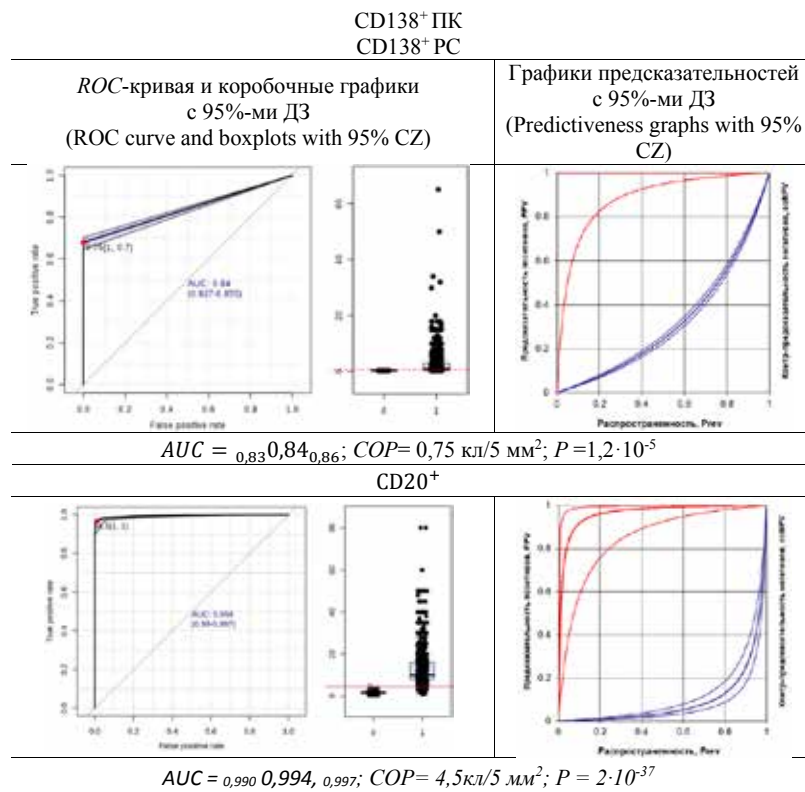


Рисунок 2. Хронический эндометрит
Примечание. А – CD20⁺В-лимфоциты диффузно-рассеянные в строме эндометрия, иммуногистохимическая реакция, ув. x100; Б – образование фолликула из CD20⁺В-лимфоцитов, иммуногистохимическая реакция, ув. x100; В – (тот же слайд) CD138⁺ плазматические клетки расположены по периферии фолликула из CD20⁺В-лимфоцитов, иммуногистохимическая реакция, ув. x100.

Figure 2. Chronic endometritis
Note. A, diffusely scattered CD20⁺B lymphocytes in the endometrium, immunohistochemistry; B, formation of follicles of CD20⁺B lymphocytes in the endometrium, immunohistochemistry x100; C, (the same slaid) CD138⁺ plasma cells are located on the periphery of follicles.

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

май-июнь

2019, том 21

№ 3

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 02.07.2019 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 26. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 967

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

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

Тел.: (812) 950-10-99.

С 2001 года журнал «Медицинская иммунология» регулярно входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ

С июня 2016 года журнал «Медицинская иммунология» включен в международную базу SCOPUS.

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

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

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

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

May-June

2019, volume 21

No. 3

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

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

Address for correspondence:

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

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

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

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

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

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

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 02.07.2019. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 26. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

199178, Russian Federation, St. Petersburg, 8 line of Vasilevsky Island, 83/1-A

Phone: (812) 950-10-99

Since 2001, the Medical Immunology Journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific Journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science

Since June 2016, the Medical Immunology Journal is included into international SCOPUS database

Boris V. Pinegin – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnosics and Immunotherapy, Chief, Moscow, Russian Federation

Andrei S. Simbirtsev – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation

Viacheslav S. Smirnov – PhD, MD, Professor, "Cytomed" Ltd., Director on Science, St. Petersburg, Russian Federation

Rahim M. Khaitov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation

Elena R. Chernykh – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Deputy-director on Science, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Chief, Novosibirsk, Russian Federation

Editorial Council

Eugen Feist – PD, MD, Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Free University and Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany

Sophia Khaldoyanidi – PhD, MD, Associate Member, Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA, USA

Elena Lasunskaja – PhD, MD, Associated Professor, Laboratory of Biology of Recognition, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil

László Maródi – PhD, MD, Professor, Department of Infectious and Pediatric Immunology, University of Debrecen Medical and Health Science Centre, Debrecen, Hungary

Jaroslav Michálek – PhD., MD, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Dirk Roggenbuck – PhD, MD, Professor, Lausitz University of Applied Sciences, Senftenberg, Germany

Seung-Yong Seong – PhD, MD, Seoul National University, Associate Dean for Planning, Department of Microbiology and Immunology, Chief, Seoul, South Korea

Yevgeny Tendler – PhD, MD, Department of Clinical Biochemistry, Rambam Medical Center, Haifa, Israel

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Сенников С.В., Альшеевская А.А., Жукова Ю.В., Беломестнова И.А., Караулов А.В., Лопатникова Ю.А. ПЛОТНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ К ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫМ МЕДИАТОРАМ КАК МОДУЛИРУЮЩИЙ КОМПОНЕНТ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МЕДИАТОРОВ НА КЛЕТКУ (ЧАСТЬ 2)	379
Никонова А.А., Хаитов М.Р., Хаитов Р.М. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АГОНISTОВ И АНТАГОНISTОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ	397
Тимашева Я.Р. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ	407

Оригинальные статьи

Газатова Н.Д., Меняйло М.Е., Малащенко В.В., Гончаров А.Г., Мелашенко О.Б., Морозова Е.М., Селедцов В.И. ПРЯМЫЕ ЭФФЕКТЫ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МОНОЦИТОВ/МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА	419
Маркова К.Л., Степанова О.И., Шевелева А.Р., Костин Н.А., Михайлова В.А., Сельков С.А., Соколов Д.И. ВЛИЯНИЕ НК-КЛЕТОК НА АНГИОГЕНЕЗ В УСЛОВИЯХ КОНТАКТНОГО И ДИСТАНТНОГО СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ И КЛЕТКАМИ ТРОФОБЛАСТА	427
Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Коненков В.И., Климонтов В.В., Тянь Н.В., Черных Д.В., Трунов А.Н., Черных В.В. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ (MMP2, MMP3, MMP9) И ГЕНА НЕОАНГИОГЕНЕЗА (VEGF) ПРИ МИКРОАНГИОПАТИЯХ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА	441
Эллиндиди В.Н., Хромов-Борисов Н.Н., Феоктистов А.А., Лямина А.В., Калинина Н.М. CD20 ⁺ В-ЛИМФОЦИТЫ – ВЫСОКОИНФОРМАТИВНЫЙ БИОМАРКЕР ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА	451
Акушева Д.Н., Хохлова О.Е., Камшилова В.В., Мотова А.И., Перьянова О.В., Улирова А.А., Поткина Н.К., Ямамото Тамсуо ВНЕБОЛЬНИЧНАЯ ПНЕВМОНИЯ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ: МИКРОФЛОРА, АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, РОЛЬ В РАЗВИТИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ CD4-ЛИМФОЦИТОВ	457
Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Баранова О.П., Головкин А.С., Исаков Д.В., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тополян Арег А. ЭКСПРЕССИЯ CD39 РЕГУЛЯТОРНЫМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ И ОСТРОМ САРКОИДОЗЕ	467
Зинченко Ю.С., Старшинова А.А., Филатов М.В., Денисова Н.В., Ланда С.Б., Бурдаков В.С., Яблонский П.К. АУТОИММУННАЯ ПРИРОДА САРКОИДОЗА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ	479
Калинина Е.П., Гельцер Б.И., Курпатов И.В., Горбунова Т.В., Геозденко Т.А. ОЦЕНКА РОЛИ ЦИТОКИН-ОПОСРЕДОВАННЫХ МЕХАНИЗМОВ В РАЗВИТИИ ДИСФУНКЦИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ	487
Виткина Т.И., Новгородцева Т.П., Калинина Е.П., Лобанова Е.Г., Антонюк М.В. ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ КОНТРОЛИРУЕМОГО И ЧАСТИЧНО КОНТРОЛИРУЕМОГО ТЕЧЕНИЯ	495
Барковская М.Ш., Блинова Е.А., Гришина Л.В., Леонова М.И., Непомнящих В.М., Демина Д.В., Козлов В.А. СОДЕРЖАНИЕ CD4 ⁺ И CD8 ⁺ ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК ПАМЯТИ И ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ	503
Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Устьянцева Л.С., Шамова К.П., Бычкова С.В., Боцьковская М.А., Газиева И.А. ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С БРОНХОЛЕГочНОЙ ДИСПЛАЗИЕЙ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ	517
Гордукова М.А., Корсунский И.А., Чурсинова Ю.В., Бяхова М.М., Оскорбин И.П., Продеус А.П., Филипенко М.Л. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕФЕРЕНСНЫХ ИНТЕРВАЛОВ ТРЕС И КРЕС ДЛЯ СКРИНИНГА НОВОРОЖДЕННЫХ С ИММУНОДЕФИЦИТНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ В РФ	527

Краткие сообщения

Кутилин Д.С., Могушкова Х.А. ВЛИЯНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИБИОТИКОВ АНТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ РАКОВО- ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ В МОДЕЛЬНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HeLa	539
Костюченко М.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Лозвиненко О.В., Курчева С.А., Бердникова Т.В., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. ИЗУЧЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНОГО ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ БРУЦЕЛЛЕЗА В ЛИМФОЦИТАРНЫХ ТЕСТАХ IN VITRO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНТИГЕННОГО КОМПЛЕКСА	547
Еремеев В.В., Шепелькова Г.С., Духовлинов И.В., Гергер В.Я. ПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ НОВОЙ СУБЪЕДИНИЧНОЙ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ В СОЧЕТАНИИ С ВСГ СВЯЗАН С ТОРМОЖЕНИЕМ ДИССЕМИНАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ	555
Полозова Э.И., Мосина Л.М., Новикова Л.В., Трохина И.Е., Капкаева Р.Х. ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ГИПОКСИИ И ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ ПРИ ЭРОЗИВНО-ЯЗВЕННЫХ ПОРАЖЕНИЯХ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ В УСЛОВИЯХ КОМОРБИДНОЙ ПАТОЛОГИИ	559

Иммунологические методы

Горяйнова О.С., Хан Е.О., Иванова Т.И., Тиллиб С.В. НОВЫЙ МЕТОД, БАЗИРУЮЩИЙСЯ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕННЫХ МАЖОРНЫХ БЕЛКОВ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ, СПОСОБСТВУЕТ УМЕНЬШЕНИЮ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО СИГНАЛА В ИММУНОАНАЛИЗЕ	567
НЕКРОЛОГ	576
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ	577
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	580
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	580

CONTENTS

Reviews

Sennikov S.V., Alshevskaya A.A., Zhukova Yu.V., Belomestnova I.A., Karaulov A.V., Lopatnikova Yu.A. EXPRESSION DENSITY OF RECEPTORS FOR IMMUNOREGULATORY MEDIATORS AS A MODULATORY COMPONENT OF BIOLOGICAL EFFECTS OF MEDIATORS UPON CELLS (PART 2).....	379
Nikonova A.A., Khaitov M.R., Khaitov R.M. PROSPECTS OF TOLL-LIKE RECEPTOR AGONISTS AND ANTAGONISTS FOR PREVENTION AND TREATMENT OF VIRAL INFECTIONS.....	397
Timasheva Ya.R. IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF ESSENTIAL HYPERTENSION.....	407

Original articles

Gazatova N.D., Meniaillo M.E., Malashchenko V.V., Goncharov A.G., Melashchenko O.B., Morozova E.M., Seledtsov V.I. DIRECT EFFECTS OF GM-CSF ON THE FUNCTIONS OF HUMAN MONOCYTES/MACROPHAGES.....	419
Markova K.L., Stepanova O.I., Sheveleva A.R., Kostin N.A., Mikhailova V.A., Selkov S.A., Sokolov D.I. NATURAL KILLER CELL EFFECTS UPON ANGIOGENESIS UNDER CONDITIONS OF CONTACT-DEPENDENT AND DISTANT CO-CULTURING WITH ENDOTHELIAL AND TROPHOBLAST CELLS.....	427
Shevchenko A.V., Prokofiev V.F., Konenkov V.I., Klimontov V.V., Tyan N.V., Chernykh D.V., Trunov A.N., Chernykh V.V. POLYMORPHISMS OF EXTRACELLULAR CONNECTIVE TISSUE REMODELING PROTEINASES AND MMP2, MMP3, MMP9 GENES, AND NEOANGIOGENESIS VEGF GENE IN RETINAL MICROANGIOPATHY IN THE PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS.....	441
Ellinidi V.N., Khromov-Borisov N.N., Feoktistov A.A., Lyamina A.V., Kalinina N.M. CD20 ⁺ B LYMPHOCYTES, A HIGHLY INFORMATIVE BIOMARKER FOR EARLY DIAGNOSIS OF CHRONIC ENDOMETRITIS.....	451
Akushcheva D.N., Khokhlova O.E., Kamshilova V.V., Motova A.I., Peryanova O.V., Upirova A.A., Potkina N.K., Yamamoto Tatsuo COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN HIV-INFECTED SUBJECTS: MICROFLORA, ANTIBIOTIC RESISTANCE: DEPENDENCE ON THE LEVELS OF CD4 LYMPHOCYTES.....	457
Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Baranova O.P., Golovkin A.S., Isakov D.V., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A. CD39 ⁺ EXPRESSION BY REGULATORY T CELLS IN PULMONARY SARCOIDOSIS AND LOFGREN'S SYNDROME.....	467
Zinchenko Yu.S., Starshinova A.A., Filatov M.V., Denisova N.V., Landa S.B., Burdakov V.S., Yablonskiy P.K. AUTOIMMUNE ORIGIN OF SARCOIDOSIS: DETERMINATION OF SPECIFIC IMMUNE COMPLEXES IN PATIENTS WITH RESPIRATORY SARCOIDOSIS.....	479
Kalinina E.P., Geltser B.I., Kurpatov I.G., Gorborkova T.V., Gvozdenko T.A. EVALUATION OF CYTOKINE-MEDIATED MECHANISMS INVOLVED IN DEVELOPMENT OF RESPIRATORY MUSCLE DYSFUNCTION IN THE PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE.....	487
Vitkina T.I., Novgorodtseva T.P., Kalinina E.P., Lobanova E.G., Antonyuk M.V. IMMUNE MECHANISMS FOR DEVELOPMENT OF CONTROLLED AND PARTIALLY CONTROLLED ASTHMA.....	495
Barkovskaya M.Sh., Blinova E.A., Grishina L.V., Leonova M.I., Nepomniashchikch V.M., Demina D.V., Kozlov V.A. CONTENTS OF CD4 ⁺ AND CD8 ⁺ EFFECTOR MEMORY CELLS AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF T LYMPHOCYTES IN BRONCHIAL ASTHMA.....	503
Chistyakova G.N., Remizova I.I., Ustyantseva L.S., Shamova K.P., Bychkova S.V., Botskovskaya M.A., Gazieva I.A. FEATURES OF IMMUNE RESPONSE IN PRETERM BABIES WITH BRONCHOPULMONARY DISPLASIA OF VARIOUS SEVERITY.....	517
Gordukova M.A., Korsunsky I.A., Chursinova Yu.V., Byakhova M.M., Oscorbin I.P., Prodeus A.P., Filipenko M.L. DETERMINING REFERENCE RANGES FOR TREC AND KREC ASSAYS IN IMMUNE DEFICIENCY SCREENING OF NEWBORNS IN RUSSIAN FEDERATION.....	527

Short communications

Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A. EFFECT OF ANTHRACYCLINE ANTITUMOR ANTIBIOTICS UPON TRANSCRIPTION ACTIVITY OF CANCER-TESTIS ANTIGENS IN MODEL EXPERIMENTS WITH HeLa CELLS.....	539
Kostyuchenko M.V., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Logvinenko O.V., Kurcheva S.A., Berdnikova T.V., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. STUDYING DEVELOPMENT OF POST-VACCINAL CELLULAR IMMUNITY AGAINST BRUCELLOSIS BY MEANS OF LYMPHOCYTE IN VITRO TESTS USING AN EXPERIMENTAL ANTIGENIC COMPLEX.....	547
Yeremeev V.V., Shepelkova G.S., Dukhovlinov I.V., Gergert V.Ya. PROTECTIVE EFFECT INDUCED BY THE NEW SUBUNIT TUBERCULOSIS VACCINE WHEN USED AS A BCG BOOST IS ASSOCIATED WITH INHIBITION OF MYCOBACTERIAL DISSEMINATION.....	555
Polozova E.I., Mosina L.M., Novikova L.V., Trokhina I.E., Kapkaeva R.Kh. A RELATIONSHIP BETWEEN IMMUNOLOGICAL DISTURBANCES, HYPOXIA AND LIPOPEROXIDATION IN EROSION/ULCEROUS LESIONS OF DUODENUM IN PRESENCE OF COMORBIDITIES.....	559

Immunological methods

Goryainova O.S., Khan E.O., Ivanova T.I., Tillib S.V. A NEW METHOD BASED ON THE USE OF IMMOBILIZED SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES TO REMOVE CERTAIN MAJOR PROTEINS FROM BLOOD PLASMA HELPS TO REDUCE NONSPECIFIC SIGNAL IN AN IMMUNOASSAY.....	567
OBITUARY.....	576
INSTRUCTIONS TO AUTHORS.....	577
AUTHOR INDEX.....	580
SUBJECT INDEX.....	580

ПЛОТНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ К ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫМ МЕДИАТОРАМ КАК МОДУЛИРУЮЩИЙ КОМПОНЕНТ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МЕДИАТОРОВ НА КЛЕТКУ (ЧАСТЬ 2)

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

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

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

³ ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,
г. Новосибирск, Россия

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

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

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

С.В. Сенников, А.А. Альшевская, Ю.В. Жукова,
И.А. Беломестнова, А.В. Караулов, Ю.А. Лопатникова
«Плотность экспрессии рецепторов
к иммунорегуляторным медиаторам как модулирующий
компонент биологических эффектов медиаторов
на клетку» (часть 2) // Медицинская иммунология,
2019. Т. 21, № 3.
С. 379-396. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-379-396
© Сенников С.В. и соавт., 2019

For citation:

S.V. Sennikov, A.A. Alshevskaya, Yu.V. Zhukova,
I.A. Belomestnova, A.V. Karaulov, Yu.A. Lopatnikova
“Expression density of receptors for immunoregulatory
mediators as a modulatory component of biological effects of
mediators upon cells” (part 2), *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 3,
pp. 379-396.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-379-396
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-379-396

EXPRESSION DENSITY OF RECEPTORS FOR IMMUNOREGULATORY MEDIATORS AS A MODULATORY COMPONENT OF BIOLOGICAL EFFECTS OF MEDIATORS UPON CELLS (PART 2)

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

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

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

^c Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Работа поддержана грантом Сеченовского университета 2018.

Данная работа является продолжением обзора о рецепторах к иммунорегуляторам, который был опубликован ранее [1].

Хемокиновые рецепторы

Хемокиновые рецепторы вместе со своими лигандами цитокиновой природы — хемокинами — играют важную роль в жизни клеток и всего организма: это хемотаксис и миграция клеток, определяющие развитие организма в целом и процессы, возникающие во время нарастания воспаления, влияя на подвижность, прикрепление и инвазию лейкоцитов через стенку сосуда в паренхиму тканей [6].

Рецепторы хемокинов, как правило, экспрессируются на иммунных клетках, однако злокачественные клетки при многих онкологических заболеваниях также экспрессируют некоторые рецепторы хемокинов, которые обычно не обнаруживают на их нормальных аналогах. Было замечено, что увеличение экспрессии некоторых хемокиновых рецепторов (CXCR7, CCR7, CCR8, CXCR4) на опухолевых клетках способствует по-

вышению их подвижности за счет повышения синтеза внутриклеточного актина, его полимеризации и перераспределения в клетке. В результате образуются псевдоподии, способствующие продвижению и инвазии опухолевых клеток. С помощью такого механизма метастазируют в лимфоидные органы клетки меланомы кожи [61], цервикальной интраэпителиальной неоплазии (предраковое состояние плоскоклеточного рака шейки матки) [62], рака молочной железы [45], плоскоклеточного рака пищевода [16], желудка [40]. Помимо влияния на морфологию опухолевых клеток, хемокиновые рецепторы, экспрессирующиеся на мембране раковых клеток и взаимодействующие со своими лигандами, способствуют повышению их функциональной активности. Клетки в ответ секретируют факторы роста, в частности VEGF [60], в результате чего происходит увеличение плотности лимфатических сосудов в опухоли и тем самым увеличивается лимфогенное распространение рака. Общей тенденцией, обозначаемой авторами при исследовании изменения экспрессии хемокиновых рецепторов на поверхности клеток клиниче-

ских образцов, было то, что высокая экспрессия хемокиновых рецепторов коррелирует с тяжестью онкологической патологии, увеличением риска развития рецидива, а также смерти. Пациенты, чьи образцы имели высокую плотность этих рецепторов, имели более неблагоприятный прогноз заболевания, в отличие от пациентов, образцы ткани которых имели низкую экспрессию рецепторов либо не имели ее вообще.

Однако в отношении экспрессии CX3CR1 хемокинового рецептора на клетках колоректального рака были получены обратные результаты [18]. Низкая экспрессия этого рецептора приводила к уменьшению общей выживаемости и увеличению частоты прогрессирования. Также в исследовании было отмечено, что сигнализация через CX3CR1 приводит к достаточно сильному адгезивному взаимодействию между раковыми клетками, предотвращая, таким образом, их распространение по организму.

Хемокиновые рецепторы не только определяют характер и тип развития онкологической патологии, но и играют роль в развитии инфекционных заболеваний. Было показано [24], что высокая экспрессия рецепторов CCR5 и CXCR4 способствует проникновению и репликации макрофаготропного и Т-клеточно-тропного ВИЧ-1, соответственно, в CD4-позитивные клетки организма. В частности, были определены возможные механизмы сокращения уровня экспрессии CCR5 на лимфоцитах – гетерозиготность по мутации Δ32 гена CCR5 [49], полиморфизм гена хемокиновых рецепторов CCR5-2459 A/G и CCR2-64I [26].

Высокая плотность экспрессии CX3CR1 в атеросклеротических бляшках сонных артерий приводила к развитию в них воспалительного процесса, что увеличивало риск разрыва и образования тромбоза. При этом низкая экспрессия CX3CR1 характеризовалась наличием фиброза, как показателя стабильности бляшки. Эти данные свидетельствуют о том, что оценка уровня экспрессии CX3CR1 может являться предиктором нестабильности атеросклеротической бляшки [41].

Таким образом, изменение плотности экспрессии хемокиновых рецепторов на клетках может определять морфологические и функциональные изменения в клетках, что приводит к развитию патологического процесса.

Рецепторы семейства TNF и рецепторы смерти (death receptors)

Члены семейства факторов некроза опухолей (TNF), включая лиганды и соответствующие рецепторы, регулируют рост нормальных клеток,

индуцируя апоптоз или повышая выживаемость и пролиферацию клеток. Между сигналами, которые вызывают эти противоположные эффекты, существует баланс, позволяющий сохранять гомеостаз нормальных клеток. В настоящее время идентифицировано по меньшей мере около 26 рецепторов семейства TNF и около 18 лигандов семейства TNF.

Надсемейство TNF-рецепторов можно разделить на две группы – содержащие и не содержащие домен смерти. В первую группу входят TNFR1 и FasR. Во вторую – TNFR2, CD40, CD30, DR4, DR5 и др. Все рецепторы широко распространены на клетках различных типов тканей и играют ключевые роли во многих физиологических процессах, включая развитие лимфоидной и нервной тканей, врожденный и приобретенный иммунитет, поддержание гомеостаза.

Известно два типа рецепторов, взаимодействующих с TNFα. Взаимодействие цитокина с TNFR1 может обеспечивать, помимо воспалительных эффектов, выживаемость клетки и апоптоз. Связываясь со вторым типом рецептора, TNFα стимулирует пролиферацию, выживаемость клеток и продукцию ими провоспалительных медиаторов, в том числе цитокинов [8]. Важно, однако, учитывать не только тип рецептора, с которым связывается TNFα, но и плотность этого рецептора на поверхности клетки-мишени, так как даже внутрипопуляционный состав клеток может отличаться по уровню экспрессии рецепторов. Основные субпопуляции иммунокомпетентных клеток (Т-лимфоциты, В-лимфоциты и моноциты) отличаются по экспрессии рецепторов 1 и 2 типа как в норме [34], так и при патологии [58], при этом изменение процента клеток, экспрессирующих соответствующий рецептор в субпопуляции, не ассоциировано с изменением плотности экспрессии рецепторов на данных клетках. При этом было установлено, что для различных заболеваний (в частности, для ревматоидного артрита) может быть характерно преобладание определенных вариантов аллельного полиморфизма рецепторов к TNFα, что также может иметь значение в развитии заболевания [59].

Hijdra D. и соавт. в своей работе показали, что три основные субпопуляции моноцитов крови отличаются по степени экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNFα. Классические моноциты (CD14⁺⁺CD16⁻) экспрессируют небольшое количество как TNFR1, так и TNFR2. Неклассические моноциты (CD14⁺CD16⁺⁺) имеют высокий уровень экспрессии 2 типа рецептора и низкий 1 типа. Промежуточные моноциты

(CD14⁺⁺CD16⁺) в большей степени экспрессируют TNFR1, в отличие от двух других популяций, и занимают переходное по уровню экспрессии TNFR2. Такое распределение экспрессии рецепторов к TNF α среди моноцитов наблюдалось на клетках как здоровых доноров, так и пациентов с саркоидозом [25].

Высокая экспрессия одного из типов рецепторов к TNF α на одних и тех же клетках приводит к развитию различных эффектов при действии цитокина. Было показано, что после трансплантации клеток костного мозга LDLR-мышам с нокаутом гена рецептора липопротеинов низкой плотности от двух групп мышей (дефицитных по гену TNFR1 и мышей дикого типа, несущих TNFR1 на клеточной мембране) не наблюдалось различий между полученными группами в уровне холестерина и триглицеридов в крови, а также в общей площади атеросклеротической бляшки (количество Т-лимфоцитов, нейтрофилов, апоптотических ядер и коллагена сходно в обеих группах). Однако у химерных мышей с нокаутом гена TNFR1 отмечалось уменьшение макрофагальной площади бляшки, снизилась способность макрофагов поглощать модифицированные ЛПНП, а также уменьшилась экспрессия данными клетками моноцитарного хемотаксического протеина 1 (MCP-1), способствующего привлечению новых моноцитов крови в очаг воспаления [69].

Роль TNF α и его рецепторов в контроле жизнеспособности клеток в физиологических и патологических состояниях до сих пор остается предметом дискуссий. Condorelli и соавт. [13] обнаружили, что недифференцированные клетки нейробластомы человека (линия клеток SK-N-BE) экспрессируют и TNFR1, и TNFR2 в сравнимых количествах и при действии TNF α повышают свою пролиферативную активность. Дифференцировка этих клеток, индуцируемая ретиноевой кислотой (РК), резко повышала экспрессию 1 типа рецептора при том же уровне экспрессии TNFR2. При дальнейшем культивировании клеток с TNF α происходило ингибирование их роста, что обнаруживалось с помощью оценки повышенного уровня каспазы-3. Блокада 2 типа рецептора на недифференцированных клетках приводила к снижению клеточной пролиферации, а на дифференцированных — к усилению ингибирующего эффекта. Блокада TNFR1 сопровождалась повышением пролиферации недифференцированных клеток и снижением ингибирующего эффекта на дифференцированных клетках. По мнению авторов, митогенный эффект, индуцированный TNF α в недифференцированных клетках, может быть результатом сбалансированной активации обоих типов ре-

цепторов, в то время как преобладающая активность TNFR1 может опосредовать уменьшение числа клеток и апоптоз, наблюдаемый в РК-дифференцированных нейронах.

TNF α -индуцированное увеличение пролиферации было обнаружено при культивировании человеческих миофибробластов, несущих оба типа рецептора к TNF α , с цитокином в различных дозах (0,1-10 нг/мл), с максимальным эффектом при 1 нг/мл [51]. Кроме того, культивирование миофибробластов в присутствии TNF α повышало инвазивную способность клеток и секрецию ими матричной металлопротеиназы 9 (MMP-9), необходимой для процессов ремоделирования миокарда. В этом случае максимальный эффект наблюдался при 10 нг/мл цитокина в культуре. Однако TNF α вызывал увеличение пролиферативного ответа только в половине исследованных клеточных популяций, что, по мнению авторов, может быть связано с различным уровнем экспрессии обоих типов рецептора на клетках. Обнаруженные эффекты авторы связывают с сигнализацией цитокина через 1 тип рецептора, поскольку его блокирование ингибировало клеточную пролиферацию и секрецию клетками MMP-9, а также значительно снижало инвазивную способность миофибробластов.

Изменение экспрессии рецепторов к TNF α существенно влияет и на приживаемость тканей при их трансплантации. По мнению Niederkorn J.Y., пересадка роговицы — старейшая, наиболее распространенная и, как правило, наиболее удачная форма аллотрансплантации твердой ткани. Несмотря на то, что HLA-соответствие не всегда выполняется, не используются системные иммунодепрессанты, в 90% случаев первичная аллотрансплантация роговицы имеет успех. В исследовании проведена трансплантация роговицы от двух групп дефицитных мышей (нокаутированных по гену либо TNFR1, либо TNFR2) в переднюю камеру глаза нормальных мышей. Отторжение трансплантатов от TNFR1-нокаутированных мышей наблюдалось в 53% случаев. В противоположность этому, все роговичные трансплантаты от TNFR2-нокаутированных мышей были отторгнуты (100%). Таким образом, отсутствие 2 типа рецептора к TNF α повышает риск отторжения трансплантата роговицы. Это также свидетельствует, что передача сигналов через TNFR2 на донорских клетках способствует развитию различных иммунорегуляторных событий, которые предотвращают индукцию аллоиммунитета [47].

Экспрессия рецепторов семейства TNF может меняться в ходе неопластических процессов. Так, повышение экспрессии DR4 и TNFR2 на опухолевых клетках у пациентов с карциномой яични-

ка или раком молочной железы ухудшает течение заболевания и способствует прогрессированию болезни, в результате чего снижается общая выживаемость и выживаемость без прогрессирования заболевания у пациентов. Увеличение количества DR5 и FasR на мембране раковых клеток повышает резистентность опухоли к химиотерапии при рецидиве болезни (но не влияет на лечение первичного заболевания) [17]. Повышение экспрессии BCMA (рецептор для BAFF) на клетках хронического лимфолейкоза снижает длительность периода выживаемости без прогрессирования заболевания и увеличивает риск развития рецидива болезни [19].

Сигнализация через Fas-рецептор (CD95, Apo-1) является одним из ключевых механизмов подавления опухолевого роста. Как отмечается в литературных источниках, восприимчивость к CD95-опосредованному апоптозу в значительной степени снижается во многих злокачественных опухолях, что может играть важную роль в опухолевой прогрессии, иммунном уклонении опухолевых клеток, а также устойчивости к химиотерапии. Даже клетки, по всем показателям принадлежащие к одному типу опухоли, но полученные от разных пациентов, различаются по степени экспрессии FasR. Поэтому от плотности рецепторов на клетке и будет зависеть ее ответ при действии FasL.

Zoi-Toli O. и соавт. в своих исследованиях показали, что высокая экспрессия FasR на опухолевых клетках кожной В-клеточной [72] и кожной Т-клеточной [73] лимфом была связана с уменьшением прогрессии опухоли, со снижением риска развития рецидивов заболевания и смерти, а пациенты в этом случае имели более благоприятный исход болезни. Исследование различной плотности экспрессии FasR на опухолевых клетках человеческого рака почки показало, что степень дифференцировки опухоли была обратно пропорциональна экспрессии FasR: чем выше плотность рецептора на клетках, тем менее дифференцирована опухоль [52]. Противоположный результат был получен на образцах немелкоклеточного рака легких (НМРЛ): в бронхо-альвеолярной карциноме, являющейся наиболее дифференцированной из всех типов НМРЛ, наблюдалась наиболее высокая степень экспрессии FasR [31]. Авторы отмечают также, что пациенты с низкоэкспрессирующими типами НМРЛ имели более короткий период выживаемости и более высокую стадию заболевания (по TMN-классификации).

Говоря о роли рецепторов семейства TNF, следует затронуть еще одну группу патологических процессов, таких как аутоиммунные за-

болевания. Sellam J. и соавт. показывают, что снижение уровня экспрессии рецептора BAFF на В-лимфоцитах способствует повышению активности заболевания у больных СКВ (по оценке SLEDAI) и развитию внежелудочных поражений у пациентов с первичным синдромом Шегрена [57]. Изменение экспрессии BAFF-R может играть роль в развитии заболеваний щитовидной железы. В частности, высокая экспрессия рецептора на мононуклеарных клетках крови (в основном на В-лимфоцитах, имеющих более высокую плотность рецептора) способствует еще большей инфильтрации железы этими клетками при тиреоидите Хашимото (фолликулярная инфильтрация) и болезни Грейвса (диффузная инфильтрация) [10].

При исследовании плотности экспрессии рецепторов TNF α в норме, у больных ревматоидным артритом [3, 34], больных атопическим дерматитом [33] и больных активных туберкулезом легких [2] было показано, что интактные клетки субпопуляций МНК ПК различаются как по относительному проценту клеток, экспрессирующих рецепторы 1 и 2 типа к TNF α , так и по абсолютному числу рецепторов на них. При этом увеличение или уменьшение плотности экспрессии рецепторов на клетках при патологии по сравнению с нормой не всегда происходит с изменением процента клеток, несущих данные рецепторы. В частности, как у здоровых, так и у больных РА вне зависимости от активности воспалительного процесса для субпопуляции Т-лимфоцитов характерен наибольший процент клеток, экспрессирующих рецептор 2 типа, при наименьшей плотности экспрессии рецепторов обоих типов на них. Это может свидетельствовать о том, что для клеток данной субпопуляции предельно допустимая плотность рецепторов низкая, но при этом данная популяция клеток является более чувствительной к действию медиатора и имеющаяся плотность является достаточной для связывания рецепторов с цитокинами и реализации эффектов TNF α на них. Также во всех исследованных группах выявляется ряд четких закономерностей по субпопуляциям с наибольшим процентом клеток, экспрессирующих рецепторы 2 типа, и по субпопуляциям с минимальной и максимальной плотностью экспрессии рецепторов обоих типов на клетках. Выявленные особенности распределения рецепторов по субпопуляциям позволяют говорить о наличии популяционно-зависимой экспрессии, характеризующей рецепторный аппарат TNF α , и о том, что изменение процента клеток в субпопуляции, экспрессирующих соответствующий рецептор,

и плотность экспрессии рецепторов на клетке регулируются различными механизмами.

Таким образом, изменение уровня экспрессии рецепторов семейства TNF приводит к различным ответам клеток при воздействии соответствующего цитокина: изменение интенсивности пролиферации клеток, секреции ими различных медиаторов, индукция апоптоза и др. Если это происходит в условиях патологии, то эффект цитокина на клетки с измененным уровнем экспрессии рецепторов будет определять исход заболевания, а в некоторых случаях повышенная или пониженная экспрессия рецептора может стать дополнительным диагностическим критерием активности заболевания.

Заключение

При связывании различных цитокинов с рецепторами эффекты, оказываемые на клетку, моделируются несколькими вариантами взаимодействий. При этом конечный эффект на клетку может определяться изменениями на различных этапах взаимодействия медиатора и клетки (рис. 1). В то же время стандартно определяемый уровень растворимых факторов является лишь одним из многих параметров, регулирующих данные взаимодействия.

Благодаря этому запуск разных сигнальных путей и, как следствие, достижение определен-

ного эффекта в клетке зависят, в том числе, и от компонентов, формирующих цитокин-рецепторный комплекс.

При обобщении литературных данных о влиянии плотности экспрессии рецепторов к различным интерлейкинам было выявлено, что изменение уровня экспрессии рецепторов имеет большое значение в оценке функционального ответа клетки на медиатор и в развитии патологических состояний (табл. 1). В исследованиях подтверждены данные о влиянии плотности рецепторов на процессы пролиферации и апоптоза, а также обменные процессы, что является триггером в развитии аутоиммунных, онкологических и дистрофических заболеваний.

Для всех рассмотренных классов регуляторных молекул характерным является изменение плотности экспрессии рецепторов как одного из ключевых моментов регулирования функциональной активности клеток. Таким образом, изучение уровня экспрессии рецепторов на мембране клеток является важным в понимании патогенеза, а изменение уровня экспрессии может рассматриваться как терапевтическая мишень в лечении различных заболеваний.

Поскольку уровень плотности экспрессии рецепторов к факторам роста имеет наибольшее значение в развитии онкологических процессов, этот механизм важно учитывать, так как он влияет на трансформацию клетки, а также течение

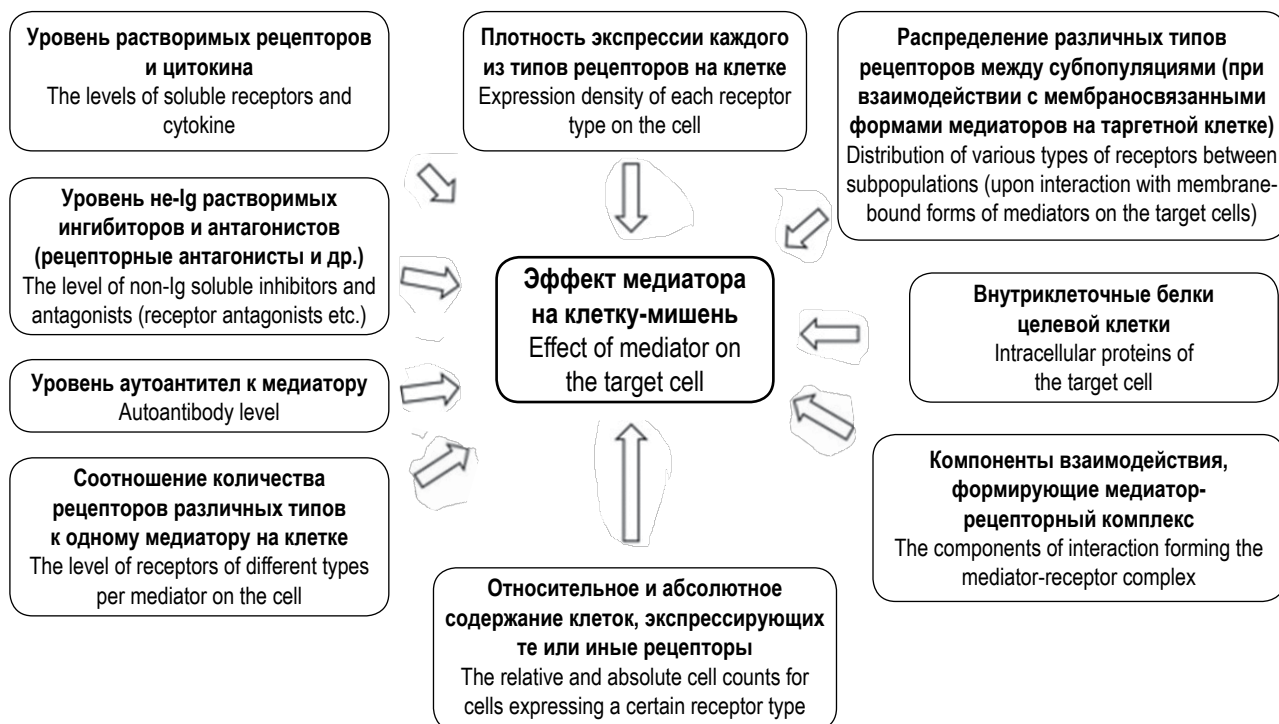


Рисунок 1. Факторы, определяющие тип и выраженность эффектов медиатора на клетку-мишень

Figure 1. Factors determining the type and intensity of effects of a mediator on the target cell

ТАБЛИЦА 1. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ИЗМЕНЕНИЯМ В ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ К ОСНОВНЫМ КЛАССАМ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕДИАТОРОВ И ЭФФЕКТАМИ НА ТАРГЕТНЫЕ КЛЕТКИ

TABLE 1. RELATIONSHIP BETWEEN CHANGES IN THE EXPRESSION OF RECEPTORS TO THE MAIN CLASSES OF REGULATORY MEDIATORS AND EFFECTS ON TARGET CELLS

Иммуно-регуляторные молекулы Immunoregulatory molecules	Рецептор Receptor	Клетки Cells	Ассоциация изменения экспрессии с эффектом/патологией Association between change in expression and effect or pathology
Интерлейкины Interleukins	IL-20R	Кератиноциты Keratinocytes	Повышение плотности – нарушение пролиферации и дифференцировки [67] Increased expression – altered proliferation and differentiation [67]
	IL-20R	Остеокласты Osteoclasts	Снижение экспрессии – более высокая минеральная плотность костной ткани, больший объем костной ткани и толщина губчатой кости [27] Decreased expression – higher bone mineral density, greater volume of bone tissue and thicker cancellous bone [27]
	IL-31ra	Кератиноциты Keratinocytes	Повышение плотности – атопический дерматит, псориаз [20] Increased expression – atopic dermatitis, psoriasis [20]
	IL-1R1, IL-1R2	МНК периферической крови Peripheral blood mononuclear cells	Изменение плотности и процента – атопический дерматит, ревматоидный артрит; изменения плотности и процента – индексы активности заболеваний [4, 5] Changed expression – atopic dermatitis, rheumatoid arthritis; association between the changes and disease activity score [4, 5]
	IL-4R	Моноциты и Т-хелперы Monocytes and T helper cells from newborn umbilical cord blood and peripheral blood one year later	Отсутствие снижения плотности в течение первого года жизни – развитие атопического дерматита [21] Absence of decrease of expression during first year after birth – associated with the development of atopic dermatitis [21]
	IL-1R2	Эпителиальные клетки толстой кишки Colonic epithelial cells	Повышение экспрессии – злокачественная трансформация клеток и более тяжелые формы колоректального рака [38] Increased expression – malignant cell transformation and the more severe forms of colorectal cancer [38]
	IL-4R	Наивные В-клетки Naïve B cells	Высокая экспрессия α-субъединицы – улучшение выживаемости и снижение апоптоза [65] Increased expression – better survival and reduced apoptosis [65]
	IL-6R	Клетки рака поджелудочной железы Pancreatic cancer cells	Высокий уровень экспрессии – повышение инвазивной способности клеток [11] Increased expression – enhanced invasiveness of the cells [11]

Иммуно-регуляторные молекулы Immunoregulatory molecules	Рецептор Receptor	Клетки Cells	Ассоциация изменения экспрессии с эффектом/патологией Association between change in expression and effect or pathology
Интерлейкины Interleukins	IL-6R	CD14⁺ клетки перитонеальной жидкости больных эндометриозом CD14 ⁺ cells in peritoneal fluid of patients with endometriosis	Повышенная экспрессия – степень и тяжесть патологии [30] Increased expression – severity of the pathology [30]
	IL-21R	Теноциты Tenocytes	Высокая экспрессия – запуск провоспалительных механизмов [9] Increased expression – induction of proinflammatory mechanisms [9]
	IL-21R	Регуляторные Т-клетки в модели человеческого рассеянного склероза – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) Regulatory T cells in the model of human multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)	Снижение экспрессии – более раннее начало и более тяжелые признаки заболевания, однако более быстрое выздоровление [32] Decreased expression – earlier onset and more severe disease signs but contributes to earlier recovery [32]
	IL-10R	CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells	Повышенная экспрессия – более благоприятное течение СКВ [15] Increased expression is associated with a more favorable course of systemic lupus erythematosus (SLE) [15]
	IL-1R2	Линия HUC-1 HUC-1 cell line	Повышенная экспрессия – снижение экспрессии корецептора IL-1RAcP и в результате подавление ответа клетки при действии IL-1 через IL-1R1 [12] Increased expression – reduces expression of IL-1RAcP coreceptor, thus suppressing cell response to IL-1 through IL-1R1 [12]
	IL-33R	Эндотелиальные клетки сосудов Vascular endothelial cells	Повышенная экспрессия – прогрессирование атеросклеротических поражений сосудов [39] Increased expression – progression of atherosclerotic vascular lesions [39]
Интерфероны Interferons	IFNAR-2	Клетки фибросаркомы; рак поджелудочной железы Fibrosarcoma cells; pancreatic cancer cells	Пониженная экспрессия – повышение чувствительности к действию IFNβ, снижение антипролиферативного эффекта, при сохранении антивирусного эффекта вплоть до снижения уровня экспрессии рецепторов на 50% от исходного. Повышенная экспрессия – более выраженный ответ на действие IFNα [44, 56] Decreased expression – increased sensitivity to IFN β , while cells with high expression respond more readily to IFN α . A decreased expression – reduced antiproliferative effect but the antiviral effect was maintained at a high level until the level of receptor expression decreased to 50% of the initial level [44, 56]

Иммуно-регуляторные молекулы Immunoregulatory molecules	Рецептор Receptor	Клетки Cells	Ассоциация изменения экспрессии с эффектом/патологией Association between change in expression and effect or pathology
Интерфероны Interferons	IFNGR	CD4 ⁺ Т-лимфоциты CD4 ⁺ T cells	Пол-ассоциированные изменения уровня экспрессии – тяжесть протекания бронхиальной астмы [28] Sex-related alterations in the expression level – severity of the course of asthma [28]
	IFNAR-1	Колоректальный рак Colorectal cancer cells	Снижение плотности экспрессии по сравнению с нормальными клетками эпителия слизистой [29] Reduced expression density compared to that in normal mucosal epithelial cells [29]
Факторы роста Growth factors	EGFR	Эпителиальные клетки Epithelial cells	Высокая плотность – снижение безрецидивной выживаемости и повышение риска смерти при раке мочевого пузыря, молочной железы, при плоскоклеточном раке пищевода, плоскоклеточном раке головы и шеи, глиоме, при раке желудка, оральном плоскоклеточном в отличие от пациентов с низким уровнем экспрессии рецептора на клетках. Уровень экспрессии EGFR прямо пропорционален инвазивной способности клеток при плоскоклеточном раке гортани и первичном раке эндометрия [37, 42, 43, 46, 48, 53, 54, 55, 71] Increased expression – decreased recurrence-free survival and increased mortality risk in patients with bladder cancer, breast cancer, esophageal squamous cell cancer, head and neck squamous cell carcinoma, glioma, stomach cancer, oral squamous cell carcinoma as opposed to those with a low level of receptor expression on cells. Cell invasiveness was directly proportional to the EGFR expression level (laryngeal squamous cell carcinoma, primary endometrial carcinoma) [37, 42, 43, 46, 48, 53, 54, 55, 71]
	HER-3	Клетки рака желудка Gastric cancer cells	Гиперэкспрессия – ухудшение состояния больных и снижение выживаемости [7, 23] Increased expression – deterioration of patient's condition and reduced survival [7, 23]
	HER-2	Клетки аденокарциномы простаты Prostate adenocarcinoma cells	Высокая экспрессия – уровень сывороточного простатического специфического антигена [70] Increased expression – serum level of prostate-specific antigen [70]
	HER2/HER3	Клетки рака молочной железы Breast cancer cells	Наличие гетеродимеров – усиление пролиферации опухолевых клеток [36] The presence of heterodimers – enhanced tumor cell proliferation [36]
	VEGFR-2, VEGFR-3 VEGF-2, VEGF-3	Клетки эндометрия Endometrial cells	Повышение экспрессии – опухолевая трансформация клеток, повышение ангиогенеза и опухолевой прогрессии; высокая экспрессия VEGFR-3 – повышение миграционной активности клеток и инвазии в миометрий [66] Increased expression – tumor transformation of cells, increased angiogenesis and tumor progression; high level of VEGFR-3 expression is associated with enhanced migration activity of the cells and their myometrial invasion [66]

Иммуно-регуляторные молекулы Immunoregulatory molecules	Рецептор Receptor	Клетки Cells	Ассоциация изменения экспрессии с эффектом/патологией Association between change in expression and effect or pathology
Факторы роста Growth factors	VEGF-1	Клетки первичного рака яичников Primary ovarian cancer cells	Повышение экспрессии – повышение риска рецидива заболевания после удаления опухоли [68] Increased expression – increased risk of disease recurrence after tumor resection [68]
	VEGF-1, VEGF-2 VEGF-1, VEGF-2	Макрофаги, эндотелиальные клетки Macrophages, endothelial cells	Повышение экспрессии – рекрутирование макрофагов в атеросклеротические бляшки; стимулирование ангиогенеза сосудов с повышенной проницаемостью, что способствует появлению кровоизлияний и экстравазации воспалительных клеток [63] Increased expression – recruitment of macrophages into atherosclerotic plaques; stimulation of angiogenesis of vessels with enhanced permeability, which leads to hemorrhage and inflammatory cell extravasation [63]
	VEGF-1, VEGF-2 VEGF-1, VEGF-2	Нейроны, эндотелиальные клетки и астроциты Neurons, endothelial cells, and astrocytes	Изменение экспрессии – болезнь Альцгеймера [22] Altered expression – Alzheimer's disease [22]
	c-Met (рецептор фактора роста гепатоцитов) c-Met (hepatocyte growth factor receptor)	Эпителиальные клетки при карциноме носоглотки Epithelial cells in nasopharyngeal carcinoma	Повышение уровня экспрессии – повышение двигательной активности раковых клеток, способствует их метастазированию в шейные лимфатические узлы [35] Increased expression – increases motility of cancer cells, thus leading to their metastases into cervical lymph nodes [35]
	TGF- β -R1	Клетки хрящевой ткани Cartilage tissue cells	Возрастное снижение экспрессии – риск развития остеоартрита [64] Age-associated decrease of expression is a risk factor for development of osteoarthritis [64]
	Рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)	Мезенхимальные стволовые клетки Mesenchymal stem cells	Низкая плотность экспрессии – снижение миграционной способности, дифференцировки в эластин- и актин-продуцирующие фибробласты, нарушение ангиогенеза [50] Decreased expression – reduction of migration ability, differentiation of the cells into elastin- and actin-producing fibroblasts; disruption of angiogenesis [50]
	α -субъединица рецептора GM-CSF α -subunit of receptor to GM-CSF	Моноциты Monocytes	Пороговый уровень экспрессии – направление дифференцировки (в ДК или макрофаги) [14] Threshold level of expression determines the direction of differentiation (into dendritic cells or macrophages) [14]

Иммуно-регуляторные молекулы Immunoregulatory molecules	Рецептор Receptor	Клетки Cells	Ассоциация изменения экспрессии с эффектом/патологией Association between change in expression and effect or pathology
Хемокиновые рецепторы Chemokine receptors	CXCR7, CCR7, CCR8, CXCR4	Опухолевые клетки различного генеза Different-genesis tumor cells	Увеличение экспрессии – образование псевдоподий, увеличение подвижности, как следствие – инвазия и метастазирование в лимфоидные органы клеток меланомы кожи, цервикальная интраэпителиальная неоплазия (предраковое состояние плоскоклеточного рака шейки матки), рак молочной железы, плоскоклеточный рак пищевода, желудка [16, 40, 45, 61, 62] Increased expression – leads to formation of pseudopods, higher motility and, therefore, invasion and metastases of skin melanoma cells into the lymphoid organs, cervical intraepithelial neoplasia (precancerous lesion of cervical squamous cell carcinoma), breast cancer, esophageal squamous cell carcinoma, and squamous cell carcinoma of the stomach [16, 40, 45, 61, 62]
	CX3CR1	Клетки колоректального рака Colorectal cancer cells	Снижение экспрессии – уменьшение общей выживаемости и увеличение частоты прогрессирования [18] Decreased expression – reduced overall survival and increased progression rate [18]
	Корецепторы CCR5 и CXCR4 Co-receptors CCR5 and CXCR4	CD4-позитивные клетки организма CD4-positive cells of the body	Высокая экспрессия – способствует проникновению и репликации макрофаготропного и Т-клеточнотропного ВИЧ-1 [24] Increased expression – entry and replication of macrophage-tropic and T cell-tropic HIV-1 [24]
	CX3CR1	Клетки атеросклеротической бляшки (сонные артерии) Cells derived from atherosclerotic plaques (carotid arteries)	Изменение экспрессии – предиктор нестабильности атеросклеротической бляшки [41] Altered expression – predict atherosclerotic plaque instability [41]
Рецепторы семейства TNF и рецепторы смерти TNF family receptors and death receptors	TNFR1, TNFR2 TNFR1, TNFR2	МНК ПК Peripheral blood mononuclear cells	Изменение экспрессии – интегральные показатели активности заболевания при РА (DAS-28) и АД (SCORAD), тяжесть туберкулезного процесса [2, 3, 25, 33, 34, 58] Changed expression – integral disease activity score in rheumatoid arthritis (DAS-28) and atopic dermatitis (SCORAD) and with severity of tuberculosis [2, 3, 25, 33, 34, 58]
	TNFR1, TNFR2 TNFR1, TNFR2	Недифференцированные клетки нейробластомы человека (линия клеток SK-N-BE) Undifferentiated human neuroblastoma cells (SK-N-BE cell line)	Изменение соотношения на клетках – влияние на пролиферацию и дифференцировку [13] The changes in TNFR1/TNFR2 proportion in cells – affected proliferation and differentiation [13]

Иммуно-регуляторные молекулы Immunoregulatory molecules	Рецептор Receptor	Клетки Cells	Ассоциация изменения экспрессии с эффектом/патологией Association between change in expression and effect or pathology
Рецепторы семейства TNF и рецепторы смерти TNF family receptors and death receptors	TNFR2	Роговица TNFR2-нокаутированных мышей Cornea in TNFR2-knockout mice	Отсутствие – повышенный риск отторжения трансплантата роговицы [47] Absence – increases the risk of corneal graft rejection [47]
	DR4, TNFR2 DR4, TNFR2	Опухолевые клетки карциномы яичника или рака молочной железы Ovarian carcinoma cells or breast cancer cells	Повышение экспрессии – ухудшение течения заболевания, прогрессирование болезни, повышение резистентности опухоли к химиотерапии при рецидиве болезни [17] Increased expression – aggravates the course and leads to disease progression, thus reducing the overall and progression-free survival in patients; increases tumor resistance to chemotherapy in disease relapse but does not affect treatment of the primary disease [17]
	BCMA	Клетки хронического лимфолейкоза Chronic lymphocytic leukemia cells	Повышение экспрессии – снижение длительности периода выживаемости без прогрессирования заболевания и увеличение риска развития рецидива болезни [19] Increased expression – shortens the progression-free survival period and increases the risk of disease recurrence [19]
	FasR	Опухолевые клетки кожной В-клеточной и кожной Т-клеточной лимфом Cutaneous B-cell and cutaneous T-cell lymphoma cells	Высокая экспрессия – уменьшение прогрессии опухоли, снижение риска развития рецидивов заболевания и смерти [72, 73] Increased expression – reduced tumor progression, reduced risks of disease recurrence and death. Patients had a more favorable outcome in this case [72,73]
	FasR	Рак почки Kidney cancer	Степень экспрессии FasR – обратно пропорциональная степени дифференцировки опухоли [52] The degree of tumor differentiation was inversely proportional to FasR expression: the higher receptor density on the cells – the more poorly differentiated tumor [52]
	FasR	Немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) Non-small cell lung cancer (NSCLC) cells	Высокая экспрессия – наиболее дифференцированные формы НМРЛ. Низкая экспрессия – более короткий период выживаемости и более высокая стадия заболевания (по TMN-классификации) [31] The highest FasR expression level was observed in bronchoalveolar carcinoma, which is the most well-differentiated type of NSCLC. Patients with low-expressing types of NSCLC had a shorter survival period and a higher grade (according to the TMN system) [31]
	Рецептор BAFF BAFF receptor	В-лимфоциты B cells	Снижение экспрессии – повышение активности заболевания у больных СКВ (по оценке SLEDAI) и развитие внежелезистых поражений у пациентов с первичным синдромом Шегрена [57] Reduced expression increases of SLEDAI score for disease activity in SLE patients and leads to development of extraglandular lesions in patients with primary Sjögren syndrome [57]

и исход заболеваний, диагностику и их лечение. Изменение плотности экспрессии хемокиновых рецепторов на клетках может определять морфологические и функциональные изменения в клетках и, как следствие, развитие патологического процесса.

Изменение уровня экспрессии рецепторов семейства TNF приводит к различным ответам клеток при воздействии соответствующего цитокина: изменение интенсивности пролиферации клеток, секреции ими различных медиаторов, индукция апоптоза и др. В некоторых случаях повышенная или пониженная экспрессия рецептора может стать дополнительным диагностическим критерием активности заболевания или определять его исход.

Рецепторы на клетках и сам медиатор являются равноценными участниками взаимодействия. Поскольку для ряда растворимых форм регуляторов показано, что существуют пороговые уровни для ответа клетки на действие цитокина и/или для изменения эффекта на клетку, логично предположить, что аналогичные пороговые уровни существуют и для экспрессии рецепторов на клетках (рис. 2). Тогда отношение плотности экспрессии и уровень растворимого цитокина являются фактором, определяющим тип и выраженность эффектов на клетку.

Таким образом, одним из важных механизмов регуляции эффективности действия цитокинов и вариативности их биологических эффектов является плотность экспрессии рецепторов на поверхности клеток и количество рецепторов, равноправно участвующих во взаимодействии лиганда с клеткой. Поэтому при исследовании изменений в системе мембраносвязанных форм рецепторов и самого цитокина необходимо оценивать не только процентное содержание клеток, несущих рецепторы, но и количество самих экспрессируемых рецепторов.

Изучение плотности экспрессии рецепторов к медиаторам имеет важное практическое значение для понимания механизмов ответа клетки при изменении уровня экспрессии рецепторов в норме и при различных патологиях. Все это может служить терапевтической мишенью для лечения и профилактики различных заболеваний.

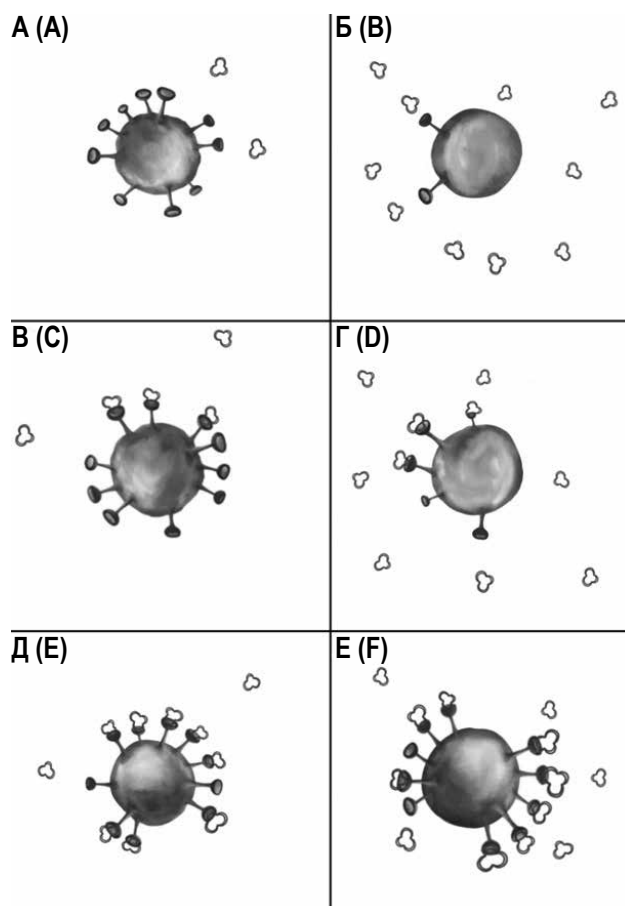


Рисунок 2. Варианты регуляции эффектов на клетку в зависимости от порогового уровня рецепторов и медиатора

Примечание. А, Б – отсутствие эффекта в связи с выраженным дефицитом одного из компонентов взаимодействия; В, Г – слабый сигнал / первый тип сигналинга; Д, Е – более сильный сигнал / второй тип сигналинга из-за достижения порогового уровня связывания для определенного рецептора.

Figure 2. The regulation of cellular effects depends on the relationship between the soluble cytokine and the density of receptors expressed on cells

Note. A, B, no effect on the cell or weak signaling because one of the interaction components is missing; C, D, typical signaling; E, F, forced signaling/another type of signaling achieves the threshold binding level for a certain receptor.

Список литературы / References

1. Сенников С.В., Альшевская А.А., Жукова Ю.В., Беломестнова И.А., Караулов А.В., Лопатникова Ю.А. Плотность экспрессии рецепторов к иммунорегуляторным медиаторам как модулирующий компонент биологических эффектов медиаторов на клетку (часть 1) // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 209-220. [Sennikov S.V., Alshevskaya A.A., Zhukova Yu.V., Belomestnova I.A., Karaulov A.V., Lopatnikova Yu.A. Expression Density of receptors for immunoregulatory mediators as a modulatory component of biological effects of mediators upon cells (part 1). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 209-220. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-209-220.

2. Alshevskaya A.A., Kireev F.D., Laushkina Z.A., Lopatnikova J.A., Gladkikh V.S., Sennikova J.A., Karaulov A.V., Sennikov S.V. Enhanced expression of TNF- α type-1 receptors by immune cells in active pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2018, Vol. 22, no. 2, pp. 212-220.
3. Alshevskaya A.A., Lopatnikova J., Shkaruba N., Chumasova O., Sizikov A., Lukinov V., Moskalev A., Sennikov S. AB0027 Expression density of receptors to TNF-ALPHA is associated with DAS-28 score in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2017, Vol. 76, p. 1056.
4. Alshevskaya A.A., Lopatnikova J.A., Krugleeva O.L., Nepomnyschih V.M., Lukinov V.L., Karaulov A.V., Sennikov S.V. Expression density of receptors to IL-1 β in atopic dermatitis. *Mol. Immunol.*, 2016, Vol. 75, pp. 92-100.
5. Alshevskaya A.A., Lopatnikova J.A., Shkaruba N.S., Chumasova O.A., Sizikov A.E., Karaulov A.V., Kozlov V.A., Sennikov S.V. Differences of IL-1 β receptors expression by immunocompetent cells subsets in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 948393. doi: 10.1155/2015/948393.
6. Arimont M., Sun S.L., Leurs R., Smit M., de Esch I.J.P., de Graaf C. Structural analysis of chemokine receptor-ligand interactions. *J. Med. Chem.*, 2017, Vol. 60, no. 12, pp. 4735-4779.
7. Begnami M.D., Fukuda E., Fregnani J.H., Nonogaki S., Montagnini A.L., da Costa W.L. Jr. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. *J. Clin. Oncol.*, 2011, Vol. 29, no. 22, pp. 3030-3036.
8. Cabal-Hierro L., Lazo P.S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal.*, 2012, Vol. 24, no. 6, pp. 1297-1305.
9. Campbell A.L., Smith N.C., Reilly J.H., Kerr S.C., Leach W.J., Fazzi U.G., Rooney B.P., Murrell G.A., Millar N.L. IL-21 receptor expression in human tendinopathy. *Mediators Inflamm.*, 2014, Vol. 2014, 481206. doi: 10.1155/2014/481206.
10. Campi I., Tosi D., Rossi S., Vannucchi G., Covelli D., Colombo F., Trombetta E., Porretti L., Vicentini L., Cantoni G., Currò N., Beck-Peccoz P., Bulfamante G., Salvi M. B cell activating factor (BAFF) and BAFF receptor expression in autoimmune and nonautoimmune thyroid diseases. *Thyroid*, 2015, Vol. 25, no. 9, pp. 1043-1049.
11. Catanzaro R., Celep G., Zerbinati N., Papacharalambous M., Nagpal R., Marotta F., Rastmanesh R., Milazzo M., Lorenzetti A., Bertuccelli G., Sollano J. *In vitro* protective effect of Celergen, a bioactive marine compound, on interleukin-6-related invasiveness of pancreatic cancer. *Acta Biomed.*, 2014, Vol. 85, no. 1, pp. 44-51.
12. Chang S.Y., Su P.F., Lee T.C. Ectopic expression of interleukin-1 receptor type II enhances cell migration through activation of the pre-interleukin 1 α pathway. *Cytokine*, 2009, Vol. 45, no. 1, pp. 32-38.
13. Condorelli F., Sortino M.A., Stella A.M., Canonico P.L. Relative contribution of different receptor subtypes in the response of neuroblastoma cells to tumor necrosis factor- α . *J. Neurochem.*, 2000, Vol. 75, no. 3, pp. 1172-1179.
14. Conti L., Cardone M., Varano B., Puddu P., Belardelli F., Gessani S. Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, no. 3, pp. 750-762.
15. Cui H.D., Qi Z.M., Yang L.L., Qi L., Zhang N., Zhang X.L., Du S.Y., Jiang Y. Interleukin-10 receptor expression and signalling were down-regulated in CD4⁺ T cells of lupus nephritis patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 2011, Vol. 165, no. 2, pp. 163-171.
16. Ding Y., Shimada Y., Maeda M., Kawabe A., Kaganoi J., Komoto I., Hashimoto Y., Miyake M., Hashida H., Imamura M. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2003, Vol. 9, no. 9, pp. 3406-3412.
17. Dong H.P., Kleinberg L., Silins I., Flørenes V.A., Tropé C.G., Risberg B., Nesland J.M., Davidson B. Death receptor expression is associated with poor response to chemotherapy and shorter survival in metastatic ovarian carcinoma. *Cancer*, 2008, Vol. 112, no. 1, pp. 84-93.
18. Erreni M., Siddiqui I., Marelli G., Grizzi F., Bianchi P., Morone D., Marchesi F., Celesti G., Pesce S., Doni A., Rumio C., Roncalli M.G., Laghi L., Mantovani A., Allavena P. The fractalkine receptor axis improves human colorectal cancer prognosis by limiting tumor metastatic dissemination. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 2, pp. 902-914.
19. Ferrer G., Bosch R., Hodgson K., Tejero R., Roué G., Colomer D., Montserrat E., Moreno C. B cell activation through CD40 and IL4R ligation modulates the response of chronic lymphocytic leukaemia cells to BAFF and APRIL. *Br. J. Haematol.*, 2014, Vol. 164, no. 4, pp. 570-578.
20. Furue M., Yamamura K., Kido-Nakahara M., Nakahara T., Fukui Y. Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy*, 2018, Vol. 73, no. 1, pp. 29-36.
21. Grzela K., Grzela T., Korczak-Kowalska G., Bocian K., Sonczyk W., Jedrasiak U., Niderla-Bielińska J., Lazarczyk M., Zagórska W., Zawadzka-Krajewska A., Feleszko W., Kulus M. Risk of allergy development correlates with IL-4 receptor expression on newborns' monocytes and Th lymphocytes. *Med. Sci. Monit.*, 2007, Vol. 13, no. 10, CR445-8.
22. Harris R., Miners J.S., Allen S., Love S. VEGFR1 and VEGFR2 in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2018, Vol. 61, no. 2, pp. 741-752.

23. He X.X., Ding L., Lin Y., Shu M., Wen J.M., Xue L. Protein expression of HER2, 3, 4 in gastric cancer: correlation with clinical features and survival. *J. Clin. Pathol.*, 2015, Vol. 68, no. 5, pp. 374-380.
24. Heredia A., Gilliam B., deVico A., Le N., Bamba D., Flinko R., Lewis G., Gallo R.C., Redfield R.R. CCR5 density levels on primary CD4 T cells impact the replication and Enfuvirtide susceptibility of R5 HIV1. *AIDS*, 2007, Vol. 21, no. 10, pp. 1317-1322.
25. Hijdra D., Vorselaars A.D., Grutters J.C., Claessen A.M., Rijkers G.T. Differential expression of TNFR1 (CD120a) and TNFR2 (CD120b) on subpopulations of human monocytes. *J. Inflamm. (Lond.)*, 2012, Vol. 9, no. 1, p. 38.
26. Hladik F., Liu H., Speelman E., Livingston-Rosanoff D., Wilson S., Sakchalathorn P., Hwangbo Y., Greene B., Zhu T., McElrath M.J. Combined effect of CCR5-Delta32 heterozygosity and the CCR5 promoter polymorphism -2459 A/G on CCR5 expression and resistance to human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J. Virol.*, 2005, Vol. 79, no. 18, pp. 11677-11843.
27. Hsu Y.H., Chen W.Y., Chan C.H., Wu C.H., Sun Z.J., Chang M.S. Anti-IL-20 monoclonal antibody inhibits the differentiation of osteoclasts and protects against osteoporotic bone loss. *J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 208, no. 9, pp. 1849-1861.
28. Ito C., Okuyama-Dobashi K., Miyasaka T., Masuda C., Sato M., Kawano T., Ohkawara Y., Kikuchi T., Takayanagi M., Ohno I. CD8⁺ T cells mediate female-dominant IL-4 production and airway inflammation in allergic asthma. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 10, e0140808. doi: 10.1371/journal.pone.0140808.
29. Katlinski K.V., Gui J., Katlinskaya Y.V., Ortiz A., Chakraborty R., Bhattacharya S., Carbone C.J., Beiting D.P., Gironde M.A., Peck A.R., Puré E., Chatterji P., Rustgi A.K., Diehl J.A., Koumenis C., Rui H., Fuchs S.Y. Inactivation of interferon receptor promotes the establishment of immune privileged tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 2017, Vol. 31, no. 2, pp. 194-207.
30. Li S., Fu X., Wu T., Yang L., Hu C., Wu R. Role of interleukin-6 and its receptor in endometriosis. *Med. Sci. Monit.*, 2017, Vol. 23, pp. 3801-3807.
31. Li Y., Xu K.P., Jiang D., Zhao J., Ge J.F., Zheng S.Y. Relationship of Fas, FasL, p53 and bcl2 expression in human non-small cell lung carcinomas. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, Vol. 8, no. 11, pp. 13978-13986.
32. Liu R., Bai Y., Vollmer T.L., Bai X.F., Jee Y., Tang Y.Y., Campagnolo D.I., Collins M., Young D.A., la Cava A., Shi F.D. IL-21 receptor expression determines the temporal phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp. Neurol.*, 2008, Vol. 211, no. 1, pp. 14-24.
33. Lopatnikova J.A., Alshevskaya A.A., Sennikov S.V. Expression of TNF α Receptors on immunocompetent cells is increased in atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2017, Vol. 174, no. 3-4, pp. 151-160.
34. Lopatnikova J.A., Vasilyev F.F., Alshevskaya A.A., Sennikov S.V. Quantitative flow cytometric analysis of expression of tumor necrosis factor receptor types I and II on mononuclear cells. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 2013, Vol. 33, no. 1, pp. 49-55.
35. Luan T., Yu Y. Increased hepatocyte growth factor and c-Met receptor expression in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2014, Vol. 7, no. 12, pp. 5583-5587.
36. Lukeš T., Pospíšil J., Fliegel K., Lasser T., Hagen G.M. Quantitative super-resolution single molecule microscopy dataset of YFP-tagged growth factor receptors. *Gigascience*, 2018, Vol. 7, no. 3, pp. 1-10.
37. Lund-Johansen M., Bjerkvig R., Humphrey P.A., Bigner S.H., Bigner D.D., Laerum O.D. Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion *in vitro*. *Cancer Res.*, 1990, Vol. 50, no. 18, pp. 6039-6044.
38. Mar A.C., Chu C.H., Lee H.J., Chien C.W., Cheng J.J., Yang S.H., Jiang J.K., Lee T.C. Interleukin-1 Receptor type 2 acts with c-Fos to enhance the expression of interleukin6 and vascular endothelial growth factor a in colon cancer cells and induce angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2015, Vol. 290, no. 36, pp. 22212-22224.
39. Marzullo A., Ambrosi F., Inchingolo M., Manca F., Devito F., Angiletta D., Zito A., Scicchitano P., Piccone M.M. ST2L transmembrane receptor expression: an immunochemical study on endarterectomy samples. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 5, e0156315. doi: 10.1371/journal.pone.0156315.
40. Mashino K., Sadanaga N., Yamaguchi H., Tanaka F., Ohta M., Shibuta K., Inoue H., Mori M. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res.*, 2002, Vol. 62, no. 10, pp. 2937-2941.
41. Masztalewicz M., Nowacki P., Szydłowski Ł., Żukowski M., Gutowski P. High expression of CX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1) in human carotid plaques is associated with vulnerability of the lesions. *Folia Neuropathol.*, 2017, Vol. 55, no. 2, pp. 174-181.
42. Maurizi M., Almadori G., Ferrandina G., Distefano M., Romanini M.E., Cadoni G., Benedetti-Panici P., Paludetti G., Scambia G., Mancuso S. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 1996, Vol. 74, no. 8, pp. 1253-1257.
43. Mehta A., Chowdhary M., Sinha R. Immunoscoring of epidermal growth factor receptor expression in recurrent cases of oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, 2015, Vol. 44, no. 10, pp. 818-822.
44. Moraga I., Harari D., Schreiber G., Uzé G., Pellegrini S. Receptor density is key to the alpha2/beta interferon differential activities. *Mol. Cell. Biol.*, 2009, Vol. 29, no. 17, pp. 4778-4787.

45. Müller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M.E., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S.N., Barrera J.L., Mohar A., Verástegui E., Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 2001, Vol. 410, no. 6824, pp. 50-56.
46. Neal D.E., Marsh C., Bennett M.K., Abel P.D., Hall R.R., Sainsbury J.R., Harris A.L. Epidermal growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet*, 1985, Vol. 1, no. 8425, pp. 366-368.
47. Niederkorn J.Y., Mayhew E., Mellon J., Hegde S. Role of tumor necrosis factor receptor expression in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) and corneal allograft survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004, Vol. 45, no. 8, pp. 2674-2681.
48. Ozawa S., Ueda M., Ando N., Shimizu N., Abe O. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer*, 1989, Vol. 63, no. 11, pp. 2169-2173.
49. Platt E.J., Wehrly K., Kuhmann S.E., Chesebro B., Kabat D. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, 1998, Vol. 72, no. 4, pp. 2855-2864.
50. Popova A.P., Bentley J.K., Cui T.X., Richardson M.N., Linn M.J., Lei J., Chen Q., Goldsmith A.M., Pryhuber G.S., Hershenson M.B. Reduced platelet-derived growth factor receptor expression is a primary feature of human bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2014, Vol. 307, no. 3, L231-9. doi: 10.1152/ajplung.00342.2013.
51. Porter K.E., Turner N.A., O'Regan D.J., Ball S.G. Tumor necrosis factor alpha induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP-9 secretion: inhibition by simvastatin. *Cardiovasc. Res.*, 2004, Vol. 64, no. 3, pp. 507-515.
52. Ramp U., Bretschneider U., Ebert T., Karagiannidis C., Willers R., Gabbert H.E., Gerharz C.D. Prognostic implications of CD95 receptor expression in clear cell renal carcinomas. *Hum. Pathol.*, 2003, Vol. 34, no. 2, pp. 174-179.
53. Rubin Grandis J., Melhem M.F., Gooding W.E., Day R., Holst V.A., Wagener M.M., Drenning SD, Tweardy D.J. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, Vol. 90, no. 11, pp. 824-832.
54. Sainsbury J.R., Farndon J.R., Needham G.K., Malcolm A.J., Harris A.L. Epidermal-growthfactor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet*, 1987, Vol. 1, no. 8547, pp. 1398-1402.
55. Scambia G., Benedetti Panici P., Ferrandina G., Battaglia F., Distefano M., d'Andrea G., de Vincenzo R., Maneschi F., Ranelletti F.O., Mancuso S. Significance of epidermal growth factor receptor expression in primary human endometrial cancer. *Int. J. Cancer*, 1994, Vol. 56, no. 1, pp. 26-30.
56. Schreiber G. The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J. Biol. Chem.*, 2017, Vol. 292, no. 18, pp. 7285-7294.
57. Sellam J., Proulle V., Jünger A., Ittah M., Miceli Richard C., Gottenberg J.E., Toti F., Benessiano J., Gay S., Freyssinet J.M., Mariette X. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res. Ther.*, 2009, Vol. 11, no. 5, R156. doi: 10.1186/ar2833.
58. Sennikov S.V., Alshevskaya A.A., Shkaruba N.S., Chumasova O.A., Sizikov A.E., Lopatnikova J.A. Expression of TNF α membrane-bound receptors in the peripheral blood mononuclear cells (PMBC) in rheumatoid arthritis patients. *Cytokine*, 2015, Vol. 73, no. 2, pp. 288-294.
59. Sennikov S.V., Vasilyev F.F., Lopatnikova J.A., Shkaruba N.S., Silkov A.N. Polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor genes affect the expression levels of membrane-bound type I and type II receptors. *Mediators Inflamm.*, 2014, Vol. 2014, 745909. doi: 10.1155/2014/745909.
60. Sun L., Zhang Q., Li Y., Tang N., Qiu X. CCL21/CCR7 up-regulate vascular endothelial growth factor-D expression via ERK pathway in human non-small cell lung cancer cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, Vol. 8, no. 12, pp. 15729-15738.
61. Takeuchi H., Fujimoto A., Tanaka M., Yamano T., Hsueh E., Hoon D.S. CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin. Cancer Res.*, 2004, Vol. 10, no. 7, pp. 2351-2358.
62. Tang T., Xia Q., Xi M. CXC chemokine receptor 7 expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Biomed. Rep.*, 2016, Vol. 4, no. 1, pp. 63-67.
63. Tekabe Y., Kollaros M., Zerihoun A., Zhang G., Backer M.V., Backer J.M., Johnson L.L. Imaging VEGF receptor expression to identify accelerated atherosclerosis. *EJNMMI Res.*, 2014, Vol. 4, no. 1, p. 41.
64. van Caam A., Madej W., Thijssen E., Garcia de Vinuesa A., van den Berg W., Goumans M.J., Ten Dijke P., Blaney Davidson E., van der Kraan P.M. Expression of TGF β -family signalling components in ageing cartilage: age-related loss of TGF β and BMP receptors. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, Vol. 24, no. 7, pp. 1235-1245.
65. Wagner E.F., Hanna N., Fast L.D., Kouttab N., Shank P.R., Vazquez A., Sharma S. Novel diversity in IL-4-mediated responses in resting human naive B cells versus germinal center/memory B cells. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 165, no. 10, pp. 5573-5579.

66. Wang J., Taylor A., Showeil R., Trivedi P., Horimoto Y., Bagwan I., Ewington L., Lam E.W., El-Bahrawy M.A. Expression profiling and significance of VEGF-A, VEGFR2, VEGFR3 and related proteins in endometrial carcinoma. *Cytokine*, 2014, Vol. 68, no. 2, pp. 94-100.
67. Wei C.C., Chen W.Y., Wang Y.C., Chen P.J., Lee J.Y., Wong T.W., Chen W.C., Wu J.C., Chen G.Y., Chang M.S., Lin Y.C. Detection of IL-20 and its receptors on psoriatic skin. *Clin. Immunol.*, 2005, Vol. 117, no. 1, pp. 65-72.
68. Wimberger P., Chebouti I., Kasimir-Bauer S., Lachmann R., Kuhlisch E., Kimmig R., Süleyman E., Kuhlmann J.D. Explorative investigation of vascular endothelial growth factor receptor expression in primary ovarian cancer and its clinical relevance. *Gynecol. Oncol.*, 2014, Vol. 133, no. 3, pp. 467-472.
69. Xanthoulea S., Gijbels M.J., van der Made I., Mujcic H., Thelen M., Vergouwe M.N., Ambagts M.H., Hofker M.H., de Winther M.P. P55 tumour necrosis factor receptor in bone marrow-derived cells promotes atherosclerosis development in low-density lipoprotein receptor knock-out mice. *Cardiovasc. Res.*, 2008, Vol. 80, no. 2, pp. 309-318.
70. Zahir S.T., Tafti H.F., Rahmani K. Overexpression of HER-2/neu in patients with prostatic adenocarcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014, Vol. 15, no. 15, pp. 6425-6428.
71. Zhang F., Yang X., Li L., Sun L., Wang B.O., Yu X. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number analysis in gastric carcinoma samples from Chinese patients. *Oncol. Lett.*, 2016, Vol. 11, no. 1, pp. 173-181.
72. Zoi-Toli O., Meijer C.J., Oudejans J.J., de Vries E., van Beek P., Willemze R. Expression of Fas and Fas ligand in cutaneous B-cell lymphomas. *J. Pathol.*, 1999, Vol. 189, no. 4, pp. 533-538.
73. Zoi-Toli O., Vermeer M.H., de Vries E., van Beek P., Meijer C.J., Willemze R. Expression of Fas and Fas-ligand in primary cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): association between lack of Fas expression and aggressive types of CTCL. *Br. J. Dermatol.*, 2000, Vol. 143, no. 2, pp. 313-319.

Авторы:

Сенников С.В. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

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

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

Authors:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Поступила 05.03.2019
Отправлена на доработку 05.04.2019
Принята к печати 15.05.2019

Received 05.03.2019
Revision received 05.04.2019
Accepted 15.05.2019

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АГОНИСТОВ И АНТАГОНИСТОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Никонова А.А.^{1,2}, Хаитов М.Р.¹, Хаитов Р.М.¹

¹ ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

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

Резюме. Разработчики противовирусных препаратов обычно фокусируются непосредственно на вирусах как основных объектах для исследований. Однако клеточные компоненты, участвующие в жизненном цикле вирусов или иммунном ответе на вирусные инфекции, становятся все более привлекательными мишенями, что открывает новые возможности для противовирусной терапии. Toll-подобные рецепторы (TLR) играют важную роль в активации как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа, в том числе на вирусные инфекции респираторного тракта. В данном обзоре мы рассмотрим TLR как мишень для разработки новых противовирусных препаратов, рассмотрим механизм запуска противовирусного ответа, посредством индукции интерферонов I типа, а также механизмы ухода вирусов от иммунного ответа. Также рассмотрим существующие соединения — агонисты и антагонисты TLR — и обсудим вопросы безопасности их применения.

Ключевые слова: TLR, агонисты, антагонисты, респираторные вирусные инфекции

PROSPECTS OF TOLL-LIKE RECEPTOR AGONISTS AND ANTAGONISTS FOR PREVENTION AND TREATMENT OF VIRAL INFECTIONS

Nikonova A.A.^{a,b}, Khaitov M.R.^a, Khaitov R.M.^a

^a National Research Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Antiviral research has focused mainly on viral targets. However, cellular targets involved in the viral life cycle and antiviral response are becoming more attractive for research, providing a variety of opportunities for antiviral therapy. Toll-like receptors (TLR) play an important role in activation of both innate and adaptive immune systems, including a response to respiratory viral infections. In this review we shall discuss TLRs as potential targets for development of novel antiviral drugs including the mechanisms for induction the antiviral response by means of type I interferon production, as well as viral evasion strategies. In addition, we describe several new molecules that have been applied as TLR agonists or antagonists. The safety issues are also discussed.

Keywords: TLR, agonists, antagonists, respiratory viral infections

Адрес для переписки:

Никонова Александра Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток имени И.И. Мечникова»
115088, Россия, Москва, ул. 1-ая Дубровская, 15.
Тел.: 8 (495) 674-08-43
E-mail: aa.nikonova@nrcii.ru

Address for correspondence:

Nikonova Alexandra A.
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
115088, Russian Federation, Moscow,
1st Dubrovskaya str., 15.
Phone: 7 (495) 674-08-43
E-mail: aa.nikonova@nrcii.ru

Образец цитирования:

А.А. Никонова, М.Р. Хаитов, Р.М. Хаитов
«Перспективы использования агонистов
и антагонистов Toll-подобных рецепторов
для профилактики и лечения вирусных инфекций»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3.
С. 397-406. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-397-406
© Никонова А.А. и соавт., 2019

For citation:

A.A. Nikonova, M.R. Khaitov, R.M. Khaitov "Prospects of
Toll-like receptor agonists and antagonists for prevention and
treatment of viral infections", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3,
pp. 397-406. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-397-406

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-397-406

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 16-14-10188.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Введение

Дыхательная система является мишенью для целого ряда бактериальных и вирусных патогенов [1]. Несмотря на достигнутые успехи в области терапии и профилактики респираторных инфекций, существует ряд проблем. Во-первых, это снижение эффективности антибиотиков из-за развивающейся резистентности микроорганизмов. Во-вторых, специфическое противовирусное лечение острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) на данный момент недоступно, также не существует вакцин, предотвращающих заражение самыми распространенными возбудителями ОРВИ. Единственным исключением является инфекция, вызванная вирусами гриппа. В связи с этим разработка иммуномодулирующих препаратов может стать хорошей альтернативой в борьбе с инфекционными заболеваниями респираторного тракта.

В дыхательных путях человека присутствует целый ряд факторов защиты от патогенов. Так, слизистая оболочка легких содержит гуморальные факторы, такие как коллектины и дефензины, которые действуют как первая линия защиты при инфекции [10]. После заражения или стимуляции лигандами Toll-подобных рецепторов (TLR) увеличивается продукция антимикробных пептидов эпителием респираторного тракта (РТ), который играет ключевую роль в распознавании и элиминации патогенов [22]. Реакции врожденного иммунитета в ответ на чужеродные антигены на слизистых оболочках РТ характеризуются более высоким порогом активации, что предотвращает развитие неконтролируемого воспаления [79]. Эпителий РТ, наряду с лейкоцитами, экспрессирует рецепторы, распознающие молекулярный образ патогена (PRR) и идентифицирует патогены, демонстрирующие патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP). Самый изученный класс PRR это TLR. Другие виды PRR, которые вовлечены в процесс распознавания вирусных и бактериальных патогенов, включают NOD- и RIG-I-подобные рецепторы, инфламмосомы. Настоящий обзор посвящен биологии TLR и их роли в элиминации вирусных инфекций респираторного тракта.

Строение и функции TLR

Toll-подобные рецепторы (TLR) — это семейство эволюционно-консервативных рецепторов, участвующих в распознавании молекулярных образов патогена (PRR). Они играют важную роль в активации как врожденного, так и адаптивно-

го иммунного ответа. TLR гомологичны генам Toll *Drosophila melanogaster*, которые необходимы для их развития, а также инициируют процессы синтеза антимикробных и противогрибковых пептидов [33]. Разные виды различаются количеством отдельных TLR. На сегодняшний день было идентифицировано 13 TLR, десять у человека (TLR1-10) и двенадцать у мыши (TLR1-9, TLR11, TLR12; TLR10 не экспрессируется у мышей) [11]. Все TLR, за исключением TLR1 и TLR6, функционируют в виде гомодимеров. Тогда как распознавание специфическими лигандами и передача сигналов через TLR2 происходят при образовании гетеродимеров с TLR1 или TLR6 [60]. Структура всех TLR сходна, они являются трансмембранными белками, характеризующимися наличием внеклеточного домена, содержащего 19-25 повторяющихся последовательностей — богатых лейцином повторов — LRR (Leucine-rich repeats). Отсюда название «LRR-домен». Эти последовательности содержат мотив XLXXLXLXX (L — лейцин, x — любые другие остатки), а также дополнительные консервативные остатки лейцина. Цитоплазматическая часть рецептора представлена консервативным, гомологичным рецептору интерлейкина-1 (IL-1), TIR-доменом (Toll/IL-1 receptor and resistance domain), ответственным за взаимодействие с адаптерными молекулами сигнальных путей. Между LRR- и TIR-доменами расположен короткий трансмембранный участок [27].

Сигнальный путь активации TLR возможен благодаря наличию цитозольного, содержащего TIR домен адаптерного белка MyD88 (myeloid differentiation factor 88), MAL (схожий с MyD88 адаптер, также известный как TIRAP), TRIF (содержащий TIR домен адаптерный белок, активирующий интерферон- β (IFN), также известный как TICAM1) и TRAM (связанная с TRIF адаптерная молекула, также известная как TICAM2) [43, 59]. Пятый член этой группы, SARM (sterile α - and armadillo-motif containing protein), является ингибитором TRIF [14]. Взаимодействие TLR с TIR адаптерами приводит к активации сигнального комплекса в цитозоле (посредством белков TRAF и IRAK), что в свою очередь приводит к стимуляции транскрипционных ядерных факторов NF- κ B (nuclear factor-kappa B) и IRF (interferon regulatory factor) и, таким образом, к продукции интерферонов (IFN) I типа.

Сигнальный механизм, приводящий к индукции IFN, зависит от вида активированного TLR. Так, при активации всех видов TLR (кроме TLR3) сигнал генерируется по MyD88 зависимому пути. Главной общей мишенью действия сигнала является активация NF- κ B и активирующего белка-1 (AP-1). Эти транскрипционные факторы регулируют целый ряд генов, включая те, которые коди-

руют важные провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухолей альфа (TNF α), IL-1 β , IL-6, IL-8 и IL-12. Кроме того, TLR активируют продукцию интерферонов 1 типа (α и β) через интерферон-индуцируемые гены (IRF3, IRF5, IRF7). TLR3 активирует сигнальный путь NF- κ B по независимому от MyD88 каскаду. Передача сигнала в этом случае осуществляется посредством адаптерного белка TRIF (с последующей активацией IRF3 и IRF7) [35]. Ключевым событием этого сигнального каскада является продукция IFN I типа, секреция и функциональная активность которых имеет аутокринную и паракринную регуляцию. То есть IFN способны эффективно амплифицировать свою собственную продукцию. Взаимодействие с рецептором IFN I типа приводит к индукции многочисленных генов, кодирующих белки напрямую или опосредованно проявляющих противовирусные свойства. Этот механизм можно использовать при разработке противовирусных препаратов.

В основном TLR экспрессируются в тканях, выполняющих иммунные функции, а также в тканях органов, подвергающихся влиянию окружающей среды, таких как легкие и кожа. Большинство TLR расположены на внешней клеточной мембране, за исключением TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, которые экспрессируются внутри клетки (в основном в эндосомах) [55]. Предполагается, что внутриклеточная экспрессия минимизирует распознавание молекул РНК и ДНК хозяина [8]. Некоторые виды TLR распознают вирусные компоненты. Было показано, что TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 принимают участие в противовирусном ответе. Среди них TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 распознают двухцепочечную и одноцепочечную РНК, CpG-содержащую ДНК, обеспечивая, таким образом, распознавание всех видов вирусов и последующую индукцию экспрессии IFN I типа. Так, например, TLR2 распознает вирус кори [12] и вирус простого герпеса 1 типа [45]; TLR3 распознает двухцепочечные молекулы вирусной РНК реовирусов, и репликативные формы двухцепочечной РНК пикорнавирусов РСВ и вируса гриппа А [2]; TLR4 участвует в воспалительном цитокиновом ответе, следующим за распознаванием F белка РСВ [46]; TLR7 и TLR8 распознают одноцепочечную вирусную РНК вирусов гриппа [19] и вируса везикулярного стоматита; TLR9 индуцирует воспалительный ответ при заражении ДНК-содержащими вирусами, такими как аденовирусы [3] и вирус простого герпеса 2 типа (ВПГ2) [51].

Также наблюдается кооперация между разными TLR при иммунных реакциях в ответ на вирусную инфекцию. Например, это было продемонстрировано в работе Sorensen и соавт. с использованием нокаутных по TLR2 и TLR9 мы-

шей на модели инфекции ВПГ2 [69]. Цитокиновый ответ, индуцированный системным инфицированием, был значительно подавлен у двойных нокаутных и только частично у мышей, нокаутных по одному рецептору. Также интересно, что вирусная нагрузка в мозге зараженных животных была выше у двойных нокаутных. Схожие данные были получены в экспериментах *in vitro* при заражении дендритных клеток ВПГ2 [67]. Другой пример такой кооперации наблюдали на модели мышинного цитомегаловируса (MCMV). В частности, было показано, что и TLR7 и TLR9 опосредует ответ плазмацитоидных дендритных клеток при заражении MCMV, и это было первое исследование, в котором было доказано, что TLR7 распознает вирусную ДНК [84]. Другие примеры также доказывают, что активация TLR в кооперации с другими PRR обеспечивает противовирусную защиту. Например, модифицированный вирус осповакцины штамм Ankara распознается иммунной системой посредством TLR2/6, MDA-5 (melanoma differentiation-associated gene 5) и инфламмасомой NALP-3 [17].

Ингибирование сигнальных путей TLR вирусными белками

Доказательства того, что TLR принимают участие в распознавании вирусов, появились вследствие наблюдений, указывающих на то, что некоторые вирусы кодируют белки, ингибирующие сигнальные пути TLR. Например, у вируса осповакцины было выявлено несколько таких белков. Белок A46R связывается с адаптером TIR, оказывая супрессивный эффект на сигнальный путь TLR, тогда как белок A52R ингибирует опосредованную TLR активацию NF- κ B, связываясь с IRAK2. Еще один белок вируса осповакцины, K7, связывается с DDX3, необходимым для индукции IFN β . Вирус гепатита С (ВГС) также оказывает влияние на TLR. Так, протеаза NS3/4A расщепляет TRIF, а также блокирует RIG-I-опосредованный сигнальный путь расщеплением IPS-1, а NS5A ингибирует MyD88 [40]. Так как ингибирование протеолитической активности NS3/4A блокирует репликацию вируса и восстанавливает иммунные функции инфицированных клеток, то можно сказать, что препараты, направленные на NS3/4A, оказывают двойное действие [26] и поэтому высокоэффективны в клинической практике.

Некоторые вирусы ускользают от иммунного ответа другими способами. Так, например, вирус герпеса 8 типа, ассоциированный с саркомой Капоши, выработал уникальный механизм, который подразумевает наличие у вируса антагонистов IFN-опосредованной противовирусной активности, которая запускается путем включения вирусных гомологов клеточных IRF [41]. Белок V парамиксовирусов взаимодействует с MDA5,

блокируя иммунную активацию [16], тогда как белок NS1 вирусов гриппа блокирует продукцию IFN [23]. Аденовирусный белок E3-14.4K ингибирует противовирусный иммунный ответ блокированием активности NF-κappa-B [13].

Эти и другие вирусные ингибиторы TLR оказывают влияние на вирулентность патогенов. Очевидно, что эти механизмы снижают эффективность противовирусной терапии, которая направлена на активацию интерферонового ответа. Однако эти события происходят в зараженной клетке и не актуальны для окружающих незараженных клеток. Именно в незараженных клетках экзогенные активаторы иммунитета могут проявлять свое противовирусное действие, предотвращая развитие инфекции.

Основываясь на данных о клеточной экспрессии и сигнальных путях, TLR3, TLR7 и TLR9 являются перспективными мишенями для противовирусной терапии.

Экспрессия TLR клетками респираторного тракта

Респираторный тракт заселен множеством клеток, способных элиминировать патогены и инициировать различные иммунные реакции, сохраняя при этом гомеостаз в тканях. Практически все они экспрессируют TLR. Так, например, эпителиальные клетки РТ экспрессируют TLR1-TLR11 [73]. Функциональная экспрессия TLR1-6 и TLR9 при стимуляции соответствующими TLR-специфическими лигандами была показана в эпителиальных клетках бронхов [53]. В эпителии легких детектируется экспрессия TLR2-5 [57] и TLR9 [21]. При этом TLR4 присутствует как на поверхности клеток, так и внутри [30], а TLR2 — только на поверхности [68]. Роль TLR в эндотелиальных клетках легких до конца не изучена. Большинство исследований, изучающих экспрессию TLR, были выполнены на эндотелиальных клетках нелегочного происхождения [64]. Эндотелий мышей и крыс экспрессирует TLR2, TLR4 и TLR9 [49].

Эозинофилы играют важную роль в патогенезе бронхиальной астмы (БА), однако они также регулируют процесс элиминации некоторых вирусов (в частности, респираторно-синцитиального вируса) в легких [66]. Эозинофилы из периферической крови человека экспрессируют TLR1, TLR2, TLR4-7, TLR9 и TLR10. Некоторые исследования указывают на связь TLR-опосредованной активации эозинофилов бактериальными или вирусными патогенами с обострением БА. Активированные посредством TLR эозинофилы, синтезируют провоспалительные цитокины, которые обеспечивают миграцию нейтрофилов и еще большего количества эозинофилов в ткани. Кроме того, наблюдается усиление активности молекул адгезии на поверхно-

сти эозинофилов, вследствие чего происходит их прикрепление и последующая дегрануляция [73]. Тучные клетки человека тоже экспрессируют TLR, в частности TLR1, TLR2, TLR4-7 и TLR9. Тучные клетки играют роль в механизме вирус-индуцированного обострения БА [72], что предполагает наличие возможной взаимосвязи между усилением воспаления посредством лигандов TLR. Однако точная роль TLR в биологии тучных клеток неизвестна.

Альвеолярные макрофаги экспрессируют функциональные TLR2-5 и TLR9, но уровень экспрессии TLR в этих клетках ниже, чем в остальных [42]. Макрофаги (Мф) в дыхательных путях демонстрируют «ингибирующий» фенотип, предотвращая нежелательное «избыточное» воспаление [34]. Во время бактериальной или вирусной инфекции стимуляция TLR на поверхности Мф приводит к активации клеток, запускается механизм, который приводит к повышению их фагоцитарной активности, а также секреции провоспалительных, а не иммуносупрессивных цитокинов [24] что в свою очередь приводит к мобилизации и активации других воспалительных клеток в легких. При вирусных и бактериальных инфекциях одними из первых активируются нейтрофилы, которые ограничивают распространение патогена посредством секреции цитокинов и антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности. Нейтрофилы экспрессируют все виды TLR, кроме TLR3 [58].

Активация натуральных киллеров (NK) (посредством цитокинов, продуцируемых Мф) индуцирует продукцию IFN γ , который стимулирует Мф и нейтрофилы к фагоцитозу и регулирует презентацию антигена профессиональными антигенпрезентирующими клетками (АПК) [29].

Ключевой популяцией АПК являются дендритные клетки (DC), которые служат мостом между врожденным и приобретенным иммунитетом, так как после активации и созревания они мигрируют в лимфоузлы, где встречаются и праймируют наивные Т-клетки [7]. Кроме того, DC продуцируют цитокины, активирующие Т-, В- и NK-клетки [28]. Три субтипа DC детектируют в легких: миелоидные DC 1 и 2 типа (mDC1, 2), экспрессирующие TLR1-4, TLR6 и TLR8, а также плазматоцитоподобные DC (pDC), которые экспрессируют TLR7 и TLR9 [73].

Ответ Т-клеток на чужеродные антигены важен для формирования популяций эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти. Вирус-специфические CD8⁺ эффекторные клетки покидают региональные лимфоузлы и мигрируют к месту репликации вируса в соматических тканях [78]. Стимуляция CD4⁺Т клеток приводит к дифференциации в Th1-, Th2-, Th9-, Th17- или Th22-клетки [76]. Другая часть Т-клеток с иммунорегу-

ляторными свойствами известна как популяция CD4⁺CD8⁺T-клеток и регуляторных (Treg) клеток [61]. Разные популяции Т-клеток различаются видами экспрессируемых TLR, что также влияет на их функциональные характеристики. Эффекторные CD8⁺T-клетки человека экспрессируют TLR2-4, TLR7 и TLR9 [32]; CD4⁺T-клетки — TLR3, TLR6, TLR7 и TLR9 [71]. Лиганды TLR2 или TLR4 не оказывают влияния на наивные CD4⁺T-клетки человека, так как этот тип клеток не экспрессирует TLR2 и TLR4 на значительном уровне [5]. Регуляторные Т-клетки, такие как CD4⁺CD25⁺Treg, экспрессируют TLR2, TLR4, TLR5, TLR7/8 и TLR9 [50]. Существуют доказательства того, что эти клетки могут регулироваться лигандами TLR. Так, например, лиганды TLR7 могут усилить супрессорные функции CD4⁺CD25⁺Treg-клеток, тогда как лиганды TLR8, наоборот, ослабить [25]. Таким образом, многочисленные популяции Т-клеток экспрессируют различные TLR. Однако экспрессия TLR на поверхности Т-клеток и TLR-опосредованная активация АПК, которая обеспечивает костимуляционный сигнал Т-клеткам, — это два важных механизма, которые принимают участие в формировании эффективного иммунного ответа при вирусных инфекциях.

Т-клетки усиливают иммунный ответ активируя В-клетки. Взаимодействие между Т- и В-клетками приводит к тому, что наивные В-клетки активируются посредством рецепторного комплекса В-клеток и дополнительного костимуляционного сигнала (CD40) и продуцируют специфические антитела. Существуют и другие механизмы активации В-клеток, с участием молекул TLR [4]. Например, есть доказательства того, что Т-клеточный вирусный ответ индуцирует переключение изотипов иммуноглобулинов, если лиганды TLR7 и TLR9 конъюгированы с вирусоподобными частицами [39]. В-клетки экспрессируют TLR, но, так же как и у Т-клеток, существует зависимость от вида клеток. Существуют различия между В-клетками мыши и человека. Например, В-клетки человека не чувствительны к лигандам TLR4, тогда как В-клетки мыши секретируют цитокины в ответ на стимуляцию LPS [9].

Экспрессия TLR разными типами клеток в тканях организма является необходимым условием, при котором иммунная система адекватно реагирует на вирусную инфекцию. Кроме того, эффекторные функции и особенно продукция IFN клетками-резидентами или инфильтрованными клетками, после распознавания лигандов TLR, например, эпителиальными и дендритными клетками, являются важными механизмами при элиминации вируса.

Иммуноterapia посредством агонистов и антагонистов TLR

Возможность активировать антибактериальную/противовирусную активность посредством стимуляции TLR может быть использована при разработке новых препаратов для лечения и профилактики инфекционных, воспалительных, аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваний. В некоторых случаях искусственная стимуляция TLR имеет терапевтический потенциал для активации противовирусного ответа, однако применение антагонистов TLR для подавления избыточного воспаления может применяться при других патологических состояниях. Агонисты TLR могут применяться в качестве адъювантов при разработке вакцин (188Ст). Например, синтетические двухцепочечные РНК использовали в качестве адъюванта при разработке гриппозных вакцин [80]. Олигонуклеотиды CpG применяли в качестве TLR9-зависимых стимуляторов иммунитета [56] и показали, что с их помощью можно селективно привлекать DC и NK к месту репликации вируса, что в свою очередь позволяет более эффективно элиминировать респираторные патогены [65]. Доклинические исследования показали, что CpG олигонуклеотиды, которые вводили совместно с аллергенами и вакцинами индуцируют сильный иммунный ответ посредством активации CD4 Th1-клеток и CD8 Т-клеток [75]. В других исследованиях было показано, что использование лигандов для TLR2/6, TLR3 и TLR9 в комбинации с пептидом оболочки вируса иммунодефицита человека приводило к более эффективному Т-клеточному ответу [82].

Антагонисты TLR могут применяться для супрессии неконтролируемого (избыточного) иммунного ответа. Например, особенности функционирования внутриклеточных сенсоров для РНК, таких как TLR3, TLR7 или TLR8 могут быть использованы при разработке вакцин в отношении РНК-содержащих вирусов. Однако существуют свидетельства того, что изменения в модификации CpG олигонуклеотидов приводят к тому, что их свойства меняются и они становятся антагонистами для TLR7 и TLR9 [77] и в этом случае они являются подходящими кандидатами для терапевтических препаратов, подавляющих нежелательную, неконтролируемую активацию TLR. В работе LeBouder и соавт. было доказано существование растворимых форм TLR2 (pTLR2), которые были обнаружены в грудном молоке и плазме. При этом основным источником pTLR2 в плазме являются моноциты. Авторы также наблюдали взаимодействие между растворимыми формами TLR2 и CD14, который является корецептором TLR. Деpletion pTLR2 из сыворотки приводила к усилению клеточного ответа на бактериальный липопептид,

что свидетельствует о проявлении ингибирующей активности pTLR2 [47]. Кроме того, альтернативный сплайсинг белка TLR4, который был обнаружен у мышей и характеризуется синтезом белка в растворимой форме, также снижает LPS-опосредованную продукцию цитокинов макрофагами мышей [37]. Эти примеры демонстрируют новые подходы, которые могут быть использованы для разработки препаратов для лечения инфекционных заболеваний, действие которых основано на специфическом ингибировании TLR.

Целый ряд препаратов, принцип действия которых основан на взаимодействии с TLR, прошли разные стадии клинических исследований. Препарат Imiquimod, синтетический агонист, активирующий TLR7, предотвращает появление генитальных кондилом, индуцированных вирусом папилломы [15], а также была продемонстрирована его активность при терапии рака кожи [44]. Целый ряд вакцин с компонентами, активирующими TLR, для профилактики малярии, сибирской язвы, вирусов гриппа, РСВ и гепатита В были тестированы в клинических исследованиях [20, 53]. Другие агонисты TLR проходят доклинические исследования. Так, например, агонист TLR7 IPH-32XX, для терапии рака, аутоиммунных и инфекционных заболеваний [62]. Препарат Ampligen (polyI:polyC12U), который является синтетическим агонистом TLR3, может быть использован для лечения синдрома хронической усталости [38]. Также продолжают исследования эндогенного белка человека CQ-07001, который является агонистом TLR3. Препарат Contaflu™ (антитела к цитоплазматическому фрагменту TLR3) продемонстрировал эффективность на мышинной модели гриппозной инфекции. Его клинические испытания проводили в 2012/2013 годах в Бельгии у пациентов с симптомами ОРВИ. Препарат оказался неэффективным у пациентов с ОРВИ в легкой форме, однако продемонстрировал эффективность в умеренных и тяжелых случаях инфекции [54].

Компания VaxInnate Corporation проводит клинические исследования агониста TLR5 VAX-102 для лечения инфекций, вызванных вирусами гриппа [36]. В клиническом исследовании с привлечением здоровых добровольцев и пациентов с аллергическим ринитом было показано, что интраназальная форма агониста TLR7 (GSK2245035) в дозировке < 100 нг хорошо переносится и не вызывает воспалительных реакций в носовой полости. Более высокая доза не была исследована из-за наблюдаемых выраженных симптомов синдрома высвобождения цитокинов при дозе введения, равной 100 нг [74]. Среди российских разработок можно отметить препарат растительного происхождения «Иммуномакс»,

который является агонистом TLR4 и проявляет активность в отношении целого ряда инфекционных агентов, а также эффективен при онкологических заболеваниях [6]. Таким образом, многочисленные клинические и доклинические исследования подтверждают возможность использовать агонисты и антагонисты TLR для терапии различных заболеваний, в том числе инфекционной природы.

При разработке новых терапевтических препаратов, помимо эффективности, всегда встает вопрос их безопасности. Искусственная активация иммунного ответа может приводить к непредсказуемым и даже катастрофическим последствиям, как это случилось с препаратом компании TeGenero во время клинических исследований [70]. В течение 90 минут после внутривенного введения у всех 6 добровольцев, получивших препарат, наблюдался системный воспалительный ответ, характеризовавшийся быстрой индукцией провоспалительных цитокинов, который сопровождался головной болью, миалгией, диареей и гипотензией. В течение 12-16 часов у добровольцев развивались опасные синдромы (почечная недостаточность, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и др.), которые требовали проведения реанимационных мероприятий. Несмотря на то, что исследуемый препарат TGN1412 (агонист, моноклональные антитела анти-CD28, которые непосредственно стимулируют Т-клетки) не содержит компонентов, активирующих PRR, этот случай должен быть принят во внимание при разработке иммуномодуляторов. Результаты первой фазы клинических испытаний препарата ANA-773 продемонстрировали, что агонист TLR7 эффективен и хорошо переносится, однако необходимо проведение дополнительных исследований, чтобы оценить потенциальную возможность этого препарата достоверно снижать вирусную нагрузку [35]. Клинические испытания нескольких TLR7 агонистов были приостановлены из соображений безопасности. Так, компания Anadys на 28 день фазы Ib клинических испытаний приостановила исследования препарата ANA-975 (TLR7 агониста) у пациентов с ВГС из-за наблюдаемой [81] «интенсивной иммунной стимуляции» и после этого прекратила его разработку. У мышей однократное введение препарата Resiquimod-R848 приводило к практически полной деплеции лейкоцитов из крови [31]. Это явление продолжалось 24 часа и было вызвано удержанием лейкоцитов крови в периферических органах. Лейкопения часто наблюдается при заражении вирусами с однопочечной РНК (например, вирусами гриппа) [48], этим отчасти объясняется бактериальная суперинфекция, характерная для людей, перенесших грипп [52].

Лимфопения в сочетании с гипотонией и гриппоподобными симптомами наблюдалась на I фазе клинических исследований препарата PF-4878691.43 компании Pfizer. Фармакокинетическое моделирование и доклинические данные по токсикологии этого агониста TLR7 показали, что ежедневное применение приводит к чрезмерной стимуляции иммунитета и поэтому является неподходящим [35]. Было предложено пероральное применение PF-4878691.43 два раза в неделю, так как такая схема была безопасной. Однако противовирусная активность (измеренная в условиях *in vitro* с использованием системы репликона ВГС) наблюдалась только в сыворотке крови у добровольцев, получавших дозы препарата PF-4878691.43, ассоциированные с побочными эффектами. Результаты этого исследования приводят к выводу, что увеличение противовирусной активности препарата также индуцирует более серьезные побочные эффекты, что является терапевтическим индексом для препаратов с таким механизмом действия.

Олигонуклеотиды CpG, являющиеся агонистами TLR9, могут провоцировать развитие аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка и диабет [18, 83]. Активация TLR3 может быть ассоциирована с развитием волчаночного нефрита [63].

Заключение

Рецепторы TLR принимают непосредственное участие в распознавании и элиминации вирусных патогенов, однако многие вирусы выработали механизмы ускользания от иммунного ответа, кодируя белки, ингибирующие сигнальные пути TLR. Кроме того, искусственная активация TLR может приводить к чрезмерному иммунному ответу, запуская развитие аутоиммунных заболеваний. В связи с этим необходимо более глубоко изучать экспрессию, функциональные особенности и идиосинкратические свойства TLR для разработки новых лекарственных препаратов для лечения вирусных инфекций респираторного тракта.

Список литературы / References

1. Царев С.В., Хаитов М.Р. Роль респираторных вирусов при бронхиальной астме // РМЖ, 2009. № 2. С. 136-139. [Tsarev S.V., Khaitov M.R. The role of respiratory viruses in asthma. *RMZH = Russian Medical Journal*, 2009, no. 2, pp. 136-139. (In Russ.)]
2. Alexopoulou L., Holt A. C., Medzhitov R., Flavell R. A. Recognition of double-stranded Rna and activation of Nf-KappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001, Vol. 413, no. 6857, pp. 732-738.
3. Appledorn D.M., Patial S., McBride A., Godbehere S., van Rooijen N., Parameswaran N., Amalfitano A. Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, Mapk signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 *in vivo*. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 3, pp. 2134-2144.
4. Avalos A.M., Busconi L., Marshak-Rothstein A. Regulation of autoreactive B Cell responses to endogenous TLR ligands. *Autoimmunity*, 2010, Vol. 43, no. 1, pp. 76-83.
5. Babu S., Blauvelt C. P., Kumaraswami V., Nutman T.B. Cutting edge: diminished T cell TLR expression and function modulates the immune response in human filarial infection. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 7, pp. 3885-3889.
6. Bagaev A., Pichugin A., Nelson E. L., Agadjanyan M.G., Ghochikyan A., Ataullakhanov R.I. Anticancer mechanisms in two murine bone marrow-derived dendritic cell subsets activated with TLR4 agonists. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, no. 8, pp. 2656-2669.
7. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, Vol. 392, no. 6673, pp. 245-252.
8. Barton G.M., Kagan J.C., Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.*, 2006, Vol. 7, no. 1, pp. 49-56.
9. Bekeredjian-Ding I.B., Wagner M., Hornung V., Giese T., Schnurr M., Endres S., Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells *via* Type I IFN. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 7, pp. 4043-4050.
10. Benne C.A., Kraaijeveld C.A., van Strijp J.A., Brouwer E., Harmsen M., Verhoef J., van Golde L.M., van Iwaarden J.F. Interactions of surfactant protein a with Influenza a viruses: binding and neutralization. *J. Infect. Dis.*, 1995, Vol. 171, no. 2, pp. 335-341.
11. Beutler B.A. TLRs and innate immunity. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 7, pp. 1399-1407.
12. Bieback K., Lien E., Klagge I.M., Avota E., Schneider-Schaulies J., Duprex W.P., Wagner H., Kirschning C.J., Ter Meulen V., Schneider-Schaulies S. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates Toll-like receptor 2 signaling. *J. Virol.*, 2002, Vol. 76, no. 17, pp. 8729-8736.
13. Carmody R.J., Maguschak K., Chen Y.H. A novel mechanism of nuclear factor-KappaB regulation by adenoviral protein 14.7k. *Immunology*, 2006, Vol. 117, no. 2, pp. 188-195.
14. Carty M., Goodbody R., Schroder M., Stack J., Moynagh P.N., Bowie A.G. The human adaptor Sarm negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat. Immunol.*, 2006, Vol. 7, no. 10, pp. 1074-1081.
15. Chang Y.C., Madkan V., Cook-Norris R., Sra K., Tying S. Current and potential uses of Imiquimod. *South. Med. J.*, 2005, Vol. 98, no. 9, pp. 914-920.

16. Childs K., Stock N., Ross C., Andrejeva J., Hilton L., Skinner M., Randall R., Goodbourn S. MDA-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. *Virology*, 2007, Vol. 359, no. 1, pp. 190-200.
17. Delaloye J., Roger T., Steiner-Tardivel Q.G., le Roy D., Knaup Reymond M., Akira S., Petrilli V., Gomez C.E., Perdiguero B., Tschoep J., Pantaleo G., Esteban M., Calandra T. Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (Mva) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. *PLoS Pathog.*, 2009, Vol. 5, no. 6, e1000480. doi: 10.1371/journal.ppat.1000480.
18. Deng G.M., Nilsson I.M., Verdrengh M., Collins L.V., Tarkowski A. Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat. Med.*, 1999, Vol. 5, no. 6, pp. 702-705.
19. Diebold S.S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S., Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of Tlr7-mediated recognition of single-stranded Rna. *Science*, 2004, Vol. 303, no. 5663, pp. 1529-1531.
20. Dowling J.K., Mansell A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin. Transl. Immunology*, 2016, Vol. 5, no. 5, e85. doi: 10.1038/cti.2016.22.
21. Droemann D., Albrecht D., Gerdes J., Ulmer A.J., Branscheid D., Vollmer E., Dalhoff K., Zabel P., Goldmann T. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir. Res.*, 2005, Vol. 6, p. 1.
22. Evans S.E., Xu Y., Tuvim M.J., Dickey B.F. Inducible innate resistance of lung epithelium to infection. *Annu. Rev. Physiol.*, 2010, Vol. 72, pp. 413-435.
23. Fernandez-Sesma A., Marukian S., Ebersole B.J., Kaminski D., Park M.S., Yuen T., Sealfon S.C., Garcia-Sastre A., Moran T.M. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *J. Virol.*, 2006, Vol. 80, no. 13, pp. 6295-6304.
24. Fernandez S., Jose P., Avdiushko M.G., Kaplan A.M., Cohen D.A. Inhibition of Il-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 4, pp. 2613-2620.
25. Forward N.A., Furlong S.J., Yang Y., Lin T.J., Hoskin D.W. Signaling through TLR7 enhances the immunosuppressive activity of murine CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, Vol. 87, no. 1, pp. 117-125.
26. Fowell A.J., Nash K.L. Telaprevir: a new hope in the treatment of chronic hepatitis C? *Adv. Ther.*, 2010, Vol. 27, no. 8, pp. 512-522.
27. Gay N.J., Gangloff M. Structure of Toll-Like receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2008, no. 183, pp. 181-200.
28. Gilliet M., Cao W., Liu Y.J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 8, pp. 594-606.
29. Gregoire C., Chasson L., Luci C., Tomasello E., Geissmann F., Vivier E., Walzer T. The trafficking of natural killer cells. *Immunol. Rev.*, 2007, Vol. 220, pp. 169-182.
30. Guillot L., Medjane S., Le-Barillec K., Balloy V., Danel C., Chignard M., Si-Tahar M. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 4, pp. 2712-2718.
31. Gunzer M., Riemann H., Basoglu Y., Hillmer A., Weishaupt C., Balkow S., Benninghoff B., Ernst B., Steinert M., Scholzen T., Sunderkotter C., Grabbe S. Systemic administration of a TLR7 ligand leads to transient immune incompetence due to peripheral-blood leukocyte depletion. *Blood*, 2005, Vol. 106, no. 7, pp. 2424-2432.
32. Hammond T., Lee S., Watson M. W., Flexman J. P., Cheng W., Fernandez S., Price P. Toll-like receptor (TLR) expression on CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Cell Immunol.*, 2010, Vol. 264, no. 2, pp. 150-155.
33. Hoffmann J.A., Reichhart J.M. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.*, 2002, Vol. 3, no. 2, pp. 121-126.
34. Holt P.G., Strickland D.H., Wikstrom M.E., Jahnsen F.L. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 2, pp. 142-152.
35. Horscroft N.J., Pryde D.C., Bright H. Antiviral applications of Toll-like receptor agonists. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, Vol. 67, no. 4, pp. 789-801.
36. Huleatt J.W., Nakaar V., Desai P., Huang Y., Hewitt D., Jacobs A., Tang J., McDonald W., Song L., Evans R.K., Umlauf S., Tussey L., Powell T.J. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, no. 2, pp. 201-214.
37. Iwami K.I., Matsuguchi T., Masuda A., Kikuchi T., Musikacharoen T., Yoshikai Y. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 165, no. 12, pp. 6682-6686.
38. Jasani B., Navabi H., Adams M. Ampligen: a potential Toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine*, 2009, Vol. 27, no. 25-26, pp. 3401-3404.
39. Jegerlehner A., Maurer P., Bessa J., Hinton H.J., Kopf M., Bachmann M.F. TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 4, pp. 2415-2420.
40. Johnson C.L., Owen D.M., Gale M.Jr. Functional and therapeutic analysis of hepatitis C virus NS3.4A protease control of antiviral immune defense. *J. Biol. Chem.*, 2007, Vol. 282, no. 14, pp. 10792-10803.
41. Joo C.H., Shin Y.C., Gack M., Wu L., Levy D., Jung J.U. Inhibition of interferon regulatory factor 7 (IRF7)-mediated interferon signal transduction by the Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus viral IRF homolog VIRF3. *J. Virol.*, 2007, Vol. 81, no. 15, pp. 8282-8292.
42. Juarez E., Nunez C., Sada E., Ellner J.J., Schwander S.K., Torres M. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respir. Res.*, 2010, Vol. 11, p. 2.

43. Kawasaki T., Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 461.
44. Kemeny L., Nagy N. New perspective in immunotherapy: Local imiquimod treatment. *Orv. Hetil.*, 2010, Vol. 151, no. 19, pp. 774-783.
45. Kurt-Jones E.A., Chan M., Zhou S., Wang J., Reed G., Bronson R., Arnold M.M., Knipe D.M., Finberg R.W. Herpes Simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, Vol. 101, no. 5, pp. 1315-1320.
46. 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.
47. LeBouder E., Rey-Nores J.E., Rushmere N.K., Grigorov M., Lawn S.D., Affolter M., Griffin G.E., Ferrara P., Schiffrin E.J., Morgan B.P., Labeta M.O. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 12, pp. 6680-6689.
48. Lewis D.E., Gilbert B.E., Knight V. Influenza virus infection induces functional alterations in peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, 1986, Vol. 137, no. 12, pp. 3777-3781.
49. Li Y., Xiang M., Yuan Y., Xiao G., Zhang J., Jiang Y., Vodovotz Y., Billiar T.R., Wilson M.A., Fan J. Hemorrhagic shock augments lung endothelial cell activation: role of temporal alterations of TLR4 and TLR2. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2009, Vol. 297, no. 6, pp. R1670-1680.
50. Liu G., Zhang L., Zhao Y. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2010, Vol. 160, no. 2, pp. 168-175.
51. Lund J., Sato A., Akira S., Medzhitov R., Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes Simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, no. 3, pp. 513-520.
52. Madhi S.A., Klugman K.P. A role for *Streptococcus Pneumoniae* in virus-associated pneumonia. *Nat. Med.*, 2004, Vol. 10, no. 8, pp. 811-813.
53. Mayer A.K., Muehmer M., Mages J., Gueinzus K., Hess C., Heeg K., Bals R., Lang R., Dalpke A.H. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 5, pp. 3134-3142.
54. Martyushev-Poklad A., Bruhwyler J., Heijmans S., Thiry M. Efficacy of a novel antibody TLR3 modulator in the self-treatment of common cold: the Estuar trial. *Adv. Infect. Dis.*, 2015, Vol. 5, pp. 204-217.
55. McGettrick A.F., O'Neill L.A. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr. Opin. Immunol.*, 2010, Vol. 22, no. 1, pp. 20-27.
56. Mosca F., Tritto E., Muzzi A., Monaci E., Bagnoli F., Iavarone C., O'Hagan D., Rappuoli R., de Gregorio E. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, Vol. 105, no. 30, pp. 10501-10506.
57. Muir A., Soong G., Sokol S., Reddy B., Gomez M.I., van Heeckeren A., Prince A. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2004, Vol. 30, no. 6, pp. 777-783.
58. O'Mahony D.S., Pham U., Iyer R., Hawn T.R., Liles W.C. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int. J. Med. Sci.*, 2008, Vol. 5, no. 1, pp. 1-8.
59. O'Neill L.A., Bowie A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 5, pp. 353-364.
60. Oliveira-Nascimento L., Massari P., Wetzler L.M. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, p. 79.
61. Palomares O., Yaman G., Azkur A.K., Akkoc T., Akdis M., Akdis C.A. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, no. 5, pp. 1232-1240.
62. Panter G., Kuznik A., Jerala R. Therapeutic applications of nucleic acids as ligands for Toll-like receptors. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2009, Vol. 11, no. 2, pp. 133-145.
63. Patole P.S., Grone H.J., Segerer S., Ciubar R., Belemzova E., Henger A., Kretzler M., Schlondorff D., Anders H.J. Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005, Vol. 16, no. 5, pp. 1326-1338.
64. Pegu A., Qin S., Fallert Junecko B.A., Nisato R.E., Pepper M.S., Reinhart T.A. Human lymphatic endothelial cells express multiple functional TLRs. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 5, pp. 3399-3405.
65. Pesce I., Monaci E., Muzzi A., Tritto E., Tavarini S., Nuti S., de Gregorio E., Wack A. Intranasal administration of CpG induces a rapid and transient cytokine response followed by dendritic and natural killer cell activation and recruitment in the mouse lung. *J. Innate Immun.*, 2010, Vol. 2, no. 2, pp. 144-159.
66. Phipps S., Lam C.E., Mahalingam S., Newhouse M., Ramirez R., Rosenberg H.F., Foster P.S., Matthaei K.I. Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 5, 1578-1586.
67. Sato A., Linehan M.M., Iwasaki A. Dual recognition of Herpes Simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 46, pp. 17343-17348.
68. Soong G., Reddy B., Sokol S., Adamo R., Prince A. TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J. Clin. Invest.*, 2004, Vol. 113, no. 10, pp. 1482-1489.
69. Sorensen L.N., Reinert L.S., Malmgaard L., Bartholdy C., Thomsen A.R., Paludan S.R. TLR2 and TLR9 synergistically control Herpes Simplex virus infection in the brain. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 12, pp. 8604-8612.

70. Suntharalingam G., Perry M. R., Ward S., Brett S. J., Castello-Cortes A., Brunner M. D., Panoskaltsis N. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.*, 2006, Vol. 355, no. 10, pp. 1018-10128.
71. Suttmuller R.P., den Brok M.H., Kramer M., Bennis E.J., Toonen L.W., Kullberg B.J., Joosten L.A., Akira S., Netea M.G., Adema G.J. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 2, pp. 485-494.
72. Takenaka H., Ushio H., Niyonsaba F., Jayawardana S.T., Hajime S., Ikeda S., Ogawa H., Okumura K. Synergistic augmentation of inflammatory cytokine productions from murine mast cells by monomeric IgE and Toll-like receptor ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, Vol. 391, no. 1, pp. 471-476.
73. Traub S., Johnston S.L. TLRs and viral infection in the lung. Toll-like receptors in diseases of the lung. Ed. Greene C.M., Bentham Science Publishers, 2012, pp. 116-132.
74. Tsitoura D., Ambery C., Price M., Powley W., Garthside S., Biggadike K., Quint D. Early clinical evaluation of the intranasal TLR7 agonist GSK2245035: use of translational biomarkers to guide dosing and confirm target engagement. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2015, Vol. 98, no. 4, pp. 369-380.
75. Vollmer J. TLR9 in health and disease. *Int. Rev. Immunol.*, 2006, Vol. 25, no. 3-4, pp. 155-181.
76. Wan Y.Y. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology*, 2010, Vol. 130, no. 2, pp. 166-171.
77. Wang D., Bhagat L., Yu D., Zhu F.G., Tang J.X., Kandimalla E.R., Agrawal S. Oligodeoxyribonucleotide-based antagonists for Toll-like receptors 7 and 9. *J. Med. Chem.*, 2009, Vol. 52, no. 2, pp. 551-558.
78. Welsh R.M., Che J.W., Brehm M.A., Selin L.K. Heterologous immunity between viruses. *Immunol. Rev.*, 2010, Vol. 235, no. 1, pp. 244-266.
79. Wissinger E., Goulding J., Hussell T. Immune homeostasis in the respiratory tract and its impact on heterologous infection. *Semin. Immunol.*, 2009, Vol. 21, no. 3, pp. 147-155.
80. Woodhour A.F., Friedman A., Tytell A.A., Hilleman M.R. Hyperpotentiation by synthetic double-stranded RNA of antibody responses to influenza virus vaccine in adjuvant 65. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1969, Vol. 131, no. 3, pp. 809-817.
81. Xiang A.X., Webber S.E., Kerr B.M., Rueden E.J., Lennox J.R., Haley G.J., Wang T., Ng J.S., Herbert M.R., Clark D.L., Banh V.N., Li W., Fletcher S.P., Steffy K.R., Bartkowski D.M., Kirkovsky L.I., Bauman L.A., Averett D.R. Discovery of ANA975: an oral prodrug of the TLR-7 agonist isatoribine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2007, Vol. 26, no. 6-7, pp. 635-640.
82. Zhu Q., Egelston C., Gagnon S., Sui Y., Belyakov I.M., Klinman D.M., Berzofsky J.A. Using 3 TLR ligands as a combination adjuvant induces qualitative changes in T cell responses needed for antiviral protection in mice. *J. Clin. Invest.*, 2010, Vol. 120, no. 2, pp. 607-616.
83. Zipris D., Lien E., Nair A., Xie J.X., Greiner D.L., Mordes J.P., Rossini A.A. TLR9-signaling pathways are involved in Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in the biobreeding diabetes-resistant rat. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 2, pp. 693-701.
84. Zucchini N., Bessou G., Traub S., Robbins S.H., Uematsu S., Akira S., Alexopoulou L., Dalod M. Cutting edge: overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a Herpesvirus infection. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 9, pp. 5799-5803.

Авторы:

Никонова А.А. — к.б.н., заведующая лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; научный сотрудник ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

Хаитов М.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

Хаитов Р.М. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУ «Государственный научный центр „Институт иммунологии“» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

Authors:

Nikonova A.A., PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; Research Associate, National Research Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation

Khaitov M.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, National Research Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation

Khaitov R.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Research Advisor, National Research Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation

Поступила 31.08.2018

Отправлена на доработку 19.09.2018

Принята к печати 17.10.2018

Received 31.08.2018

Revision received 19.09.2018

Accepted 17.10.2018

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Тимашева Я.Р.

*Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия*

Резюме. Согласно современным представлениям об этиопатогенезе эссенциальной гипертензии, важная роль в ее развитии принадлежит клеткам иммунной системы. Медиаторы, продуцируемые иммунокомпетентными клетками, принимают участие в возникновении и поддержании состояния хронического системного воспаления и способствуют развитию сосудистого ремоделирования, являющегося важным звеном патогенеза заболевания и поражения органов-мишеней. Иммунные механизмы, лежащие в основе повышения артериального давления, включают в себя активацию клеток врожденного и приобретенного иммунитета. Нарушение целостности эндотелия сосудов, запускающее каскад воспалительных реакций, вызывает миграцию в очаг повреждения клеток иммунной системы, привлеченных хемокинами и молекулами адгезии. Инфильтрация макрофагами периваскулярной ткани способствует нарушению вазодилатации и повреждению органов-мишеней благодаря выработке активных форм кислорода. Ангиотензин II вызывает также инфильтрацию периваскулярной жировой ткани и адвентиции Т-лимфоцитами и повышенную выработку фактора некроза опухоли альфа и интерферона гамма. Кроме того, Т-лимфоциты экспрессируют минералокортикоидный рецептор, участвующий в развитии системной гипертензии. Важная роль в прогрессировании гипертензии принадлежит интерлейкину-17, участвующему в развитии повышенного артериального давления и ремоделирования сосудов. В обзоре также представлены данные о влиянии кишечной микрофлоры на регуляцию артериального давления и развитие гипертензии.

Ключевые слова: эссенциальная гипертензия, артериальное давление, воспаление, цитокины, хемокины, Т-лимфоциты

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF ESSENTIAL HYPERTENSION

Timasheva Ya.R.

*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation
Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation*

Abstract. According to modern concept of the etiopathogenesis of essential hypertension, immune cells play an important role in its development. Mediators produced by immunocompetent cells participate in

Адрес для переписки:

Тимашева Янина Римовна
Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
450054, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа,
пр. Октября, 71.
Тел./факс: 8 (347) 235-60-88.
E-mail: ianina_t@mail.ru

Address for correspondence:

Timasheva Yanina R.
Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences
450054, Russian Federation, Republic of Bashkortostan, Ufa,
October ave., 71.
Phone/Fax: 7 (347) 235-60-88.
E-mail: ianina_t@mail.ru

Образец цитирования:

Я.Р. Тимашева «Иммунологические аспекты эссенциальной гипертензии» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 407-418.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-407-418
© Тимашева Я.Р., 2019

For citation:

Ya.R. Timasheva "Immunological aspects of essential hypertension", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 407-418.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-407-418
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-407-418

the initiation and maintenance of chronic systemic inflammation and promote the development of vascular remodeling which is an important part of the pathogenesis of the disease and target organ damage. The immune mechanisms underlying blood pressure elevation include the activation of innate and adaptive immune cells. Endothelial damage triggers an inflammatory cascade, causing migration of the immune cells to the inflammatory site, mediated by chemokines and adhesion molecules. Macrophage infiltration of perivascular tissue contributes to impaired vasodilation and damage to target organs due to the production of active forms of oxygen. Angiotensin II also causes T cell infiltration of perivascular adipose tissue and adventitia and an increased production of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. In addition, T lymphocytes express the mineralocorticoid receptor involved in the development of systemic hypertension. An important role in the progression of hypertension belongs to interleukin-17, which is involved in blood pressure elevation and vascular remodeling. The review also contains data on the effect of gut microbiota on the regulation of blood pressure and the development of hypertension.

Keywords: essential hypertension, blood pressure, inflammation, cytokines, chemokines, T cells

Введение

Артериальная гипертензия (АГ) — состояние, характеризующееся повышением артериального давления (АД) до 140/90 мм рт. ст. и более [37] — поражает 40% населения в возрасте старше 25 лет, а после 65 лет, по данным Фремингемского исследования, риск развития АГ увеличивается до 90% [78]. Эссенциальная, или идиопатическая, гипертензия (гипертоническая болезнь) составляет более 90% всех случаев АГ и представляет собой хроническое персистирующее повышение АД при отсутствии явных причин, приводящих к подъему АД и развитию вторичных (симптоматических) форм АГ. В соответствии с современными представлениями, ЭГ является многофакторным заболеванием: разнообразные эндогенные (ангиотензин II, эндотелин-1, альдостерон) и экзогенные (повышенное потребление соли) стимулы влияют на состояние сердечно-сосудистой, центральной нервной системы и почек, увеличивая сосудистое сопротивление, повышая симпатическую активность и приводя к увеличению объема циркулирующей жидкости.

Впервые предположения о роли иммунной системы в развитии гипертензии стали высказываться более пятидесяти лет назад. В 1960-е годы было продемонстрировано, что иммуносупрессия способствовала снижению АД у крыс с гипертензией, обусловленной с частичным инфарктом почки, а при переносе лимфоцитов от них интактным животным у реципиентов развивалась АГ [48, 51, 82]. Позднее была описана воспалительная инфильтрация сосудов у пациентов с АГ различного генеза, в частности скопление моноцитов и Т-лимфоцитов в периадвентициальной ткани [48, 52]. У мышей с экстирпацией вилочковой железы при инфаркте почки не происходило повышения АД, а трансплантация тимуса от нормотензивных крыс (линии Вистар-Ки-

ото) спонтанно-гипертензивным крысам (SHR) приводила к снижению АД у последних, в то время как пересадка вилочковой железы новорожденным крысам линии SHR способствовала нормализации АД [1, 48, 49, 74]. Результаты этих и подобных исследований послужили основой для гипотезы о роли иммунной системы в развитии ЭГ.

Роль факторов врожденного иммунитета в развитии гипертензии

Для провоспалительного состояния, наблюдаемого при АГ, характерна активация эффекторных клеток как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Механизмы неспецифического, или врожденного, иммунного ответа могут быть прямыми, такими как активация компонентов системы комплемента, продукция цитокинов и хемокинов, фагоцитоз, или непрямыми — активация элементов адаптивной иммунной системы при помощи антигенпредставляющих клеток (АПК). В роли АПК могут выступать дендроциты, способные активировать CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоциты и макрофаги, и так называемые «непрофессиональные» АПК (нейтрофилы и клетки эндотелия), которые обладают навыками антигенпрезентации, но их способность активировать клетки адаптивной иммунной системы менее выражена. Тем не менее данные клетки могут представлять значительный интерес в аспекте этиопатогенеза АГ, так как именно они располагаются на линии первичного повреждения, запускающего каскад воспалительных реакций [3]. Это предположение подтверждается результатами недавнего исследования, продемонстрировавшего, что повышение содержания нейтрофилов является прогностическим признаком развития АГ [34].

Клетки иммунной системы мигрируют в очаг повреждения, привлеченные хемокинами, к которым относится моноцитарный хемоаттрактант-

ный белок-1 (MCP-1 или CCL2), или молекулами адгезии (ICAM-1 и VCAM-1). Пр продемонстрировано, что при АГ макрофаги преимущественно локализуются в периваскулярной жировой ткани и в адвентиции сосудов [41]. Макрофаги первого типа (M1) расщепляют L-аргинин с высвобождением оксида азота (NO), являющегося одним из факторов вазодилатации, при помощи индуцибельной синтазы оксида азота. M1-макрофаги продуцируют провоспалительные цитокины: интерлейкин (IL)-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, фактор некроза опухолей альфа (TNF α), а также активные формы кислорода, способствуя тем самым образованию пероксинитрита и снижая биодоступность NO. Макрофаги второго типа (M2) превращают L-аргинин в орнитин, способствующий пролиферации тканей и фиброзу, при посредстве фермента аргиназы-1 [42]. Таким образом, макрофаги могут влиять на обусловленную NO эндотелиальную релаксацию и приводить к повышению АГ, а также вызывать повреждение органов-мишеней за счет выработки активных форм кислорода и азота. M1-макрофаги также продуцируют белки семейства B7, индуцирующие провоспалительные CD4⁺T-лимфоциты (Т-хелперы Th1 и Th17), а M2-макрофаги выделяют IL-10, обладающий мощным противовоспалительным действием, создавая тем самым среду для регуляторных Т-лимфоцитов [2, 6, 41, 45, 50].

Дендритные клетки (ДК) принимают активное участие в процессе воспаления при АГ и, как и макрофаги, способны продуцировать провоспалительные цитокины (IL-1 β , IL-6, TNF α) и молекулы семейства B7. Недавно были описаны так называемые «молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями», или «дистресс-ассоциированные молекулярные паттерны» (DAMP), представляющие собой γ -кетоальдегиды, или изокетали (продукты окисления арахидоновой кислоты, образующие аддукты с белками клетки), которые играют важную роль в активации системы врожденного иммунитета при гипертензии [16]. Эти молекулы активно фагоцитируются ДК и способствуют их провоспалительной активации, индуцируя выработку Т-лимфоцитами IL-17A и интерферона (IFN)- γ . При использовании 2-гидроксибензиламина (2-НОВА) в качестве скэвенджера изокеталей наблюдалось снижение АД, уменьшение активности воспалительного процесса и поражения органов-мишеней [85]. Тем не менее нельзя однозначно утверждать, что наблюдаемый эффект является результатом действия

2-НОВА или обусловлен снижением числа других окисленных молекул, участвующих в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, например окисленных липопротеидов низкой плотности [39]. Значимость оксидативного стресса для развития процесса воспаления и повреждения сосудистой стенки подчеркивается наблюдаемым разнообразием участия активных форм кислорода в различных провоспалительных процессах, связанных с патогенезом сердечно-сосудистых заболеваний [3, 44]. Подобно тому, как M1-макрофаги и ДК 1 типа обладают провоспалительными свойствами и обнаруживаются в экспериментальных моделях гипертензии, ДК 2 типа, как и M2-макрофаги, могут способствовать снижению активности процесса воспаления и регенерации тканей [71].

Супрессорные клетки миелоидного происхождения (myeloid-derived suppressor cells — MDSC) обладают противовоспалительными эффектами, которые предположительно опосредуются реципрокной регуляцией активности Т-клеток: повышением выработки регуляторных Т-лимфоцитов и снижением пролиферации и активности CD8⁺T-лимфоцитов вследствие продукции H₂O₂ [18]. MDSC также способны ингибировать пролиферацию Т-клеток путем продукции аргиназы-1 и индуцибельной синтазы оксида азота. Эксперименты на мышах продемонстрировали, что дефицит MDSC способствует повышению АД, а введение MDSC, напротив, приводило к снижению АД благодаря выработке активных форм кислорода [68]. Тем не менее, дальнейшие исследования показали, что ключевым механизмом подавления воспаления является выработка IL-10 [53].

Toll-подобные рецепторы (TLR), как правило, экспрессируются макрофагами и ДК и выполняют функцию распознавания DAMP и патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP). Обнаружено, что при дефиците Toll-подобного рецептора 4 (TLR4) у мышей не наблюдается подъема АД в ответ на введение ангиотензина II [56]. Ранее было продемонстрировано, что TLR4 участвует в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, индуцируя оксидативный стресс и дисфункцию эндотелия [10]. Показано также, что при введении ангиотензина II происходит активация TLR4, сопровождаемая развитием оксидативного стресса и повреждения сосудистой стенки [12]. Предполагается, что при АГ в качестве активаторов TLR выступает ряд DAMP, в частности неоантигены или молекулы, продуцируемые клетками эндотелия сосудов,

поврежденными вследствие повышения АД [21, 65]. К числу DAMP, содержание которых повышено при гипертензии, относятся белки теплового шока (HSP)-60 и 70, участвующие в фолдинге белков и стимулирующие выработку NO, TNF α и других цитокинов клетками иммунной системы. Показано, что введение HSP-70 предварительно иммунизированным крысам предотвращало развитие сольчувствительной гипертензии и связанной с ней воспалительной инфильтрации почек, отчасти вследствие повышения выработки IL-10 Т-лимфоцитами [55]. Из некротизированных клеток высвобождается мочевая кислота, образующая моноурат натрия, который также может стимулировать ДК [70]. С-реактивный белок также может выступать в роли DAMP, активируя при посредстве TLR гладкомышечные клетки и моноциты/макрофаги [11]. Отмечено также, что хронические вялотекущие инфекционные заболевания, такие как периодонтит, ассоциированы с АГ у женщин в постменопаузальном периоде [75]. Показатели функции эндотелия (FMD поток-опосредованная дилатация) улучшались спустя два месяца после проведения интенсивного лечения, включавшего курс антибиотикотерапии [76]. Также развитию АГ могут способствовать хронические аутоиммунные заболевания (ревматоидный артрит, системная красная волчанка), которые сопровождаются развитием генерализованного воспалительного процесса.

Роль факторов приобретенного иммунитета в развитии гипертензии

Т-лимфоциты экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR), представляющий собой комплекс, состоящий из α - и β - либо γ - и δ -субъединиц, соединенных с рецептором CD3, который содержит γ -, δ - и ϵ -цепи, а также ζ -цепь, осуществляющую трансдукцию сигнала. Во время созревания в тимусе CD3⁺ тимоциты дифференцируются в CD8⁺ (цитотоксические) Т-лимфоциты или в CD4⁺ (Т-хелперы). При нормальном иммунном ответе для активации Т-лимфоцитов требуется два сигнала: распознавание Т-клетками АПК, опосредованное взаимодействием TCR с молекулами главного комплекса гистосовместимости, и взаимодействие между костимуляторными молекулами-лигандами В7 (CD80 и CD86) на поверхности АПК с корецептором Т-клеток CD28. Комбинированное взаимодействие с антигеном, костимуляторами и специфическими цитокинами приводит к дифференцировке наивных Т-хелперов в Th1-, Th2- или Th17-подтипы эффекторных клеток, каждый из которых способен продуцировать определенные цитокины и выступать меди-

атором различных реакций [50]. Th1-лимфоциты продуцируют IFN γ , IL-2 и TNF α и участвуют в реакциях клеточно-опосредованного иммунного ответа на внутриклеточные микроорганизмы. Th2-лимфоциты секретируют IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13, способствуя активации В-лимфоцитов и подавляя клеточно-опосредованный иммунный ответ. Th17-клетки вырабатывают IL-17 и IL-22 и участвуют в защите против внеклеточных бактериальных и грибковых патогенов, а также в развитии аутоиммунного ответа [48]. Наивные CD8⁺Т-лимфоциты дифференцируются в клетки, продуцирующие цитокины IFN γ и TNF α , или цитотоксические Т-лимфоциты, секретирующие перфорин или гранзим В. Перфорин способствует образованию пор в мембране клеток-мишеней, через которые проникает гранзим, вызывая развитие апоптоза и повышение содержания циркулирующих телец апоптоза, индуцируя тем самым развитие воспаления [35].

К настоящему времени накоплен большой объем информации об участии различных подтипов Т-лимфоцитов в патогенезе АГ. Показано, что мыши, лишенные CD8⁺Т-лимфоцитов, проявляли устойчивость к развитию АГ, которая отсутствовала у особей, лишенных CD4⁺Т-клеток (Т-хелперов) или молекул главного комплекса гистосовместимости II класса [48]. Кроме того, у мышей с дефицитом CD8⁺Т-клеток отмечалось менее выраженное сосудистое разрежение и ремоделирование в почках по сравнению с CD4⁺ мышами или мышами дикого типа. У пациентов с впервые выявленной АГ наблюдалось повышение циркулирующих иммунофлуоресцентных CD8⁺Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN γ , TNF α , а также цитотоксичные молекулы гранзим В и перфорин [88]. Помимо этого, обнаружено, что Т-лимфоциты экспрессируют минералокортикоидный рецептор (MR), играющий важную роль в развитии системной гипертензии [73]. MR-рецептор способствует повышению выработки IFN γ CD8⁺Т-лимфоцитами, формируя комплекс с ядерным фактором активированных Т-клеток 1 (NFAT1) и белком-активатором 1 (AP1). Продемонстрировано, что делеция MR рецептора приводит к подавлению обусловленного введением ангиотензина II повышения АД и повреждения почек и сосудов, тогда как повышенная экспрессия MR-рецептора Т-клетками, наоборот, усугубляет развитие гипертензии. Антагонист MR-рецептора-эплеренон (калийсберегающий диуретик), блокирует продукцию IFN γ CD8⁺Т-клетками [48].

Роль другой субпопуляции Т-лимфоцитов, гамма дельта ($\gamma\delta$), в повышении АД была продемонстрирована в исследовании Caillon и соавт. (2017). Лимфоциты данной группы экспрессируют на своей поверхности рецептор, состоящий из гамма- и дельта-цепей, в отличие от большинства других Т-клеток, рецепторы которых содержат альфа- и бета-цепи. Они представлены в организме в весьма небольшом количестве, составляя лишь 1-4% от общего числа лимфоцитов, и содержатся преимущественно в слизистой кишечника, коже и легких [77]. У мышей с отсутствием $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов вследствие нокаута гена δ -субъединицы или применения антител к $\gamma\delta$ -Т-клеткам при введении ангиотензина II не отмечалось повышения АД и развития дисфункции эндотелия в отличие от мышей дикого типа [4]. Также продемонстрирована корреляция экспрессии гамма-цепи рецептора Т-лимфоцитов в клетках крови с уровнем систолического АД у человека [72].

IFN γ и IL-17A — два основных провоспалительных цитокина, вырабатываемых Т-клетками при АГ [36]. У мышей с нокаутом гена *Ifng* или рецептора IFN γ *Ifngr*, предотвращало повышение АД в ответ на введение ангиотензина II [38, 63]. IFN γ способствует подъему АД путем увеличения синтеза ангиотензиногена, предшественника ангиотензина II, в гепатоцитах и клетках проксимальных канальцев почки [24, 26]. IFN γ подавляет экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота, снижая индуцированную вазодилатацию в артериальных аллографтах [88]. IFN γ и IL-17A также оказывают совместное синергическое провоспалительное влияние на синтез IL-6 и хемокинов CXCL8 и CXCL10 гладкомышечными клетками [13].

IL-17A независимо экспрессируется естественными киллерными клетками, CD8⁺-Т-лимфоцитами, Th1, Th17 и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами, а также нейтрофилами и эозинофилами [48]. Показано, что число IL-17-продуцирующих Th17-клеток повышается благодаря IL-23 [19, 29]. IL-17A, также называемый IL-17, является главой семейства, включающего в себя IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (известный как IL-25) и IL-17F. IL-17A обладает провоспалительными свойствами и действует на целый ряд клеток, индуцируя экспрессию цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-6, гранулоцитарный и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующие факторы), хемокинов (CXCL1, CXCL8, CXCL10) и металлопротеиназ [27].

Продemonстрировано, что повышение АД у мышей при введении им ангиотензина II происходит путем активации механизма, включающего повышение выработки IL-17A Th17-лимфоцитами [36]. Аналогичное действие на Th17-лимфоциты оказывал прием поваренной соли путем активации сыворотко- и глюкокортикоид-индуцируемой киназы 1 (SGK1) [47]. У мышей с нокаутом гена *Sgk1* в Т-клетках не происходило повышения АД и не развивались повреждение эндотелия сосудов и воспалительная инфильтрация почечной ткани при введении ангиотензина II или дезоксикортикостерона [47]. Было продемонстрировано, что наблюдаемый эффект связан с активацией Na⁺/K⁺/2Cl⁻ котранспортера 1 (NKCC1) в CD4⁺Т-лимфоцитах под воздействием Th17-поляризирующих цитокинов (TGF- β 1 и IL-6) [47].

IL-17A снижает активность эндотелиальной синтазы оксида азота и уменьшает NO-зависимую вазодилатацию [46]. IL-17A участвует в развитии ремоделирования и жесткости сосудов, увеличивая сосудистое сопротивление и внося тем самым вклад в развитие АГ. Это происходит вследствие активации p38 митоген-активируемой протеин киназы (MAPK), ведущей к повышению отложения коллагена в стенке аорты [84]. Дефицит IL-17/IL-23 усиливал повреждение клубочков почек, альбуминурию и инфильтрацию почечной паренхимы $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитами при гипертензии у мышей, но не оказывал существенного влияния на ремоделирование сердца и развитие кардиофиброза [28]. Также продемонстрировано повышение экспрессии мРНК гена эндотелиальной синтазы оксида азота под влиянием IL-17A путем активации NF- κ B, MEK1 и JNK сигнальных путей. Высказано предположение, что IL-17A способствует развитию внешнего ремоделирования сосудов (без утолщения базальной мембраны и уменьшения просвета сосудов и с сохранением кровотока в артериях) [33]. Таким образом, вклад IL-17A в развитие гипертензии может зависеть от типа, численности и локализации продуцирующих его клеток [3].

В экспериментах на мышах с нокаутом гена аполипопротеина Е и рецептора к ангиотензину II типа 1a было продемонстрировано влияние остеопонтина, обладающего провоспалительным действием, на развитие аневризм аорты [62].

Регуляторные Т-лимфоциты (Treg), или Т-супрессоры, обладают способностью подавлять реакции врожденного и приобретенного иммунного ответа на чужеродные и аутоантигены, опухолевые антигены и возбудителей

инфекционных заболеваний, благодаря чему имеют большое значение для аутоотолерантности и иммунного гомеостаза. Treg экспрессируют α -субъединицу рецептора IL-2 (CD25) и транскрипционный фактор FoxP3 (forkhead box P3), контролирующий экспрессию IL-10, который обладает противовоспалительным действием и, в свою очередь, модулирует функции и дифференцировку Treg. К числу Treg относятся натуральные (естественные) Т-регуляторные клетки (nTreg), которые развиваются в тимусе и составляют большинство циркулирующих Treg, и индуцибельные Treg (также известные как адаптивные, или периферические, iTreg) [79]. Следует отметить, что поляризованные Т-лимфоциты обладают способностью изменять свой фенотип в зависимости от окружения [48].

Т-лимфоциты выполняют также важную функцию сохранения иммунологической памяти, обеспечивающую мгновенную и специфическую реакцию иммунной системы в ответ на введение антигена. Т-клеточная иммунологическая память заключается в длительном выживании в лимфоидной ткани предварительно активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD45R0 (CD44 у мышей), в отличие от наивных Т-клеток, для которых характерна экспрессия CD45RA (CD62L у мышей). Выделяют центральные клетки памяти T_{CM} , экспрессирующие CCR7, и эффекторные клетки памяти T_{EM} , не экспрессирующие CCR7, но продуцирующие $IFN\gamma$ и IL-4 и способные под действием хемокинов мигрировать из лимфоидной ткани в периферические органы [64]. Продemonстрировано, что у мышей введение ангиотензина II вызывает инфильтрацию почек и периаортальной жировой ткани T_{EM} -клетками, предотвращаемую симпатической денервацией селезенки и почек [5, 86].

Роль факторов гуморального иммунитета в развитии гипертензии

В-лимфоциты, как и Т-клетки, экспрессируют на поверхности специфический рецептор (BCR). Связывание антигена с BCR запускает процесс дифференцировки В-лимфоцитов, приводя к синтезу иммуноглобулинов (Ig) различных классов, в зависимости от вида антигена, и обеспечивая презентацию антигена В-клетками [9]. Наивные В-лимфоциты продуцируют первичные эффекторные молекулы IgM и IgD, активированные В-клетки синтезируют высокоаффинные антигенспецифичные IgG и дифференцируются в клетки памяти или плазмочиты [22]. Помимо выработки антител и антигенпрезентации, В-лимфоциты также способны модулировать иммунный ответ путем продукции цитокинов. В-регуляторные лимфоциты (Breg) выступа-

ют в качестве иммуносупрессоров, синтезируя противовоспалительные цитокины IL-10, IL-35 и трансформирующий фактор роста (TGF)- β [66]. В-лимфоциты могут также продуцировать провоспалительные цитокины $TNF\alpha$ и $IFN\gamma$, а также нейротрофные факторы роста (нейротрофный фактор мозга BDNF и фактор роста нервов NGF) [15]. В-клетки памяти проявляют антигенспецифичность и экспрессируют на поверхности Ig, но не способны к ускоренному синтезу большого количества антител [40]. Показано, что хронические инфекции способствуют истощению В-клеток памяти и снижению их функциональности [43].

Продemonстрировано, что у мышей с гипертензией, обусловленной введением ангиотензина II, В-лимфоциты индуцировали периаортальную инфильтрацию макрофагами и повышение концентрации IgG, способствуя тем самым развитию воспаления [8]. Тем не менее, ранее было показано, что у иммунодефицитных мышей с индуцированной гипертензией перенос В-лимфоцитов, в отличие от переноса Т-лимфоцитов, не вызывал возобновления гипертензивного состояния [20]. Кроме того, у мышей с отсутствием В-лимфоцитов вследствие нокаута гена фактора, активирующего В-лимфоциты (*Baff*), или применения антител к В-лимфоцитарному антигену CD20, не наблюдалось персистенции АГ после прекращения введения ангиотензина II [8]. У мышей с дефицитом В-лимфоцитов также наблюдалось уменьшение числа макрофагов и снижение жесткости стенки аорты, являющейся независимым предиктором развития АГ [30]. Возможно, что роль В-лимфоцитов в развитии АГ связана с синтезом антител к рецепторам ангиотензина II 1 типа (AT1R) и α_1 -адренорецептору, содержание которых повышено у пациентов с гипертензией, в особенности при резистентной АГ [31, 32].

Выработка Ig различного класса также может быть одним из компонентов вклада В-лимфоцитов в развитие АГ. Показано, что у мышей с индуцированной гипертензией определяется повышенное содержание плазмочитов и плазмобластов, а также увеличены концентрации циркулирующих IgG и отложений IgG в стенках аорты по сравнению с мышами дикого типа [8]. Это согласуется с сообщениями о роли IgG в отношении развития атеросклероза у человека и наблюдениями о повышенной продукции IgG иммортализованными В-лимфоцитами, полученными от пациентов с АГ [59, 61]. Таким образом, продукция различных классов Ig может определять протективную или патофизиологическую роль В-лимфоцитов. Патофизиологические

эффекты могут быть опосредованы действием IgG на АПК путем активации рецепторов семейства FcγR, способствующих продукции провоспалительных цитокинов и определяющих антителозависимую клеточную цитотоксичность [14]. В настоящее время обсуждается возможность применения препарата ритуксимаб, представляющего собой моноклональные антитела к антигену В-лимфоцитов CD20, первоначально использовавшегося для лечения рассеянного склероза, в качестве средства антигипертензивной терапии [7, 8].

Роль кишечной микрофлоры в развитии гипертензии

Микрофлора кишечника человека представлена в основном бактериями типов *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, а также *Actinobacteria* и *Proteobacteria* [57]. Есть данные о том, что на состав микрофлоры могут оказывать влияние факторы внешней среды, характер питания, а также генетические факторы [23]. Продемонстрировано, что соотношение бактерий типа *Firmicutes* к бактериям рода *Bacteroidetes* было увеличено у крыс линии SHR, крыс с гипертензией, индуцированной ангиотензином II, а также у пациентов с ЭГ. Пероральное применение антибиотика миноциклина уменьшало соотношение *Firmicutes* и *Bacteroidetes* и приводило к снижению уровня АД у крыс линии SHR [87]. В качестве подтверждения влияния микрофлоры кишечника на развитие АГ у человека можно рассматривать сообщение о том, что употребление пробиотиков и продуктов ферментации молока с использованием лактобактерий способствовало снижению АД [25, 67].

Одним из механизмов, связывающих микрофлору кишечника с развитием АГ, является повышение уровня токсических продуктов переваривания белка (пара-крезол сульфат, индоксил-сульфат и триметиламин-N-оксид) [58, 81]. Кроме того, продемонстрировано, что поступление в кровоток короткоцепочечных жирных кислот, продуцируемых кишечными микроорганизмами, может влиять на уровень АД путем повышения выработки ренина и увеличения периферического сосудистого сопротивления, опосредованного взаимодействием с рецепторами Olf78 и Gpr41 [54]. Обнаружено, что в кишечнике у мышей на высокосолевого диеты снижалось содержание *Lactobacillus murinus*; напротив, пероральное введение *Lactobacillus murinus* предотвращало соль-индуцированное повышение Th17 и развитие гипертензии [83]. У здоровых мужчин высокосолевого диета приводила к снижению содержания *Lactobacillus spp.* в кишечнике, повышению числа Th17 и подъему АД.

Кроме того, кишечная микрофлора и состояние стенки кишечника могут влиять на развитие системного воспаления. Показано, что уровень эндотоксина грамотрицательных бактерий и фрагментов бактериальной ДНК в системном кровотоке коррелирует с повышением содержания С-реактивного белка, IL-6 и D-лактата в плазме крови. D-лактат, в свою очередь, является маркером проницаемости слизистой оболочки для бактерий и токсинов, находящихся в просвете кишечника [17, 69, 80].

Заключение

Повышение АД является результатом действия многих факторов, и к настоящему времени получено много доказательств участия факторов иммунной защиты в патогенезе эссенциальной гипертензии. Есть основания рассматривать развитие гипертензии и ее осложнений как постепенную активацию иммунной системы. Пре-гипертензия (пограничное состояние, характеризующееся повышением АД до 130/89 мм рт. ст.) связана с нерегулярным возникновением стимуляторных сигналов, ассоциированных с эпизодическим повышением АД, сопровождающимся генерацией DAMP и повышением экспрессии TLR. Это приводит к перемежающейся активации системы врожденного иммунитета и периферической воспалительной инфильтрации органов-мишеней. Развитие стойкого повышения АД связано с взаимоопотенцирующей активацией как врожденного, так и приобретенного иммунного ответа, поддерживающей состояние хронического воспаления сосудистой стенки и тканей почек, которое является результатом нестабильного равновесия про- и противовоспалительных факторов. Выраженное персистирующее воспаление, поддерживаемое неконтролируемым образованием неоантигенов, приводит к формированию атеросклероза и хронической почечной недостаточности, клинически проявляющихся в виде тяжелой резистентной гипертензии [60]. Необходимы дальнейшие исследования, направленные на прояснение роли отдельных иммунокомпетентных клеток и продуцируемых ими медиаторов в развитии гипертензии, их взаимодействий, влияния нервной и эндокринной систем и т.д. Эти сведения могут послужить для создания новых методов антигипертензивной терапии и предотвращения поражения органов-мишеней, а также выявить побочные действия применяющихся в настоящее время препаратов, связанные с их про- и противовоспалительными свойствами.

Список литературы / References

1. Ba D., Takeichi N., Kodama T., Kobayashi H. Restoration of T cell depression and suppression of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) by thymus grafts or thymus extracts. *J. Immunol.*, 1982, Vol. 128, no. 3, p. 1211.
2. Barhoumi T., Kasal D.A., Li M.W., Shbat L., Laurant P., Neves M.F., Paradis P., Schiffrin E.L. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension*, 2011, Vol. 57, no. 3, pp. 469-476.
3. Caillon A., Schiffrin E.L. Role of inflammation and immunity in hypertension: Recent epidemiological, laboratory, and clinical evidence. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2016, Vol. 18, no. 3, p. 21.
4. Caillon A., Mian M.O.R., Fraulob-Aquino J.C., Huo K.-G., Barhoumi T., Ouerd S., Sinnaeve P.R., Paradis P., Schiffrin E.L. $\gamma\delta$ T cells mediate angiotensin II-induced hypertension and vascular injury clinical perspective. *Circulation*, 2017, Vol. 135, no. 22, pp. 2155-2162.
5. Carnevale D., Pallante F., Fardella V., Fardella S., Iacobucci R., Federici M., Cifelli G., de Lucia M., Lembo G. The angiogenic factor PLGF mediates a neuroimmune interaction in the spleen to allow the onset of hypertension. *Immunity*, 2014, Vol. 41, no. 5, pp. 737-752.
6. Ceeraz S., Nowak E.C., Noelle R.J. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol.*, 2013, Vol. 34, no. 11, pp. 556-563.
7. Chan C.T., Lieu M., Toh B.H., Kyaw T.S., Bobik A., Sobey C.G., Drummond G.R. Antibodies in the pathogenesis of hypertension. *Biomed. Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 504045. doi: 10.1155/2014/504045.
8. Chan C.T., Sobey C.G., Lieu M., Ferens D., Kett M.M., Diep H., Kim H.A., Krishnan S.M., Lewis C.V., Salimova E., Tipping P., Vinh A., Samuel C.S., Peter K., Guzik T.J., Kyaw T.S., Toh B.H., Bobik A., Drummond G.R. Obligatory role for B cells in the development of angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*, 2015, Vol. 66, no. 5, pp. 1023-1033.
9. Chen X., Jensen P.E. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 2008, Vol. 56, no. 2, p. 77.
10. Dange R.B., Agarwal D., Masson G.S., Vila J., Wilson B., Nair A., Francis J. Central blockade of TLR4 improves cardiac function and attenuates myocardial inflammation in angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc. Res.*, 2014, Vol. 103, no. 1, pp. 17-27.
11. Davey Smith G., Lawlor D.A., Harbord R., Timpson N., Rumley A., Lowe G.D., Day I.N., Ebrahim S. Association of C-reactive protein with blood pressure and hypertension: Life course confounding and mendelian randomization tests of causality. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, Vol. 25, no. 5, pp. 1051-1056.
12. de Batista P.R., Palacios R., Martin A., Hernanz R., Medici C.T., Silva M.A., Rossi E.M., Aguado A., Vassallo D.V., Salaices M., Alonso M.J. Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 8, e104020. doi: 10.1371/journal.pone.0104020.
13. Eid R.E., Rao D.A., Zhou J., Lo S.F., Ranjbaran H., Gallo A., Sokol S.I., Pfau S., Pober J.S., Tellides G. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 2009, Vol. 119, no. 10, pp. 1424-1432.
14. Espeli M., Smith K.G., Clatworthy M.R. Fc γ RIIB and autoimmunity. *Immunol. Rev.*, 2016, Vol. 269, no. 1, pp. 194-211.
15. Fauchais A.-L., Lalloué F., Lise M.-C., Boumediene A., Preud'homme J.-L., Vidal E., Jauberteau M.-O. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 5, pp. 3027-3038.
16. Fehervari Z. Isoketals drive hypertension. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 11, p. 1008.
17. Feroze U., Kalantar-Zadeh K., Sterling K.A., Molnar M.Z., Noori N., Benner D., Shah V., Dwivedi R., Becker K., Kovesdy C.P. Examining associations of circulating endotoxin with nutritional status, inflammation, and mortality in hemodialysis patients. *J. Ren. Nutr.*, 2012, Vol. 22, no. 3, pp. 317-326.
18. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 9, no. 3, pp. 162-174.
19. Gaffen S.L., Jain R., Garg A.V., Cua D.J. IL-23-IL-17 immune axis: Discovery, mechanistic understanding, and clinical testing. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 14, no. 9, pp. 585-600.
20. Guzik T.J., Hoch N.E., Brown K.A., McCann L.A., Rahman A., Dikalov S., Goronzy J., Weyand C., Harrison D.G. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 10, pp. 2449-2460.
21. Harrison D.G., Guzik T.J., Lob H.E., Madhur M.S., Marvar P.J., Thabet S.R., Vinh A., Weyand C.M. Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension*, 2011, Vol. 57, no. 2, p. 132.
22. Hoffman W., Lakkis F.G., Chalasani G. B cells, antibodies, and more. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2016, Vol. 11, no. 1, pp. 137-154.

23. Jose P.A., Raj D. Gut microbiota in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2015, Vol. 24, no. 5, pp. 403-409.
24. Kamat N.V., Thabet S.R., Xiao L., Saleh M.A., Kirabo A., Madhur M.S., Delpire E., Harrison D.G., McDonough A.A. Renal transporter activation during angiotensin-II hypertension is blunted in interferon-gamma^{-/-} and interleukin-17A^{-/-} mice. *Hypertension*, 2015, Vol. 65, no. 3, pp. 569-576.
25. Khaledi S., Sun J., Buys N., Jayasinghe R. Effect of probiotics on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension*, 2014, Vol. 64, no. 4, pp. 897-903.
26. Kobori H., Nangaku M., Navar L.G., Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: From physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol. Rev.*, 2007, Vol. 59, no. 3, pp. 251-287.
27. Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 27, no. 1, pp. 485-517.
28. Krebs C.F., Lange S., Niemann G., Rosendahl A., Lehnert A., Meyer-Schwesinger C., Stahl R.A., Benndorf R.A., Velden J., Paust H.J., Panzer U., Ehmke H., Wenzel U.O. Deficiency of the interleukin 17/23 axis accelerates renal injury in mice with deoxycorticosterone acetate+angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*, 2014, Vol. 63, no. 3, pp. 565-571.
29. Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W.M., Mattson J., Basham B., Sedgwick J.D., McClanahan T., Kastelein R.A., Cua D.J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 201, no. 2, pp. 233-240.
30. Laurent S., Katsahian S., Fassot C., Tropeano A.-I., Gautier I., Laloux B., Boutouyrie P. Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke*, 2003, Vol. 34, no. 5, pp. 1203-1206.
31. Li W., Li Z., Chen Y., Li S., Lv Y., Zhou W., Liao M., Zhu F., Zhou Z., Cheng X., Zeng Q., Liao Y., Wei Y. Autoantibodies targeting AT1 receptor from patients with acute coronary syndrome upregulate proinflammatory cytokines expression in endothelial cells involving NF-κB pathway. *J. Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2014, 342693. doi: 10.1155/2014/342693.
32. Liao Y.-H., Wei Y.-M., Wang M., Wang Z.-H., Yuan H.-T., Cheng L.-X. Autoantibodies against AT1-receptor and alpha-1-adrenergic receptor in patients with hypertension. *Hypertens. Res.*, 2002, Vol. 25, no. 4, pp. 641-646.
33. Liu A.C., Lee M., McManus B.M., Choy J.C. Induction of endothelial nitric oxide synthase expression by IL-17 in human vascular endothelial cells: Implications for vascular remodeling in transplant vasculopathy. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 3, pp. 1544-1550.
34. Liu X., Zhang Q., Wu H., Du H., Liu L., Shi H., Wang C., Xia Y., Guo X., Li C., Bao X., Su Q., Sun S., Wang X., Zhou M., Jia Q., Zhao H., Song K., Niu K. Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor of hypertension. *Am. J. Hypertens.*, 2015, Vol. 28, no. 11, pp. 1339-1346.
35. Lord S.J., Rajotte R.V., Korbitt G.S., Bleackley R.C. Granzyme b: A natural born killer. *Immunol. Rev.*, 2003, Vol. 193, no. 1, pp. 31-38.
36. Madhur M.S., Lob H.E., McCann L.A., Iwakura Y., Blinder Y., Guzik T.J., Harrison D.G. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*, 2010, Vol. 55, no. 2, pp. 500-507.
37. Mancia G., Fagard R., Narkiewicz K., Redon J., Zanchetti A., Böhm M., Christiaens T., Cifkova R., de Backer G., Dominiczak A., Galderisi M., Grobbee D.E., Jaarsma T., Kirchhof P., Kjeldsen S.E., Laurent S., Manolis A.J., Nilsson P.M., Ruilope L.M., Schmieder R.E., Sirnes P.A., Sleight P., Viigimaa M., Waeber B., Zannad F., Council E.S.H.S., Redon J., Dominiczak A., Narkiewicz K., Nilsson P.M., Burnier M., Viigimaa M., Ambrosioni E., Caulfield M., Coca A., Olsen M.H., Schmieder R.E., Tsoufis C., van de Borne P., Guidelins E.S.C.C.F.P., Zamorano J.L., Achenbach S., Baumgartner H., Bax J.J., Bueno H., Dean V., Deaton C., Erol C., Fagard R., Ferrari R., Hasdai D., Hoes A.W., Kirchhof P., Knuuti J., Kolh P., Lancellotti P., Linhart A., Nihoyannopoulos P., Piepoli M.F., Ponikowski P., Sirnes P.A., Tamargo J.L., Tendera M., Torbicki A., Wijns W., Windecker S., Document R., Clement D.L., Coca A., Gillebert T.C., Tendera M., Rosei E.A., Ambrosioni E., Anker S.D., Bauersachs J., Hitij J.B., Caulfield M., de Buyzere M., de Geest S., Derumeaux G.A., Erdine S., Farsang C., Funck-Brentano C., Gerc V., Germano G., Gielen S., Haller H., Hoes A.W., Jordan J., Kahan T., Komajda M., Lovic D., Mahrholdt H., Olsen M.H., Ostergren J., Parati G., Perk J., Polonia J., Popescu B.A., Reiner Ž., Rydén L., Sirenko Y., Stanton A., Struijker-Boudier H., Tsoufis C., van de Borne P., Vlachopoulos C., Volpe M., Wood D.A. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.*, 2013, Vol. 34, no. 28, pp. 2159-2219.
38. Marko L., Kvakan H., Park J.K., Qadri F., Spallek B., Binger K.J., Bowman E.P., Kleinewietfeld M., Fokuhl V., Dechend R., Muller D.N. Interferon-gamma signaling inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage. *Hypertension*, 2012, Vol. 60, no. 6, pp. 1430-1436.
39. Matsuura E., Atzeni F., Sarzi-Puttini P., Turiel M., Lopez L.R., Nurmohamed M.T. Is atherosclerosis an autoimmune disease? *BMC Med.*, 2014, Vol. 12, p. 47.
40. McHeyzer-Williams L.J., McHeyzer-Williams M.G. Antigen-specific memory B cell development. *Annu. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 23, pp. 487-513.

41. Mian M.O., Barhoumi T., Briet M., Paradis P., Schiffrin E.L. Deficiency of t-regulatory cells exaggerates angiotensin II-induced microvascular injury by enhancing immune responses. *J. Hypertens.*, 2016, Vol. 34, no. 1, pp. 97-108.
42. Mills C.D. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: A life or death issue. *Crit. Rev. Immunol.*, 2001, Vol. 21, no. 5, pp. 399-425.
43. Moir S., Ho J., Malaspina A., Wang W., DiPoto A.C., O'Shea M.A., Roby G., Kottlil S., Arthos J., Proschan M.A., Chun T.-W., Fauci A.S. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 8, pp. 1797-1805.
44. Montezano A.C., Dulak-Lis M., Tsiropoulou S., Harvey A., Briones A.M., Touyz R.M. Oxidative stress and human hypertension: Vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can. J. Cardiol.*, 2015, Vol. 31, no. 5, pp. 631-641.
45. Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., Fisher E.A., Gilroy D.W., Goerdt S., Gordon S., Hamilton J.A., Ivashkiv L.B., Lawrence T., Locati M., Mantovani A., Martinez F.O., Mege J.L., Mosser D.M., Natoli G., Saeij J.P., Schultze J.L., Shirey K.A., Sica A., Suttles J., Udalova I., van Ginderachter J.A., Vogel S.N., Wynn T.A. Macrophage activation and polarization: Nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 2014, Vol. 41, no. 1, pp. 14-20.
46. Nguyen H., Chiasson V.L., Chatterjee P., Kopriva S.E., Young K.J., Mitchell B.M. Interleukin-17 causes Rho-kinase-mediated endothelial dysfunction and hypertension. *Cardiovasc. Res.*, 2013, Vol. 97, no. 4, pp. 696-704.
47. Norlander A.E., Saleh M.A., Pandey A.K., Itani H.A., Wu J., Xiao L., Kang J., Dale B.L., Goleva S.B., Laroumanie F., Du L., Harrison D.G., Madhur M.S. A salt-sensing kinase in T lymphocytes, SGK1, drives hypertension and hypertensive end-organ damage. *JCI Insight*, 2017, Vol. 2, no. 13, e92801. doi: 10.1172/jci.insight.92801.
48. Norlander A.E., Madhur M.S., Harrison D.G. The immunology of hypertension. *J. Exp. Med.*, 2018, Vol. 215, no. 1, p. 21.
49. Norman R.A., Jr., Dzielak D.J., Bost K.L., Khraibi A.A., Galloway P.G. Immune system dysfunction contributes to the aetiology of spontaneous hypertension. *J. Hypertens.*, 1985, Vol. 3, no. 3, pp. 261-268.
50. O'Shea J.J., Paul W.E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells. *Science*, 2010, Vol. 327, no. 5969, pp. 1098-1102.
51. Okuda T., Grollman A. Passive transfer of autoimmune induced hypertension in the rat by lymph node cells. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 1967, Vol. 25, no. 2, pp. 257-264.
52. Olsen F. Inflammatory cellular reaction in hypertensive vascular disease in man. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A*, 1972, Vol. 80, no. 2, pp. 253-256.
53. Park M.-J., Lee S.-H., Kim E.-K., Lee E.-J., Baek J.-A., Park S.-H., Kwok S.-K., Cho M.-L. Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, p. 3753.
54. Pluznick J. A novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation. *Gut Microbes*, 2014, Vol. 5, no. 2, pp. 202-207.
55. Pons H., Ferrebuz A., Quiroz Y., Romero-Vasquez F., Parra G., Johnson R.J., Rodriguez-Iturbe B. Immune reactivity to heat shock protein 70 expressed in the kidney is cause of salt-sensitive hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2012, Vol. 304, no. 3, pp. F289-F299.
56. Pushpakumar S., Ren L., Kundu S., Gamon A., Tyagi S.C., Sen U. Toll-like receptor 4 deficiency reduces oxidative stress and macrophage mediated inflammation in hypertensive kidney. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, p. 6349.
57. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J.M., Hansen T., le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H.B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Dore J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J., Bork P., Ehrlich S.D., Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, Vol. 464, no. 7285, pp. 59-65.
58. Ramezani A., Raj D.S. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2014, Vol. 25, no. 4, pp. 657-670.
59. Ravandi A., Boekholdt S.M., Mallat Z., Talmud P.J., Kastelein J.J., Wareham N.J., Miller E.R., Benessiano J., Tedgui A., Witztum J.L., Khaw K.T., Tsimikas S. Relationship of IgG and IgM autoantibodies and immune complexes to oxidized LDL with markers of oxidation and inflammation and cardiovascular events: Results from the EPIC-Norfolk Study. *J. Lipid Res.*, 2011, Vol. 52, no. 10, pp. 1829-1836.
60. Rodriguez-Iturbe B., Pons H., Johnson R.J. Role of the immune system in hypertension. *Physiol. Rev.*, 2017, Vol. 97, no. 3, pp. 1127-1164.
61. Roskopf D., Hartung K., Hense J., Siffert W. Enhanced immunoglobulin formation of immortalized B cells from hypertensive patients. *Hypertension*, 1995, Vol. 26, no. 3, pp. 432-435.
62. Sakaue T., Suzuki J., Hamaguchi M., Suehiro C., Tanino A., Nagao T., Uetani T., Aono J., Nakaoka H., Kurata M., Sakaue T., Okura T., Yasugi T., Izutani H., Higaki J., Ikeda S. Perivascular adipose tissue angiotensin II type 1 receptor promotes vascular inflammation and aneurysm formation. *Hypertension*, 2017, Vol. 70, no. 4, pp. 780-789.

63. Saleh M.A., McMaster W.G., Wu J., Norlander A.E., Funt S.A., Thabet S.R., Kirabo A., Xiao L., Chen W., Itani H.A., Michell D., Huan T., Zhang Y., Takaki S., Titze J., Levy D., Harrison D.G., Madhur M.S. Lymphocyte adaptor protein LNK deficiency exacerbates hypertension and end-organ inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2015, Vol. 125, no. 3, pp. 1189-1202.
64. Sallusto F., Lenig D., Förster R., Lipp M., Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, Vol. 401, no. 6754, p. 708.
65. Schiffrin E.L. Vascular remodeling in hypertension: Mechanisms and treatment. *Hypertension*, 2012, Vol. 59, no. 2, pp. 367-374.
66. Selvaraj U.M., Poinssat K., Torres V., Ortega S.B., Stowe A.M. Heterogeneity of B cell functions in stroke-related risk, prevention, injury, and repair. *Neurotherapeutics*, 2016, Vol. 13, no. 4, pp. 729-747.
67. Seppo L., Jauhiainen T., Poussa T., Korpela R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, Vol. 77, no. 2, pp. 326-330.
68. Shah K.H., Shi P., Giani J.F., Janjulia T., Bernstein E.A., Li Y., Zhao T., Harrison D.G., Bernstein K.E., Shen X.Z. Myeloid suppressor cells accumulate and regulate blood pressure in hypertension. *Circ. Res.*, 2015, Vol. 117, no. 10, pp. 858-869.
69. Shi K., Wang F., Jiang H., Liu H., Wei M., Wang Z., Xie L. Gut bacterial translocation may aggravate microinflammation in hemodialysis patients. *Dig. Dis. Sci.*, 2014, Vol. 59, no. 9, pp. 2109-2117.
70. Shi Y., Evans J.E., Rock K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, 2003, Vol. 425, no. 6957, pp. 516-521.
71. Shortman K., Liu Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 2, no. 3, pp. 151-161.
72. Sinnaeve P.R., Donahue M.P., Grass P., Seo D., Vonderscher J., Chibout S.D., Kraus W.E., Sketch M., Jr., Nelson C., Ginsburg G.S., Goldschmidt-Clermont P.J., Granger C.B. Gene expression patterns in peripheral blood correlate with the extent of coronary artery disease. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, no. 9, e7037. doi: 10.1371/journal.pone.0007037.
73. Sun X.-N., Li C., Liu Y., Du L.-J., Zeng M.-R., Zheng X.-J., Zhang W.-C., Liu Y., Zhu M., Kong D., Zhou L., Lu L., Shen Z.-X., Yi Y., Du L., Qin M., Liu X., Hua Z., Sun S., Yin H., Zhou B., Yu Y., Zhang Z., Duan S.-Z. T-cell mineralocorticoid receptor controls blood pressure by regulating interferon-gammanovelty and significance. *Circ. Res.*, 2017, Vol. 120, no. 10, pp. 1584-1597.
74. Svendsen U.G. The role of thymus for the development and prognosis of hypertension and hypertensive vascular disease in mice following renal infarction. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A*, 1976, Vol. 84, no. 3, pp. 235-243.
75. Taguchi A., Sanada M., Sueti Y., Ohtsuka M., Lee K., Tanimoto K., Tsuda M., Ohama K., Yoshizumi M., Higashi Y. Tooth loss is associated with an increased risk of hypertension in postmenopausal women. *Hypertension*, 2004, Vol. 43, no. 6, pp. 1297-1300.
76. Tonetti M.S., d'Aiuto F., Nibali L., Donald A., Storry C., Parkar M., Suvan J., Hingorani A.D., Vallance P., Deanfield J. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N. Engl. J. Med.*, 2007, Vol. 356, no. 9, pp. 911-920.
77. Vantourout P., Hayday A. Six-of-the-best: Unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 2, p. 88.
78. Vasan R.S., Beiser A., Seshadri S., Larson M.G., Kannel W.B., d'Agostino R.B., Levy D. Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study. *JAMA*, 2002, Vol. 287, no. 8, pp. 1003-1010.
79. Vignali D.A., Collison L.W., Workman C.J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 7, pp. 523-532.
80. Wang F., Jiang H., Shi K., Ren Y., Zhang P., Cheng S. Gut bacterial translocation is associated with microinflammation in end-stage renal disease patients. *Nephrology (Carlton)*, 2012, Vol. 17, no. 8, pp. 733-738.
81. Wang Z., Klipfell E., Bennett B.J., Koeth R., Levison B.S., Dugar B., Feldstein A.E., Britt E.B., Fu X., Chung Y.M., Wu Y., Schauer P., Smith J.D., Allayee H., Tang W.H., DiDonato J.A., Lusis A.J., Hazen S.L. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 2011, Vol. 472, no. 7341, pp. 57-63.
82. White F.N., Grollman A. Autoimmune factors associated with infarction of the kidney. *Nephron*, 1964, Vol. 1, pp. 93-102.
83. Wilck N., Matus M.G., Kearney S.M., Olesen S.W., Forslund K., Bartolomeus H., Haase S., Mähler A., Balogh A., Markó L., Vvedenskaya O., Kleiner F.H., Tsvetkov D., Klug L., Costea P.I., Sunagawa S., Maier L., Rakova N., Schatz V., Neubert P., Frätzer C., Krannich A., Gollasch M., Grohme D.A., Cörte-Real B.F., Gerlach R.G., Basic M., Typas A., Wu C., Titze J.M., Jantsch J., Boschmann M., Dechend R., Kleinewietfeld M., Kempa S., Bork P., Linker R.A., Alm E.J., Müller D.N. Salt-responsive gut commensal modulates Th17 axis and disease. *Nature*, 2017, Vol. 551, no. 7682, pp. 585-589.
84. Wu J., Thabet S.R., Kirabo A., Trott D.W., Saleh M.A., Xiao L., Madhur M.S., Chen W., Harrison D.G. Inflammation and mechanical stretch promote aortic stiffening in hypertension through activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Circ. Res.*, 2014, Vol. 114, no. 4, pp. 616-625.

85. Wu J., Saleh M.A., Kirabo A., Itani H.A., Montaniel K.R.C., Xiao L., Chen W., Mernaugh R.L., Cai H., Bernstein K.E., Goronzy J.J., Weyand C.M., Curci J.A., Barbaro N.R., Moreno H., Davies S.S., Roberts L.J., II, Madhur M.S., Harrison D.G. Immune activation caused by vascular oxidation promotes fibrosis and hypertension. *J. Clin. Invest.*, 2016, Vol. 126, no. 1, pp. 50-67.
86. Xiao L., Kirabo A., Wu J., Saleh M.A., Zhu L.J., Wang F., Takahashi T., Loperena R., Foss J.D., Mernaugh R.L., Chen W., Roberts J., Osborn J.W., Itani H.A., Harrison D.G. Renal denervation prevents immune cell activation and renal inflammation in angiotensin II-induced hypertension. *Circ. Res.*, 2015, Vol. 117, no. 6, pp. 547-557.
87. Yang T., Santisteban M.M., Rodriguez V., Li E., Ahmari N., Carvajal J.M., Zadeh M., Gong M., Qi Y., Zubcevic J., Sahay B., Pepine C.J., Raizada M.K., Mohamadzadeh M. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*, 2015, Vol. 65, no. 6, pp. 1331-1340.
88. Youn J.C., Yu H.T., Lim B.J., Koh M.J., Lee J., Chang D.Y., Choi Y.S., Lee S.H., Kang S.M., Jang Y., Yoo O.J., Shin E.C., Park S. Immunosenescent CD8⁺ T cells and C-X-C chemokine receptor type 3 chemokines are increased in human hypertension. *Hypertension*, 2013, Vol. 62, no. 1, pp. 126-133.

Автор:

Тимашева Я.Р. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории физиологической генетики, Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук; доцент кафедры медицинской генетики и фундаментальной медицины ИДПО, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Author:

Timasheva Ya.R., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Physiological Genetics, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences; Associate Professor at the Department of Medical Genetics and Fundamental Medicine, Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Поступила 23.08.2018
Принята к печати 19.09.2018

Received 23.08.2018
Accepted 19.09.2018

ПРЯМЫЕ ЭФФЕКТЫ ГРАНУЛОЦИТАРНО- МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МОНОЦИТОВ/МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА

**Газатова Н.Д., Меняйло М.Е., Малащенко В.В., Гончаров А.Г.,
Мелащенко О.Б., Морозова Е.М., Селедцов В.И.**

ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Резюме. Исследовали прямые эффекты гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) человека на поверхностные свойства и цитокин-продуцирующую активность моноцитов/макрофагов (Мц/Мф) человека. CD14⁺ клетки были выделены из крови здоровых доноров методом позитивной магнитной сепарации. Выделенные Мц/Мф культивировали с липополисахаридом (ЛПС, 1 мкг/мл) или без ЛПС в течение 24 ч. Мембранную экспрессию молекул CD14, CD16, CD119, CD124, CD197 оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Содержание фактора некроза опухоли-α (TNFα), интерлейкина-1β (IL-1β), IL-6 и IL-10 в культуральных супернатантах определяли иммуноферментным методом. Установлено, что GM-CSF в диапазоне концентраций 0,01–10 нг/мл заметно снижал среди неактивированных Мц/Мф количество клеток, экспрессирующих CD197 (C-С рецептор хемокина 7), существенно не влияя на процентное содержание CD14⁺ (ко-рецептор ЛПС), CD16⁺ (низкоаффинный Fc-рецептор), CD119⁺ (рецептор IFNγ) и CD124⁺ (рецептор IL-4) клеток. В то же время среди активированных Мц/Мф GM-CSF снижал содержание не только CD197⁺ клеток, но также CD14⁺, CD16⁺, и CD119⁺ клеток, существенно не изменяя количество CD124⁺ клеток. Также показано, что GM-CSF в концентрации 10 нг/мл обладал способностью усиливать продукцию активированными Мц/Мф TNFα и IL-6, но не IL-1β и IL-10. Полученные данные указывают на способность GM-CSF оказывать на макрофагальные клетки как противовоспалительное, так и провоспалительное влияние. В целом такое влияние может способствовать развитию адаптивного иммуногенеза на периферии.

Ключевые слова: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, моноцит/макрофаг, CD-экспрессия, цитокины

DIRECT EFFECTS OF GM-CSF ON THE FUNCTIONS OF HUMAN MONOCYTES/MACROPHAGES

**Gazatova N.D., Meniailo M.E., Malashchenko V.V., Goncharov A.G.,
Melashchenko O.B., Morozova E.M., Seledtsov V.I.**

I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. We investigated direct effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on the surface properties and cytokine-producing activity of human monocytes/macrophages (Mc/Mphs). The

Адрес для переписки:

Селедцов Виктор Иванович
ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени
Иммануила Канта»
236001, Россия, г. Калининград, ул. Гайдара, 6, каб. 406.
Тел.: 8 (915) 263-60-27.
E-mail: seledtsov@rambler.ru

Address for correspondence:

Seledtsov Victor I.
I. Kant Baltic Federal University
236001, Russian Federation, Kaliningrad, Gaidar str., 6-406.
Phone: 7 (915) 263-60-27.
E-mail: seledtsov@rambler.ru

Образец цитирования:

Н.Д. Газатова, М.Е. Меняйло, В.В. Малащенко,
А.Г. Гончаров, О.Б. Мелащенко, Е.М. Морозова,
В.И. Селедцов «Прямые эффекты гранулоцитарно-
макрофагального колониестимулирующего фактора
на функциональные свойства моноцитов/макрофагов
человека» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21,
№ 3. С. 419-426. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-419-426
© Газатова Н.Д. и соавт., 2019

For citation:

N.D. Gazatova, M.E. Meniailo, V.V. Malashchenko,
A.G. Goncharov, O.B. Melashchenko, E.M. Morozova,
V.I. Seledtsov "Direct effects of GM-CSF on the functions
of human monocytes/macrophages", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3,
pp. 419-426.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-419-426
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-419-426

CD14⁺ cells were isolated from peripheral blood of healthy donors by positive magnetic separation. The isolated Mc/Mphs were cultured with lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/ml) or without LPS for 24 hours. Membrane expression of CD14, CD16, CD119, CD124, and CD197 molecules was assessed by flow cytometry. The contents of tumor necrosis factor-α (TNFα), interleukin-1β (IL-1β), IL-6 and IL-10 in culture supernatants were determined by the enzyme immunoassay technique. It was found that GM-CSF at a concentration range of 0.01-10 ng/ml did significantly reduce the number of cells expressing CD197 (CC receptor of chemokine 7), without significantly affecting the percentage of CD14⁺ (coreceptor of LPS), CD16⁺ (low-affinity Fc receptor), CD119⁺ (IFNγ receptor) and CD124⁺ (IL-4 receptor) cells. At the same time, GM-CSF reduced the contents of CD197⁺ macrophages, as well as CD14⁺, CD16⁺, and CD119⁺ cells among the activated cell population, without significantly altering the number of CD124⁺ cells. It was also shown that GM-CSF (10 ng/ml), was able to enhance production of TNFα and IL-6, but not IL-1β and IL-10 by activated Mc/Mphs. The results obtained indicate the ability of GM-CSF to exert both anti-inflammatory and pro-inflammatory effects upon macrophage cell populations. In general, such effects could contribute to the development of adaptive immunogenesis in peripheral tissues.

Keywords: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte/macrophages, CD-expression, cytokines

Введение

Гранулоцитарно-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор (GM-CSF) стимулирует рост и дифференцировку гранулоцитарных и макрофагальных клеток и играет важную роль в регуляции как врожденных, так и адаптивных иммунных реакций. В частности, GM-CSF способен поддерживать дифференцировку и выживаемость дендритных клеток, запускающих антигензависимую пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов [14, 17] и регулирующих иммунные реакции на всем их протяжении [4, 7]. Важно, что GM-CSF вырабатывается не только в органах центрального гемопоэза, но и на периферии. Выработка этого цитокина резко возрастает в тканях, подвергшихся воспалению, что предполагает его вовлеченность в регуляцию иммунных процессов на периферии. GM-CSF может продуцироваться многими типами клеток, включая макрофаги (Мф), дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты, а также эндотелиальные клетки, фибробласты и гемопоэтические клетки [10, 22, 27].

Высокоаффинный рецептор для GM-CSF (GM-CSFR) представляет собой гетеродимерный комплекс, состоящий из специфичной для GM-CSF α-цепи и общей с рецепторами интерлейкина-3 (IL-3) и рецептором IL-5 сигнальной β-цепи [3]. GM-CSFR инициирует запуск JAK-STAT сигнального пути, активирует киназу семейства SRC и митоген-активированную протеинкиназу (MAPK) [13]. Связывание GM-CSF с рецептором запускает JAK2 и STAT-5 сигнальные пути, которые регулируют дифференцировку и функциональную активность клеток [5, 13], тогда как передача сигнала через PI3K поддерживает ростовую активность и выживаемость клеток [25]. GM-CSFR экспрессируется на гранулоцитах, на макрофагальных клетках, лимфоцитах и эндотелиальных клетках [2].

Очевидно, что основные эффекты GM-CSF на адаптивный иммунитет в значительной степени опосредуются макрофагальными клетками. Данная работа посвящена исследованию прямых эффектов GM-CSF на функциональную активность Мц/Мф человека.

Материалы и методы

Материалом для выделения клеток являлась венозная гепаринизированная кровь (20 мл), взятая стандартным методом из локтевой вены 14 условно здоровых доноров (мужчин и женщин в возрасте от 21 до 40 лет) с помощью вакуумных систем BD Vacutainer™ (Greiner-bio-one, Австрия). От каждого донора было получено информированное согласие.

Мононуклеарные клетки получали из крови посредством центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин (Ficoll-Paque™ Premium sterile solution, GE Healthcare, США, плотность 1,077±0,001 g/ml). CD14⁺ позитивные клетки выделяли из МНК методом позитивной колоночной иммуномагнитной сепарации с использованием магнитных частиц, конъюгированных с анти-CD14-антителами (Ат), согласно инструкции компании Miltenyi Biotec (Германия). Подсчет выделенных клеток осуществляли на автоматическом счетчике частиц (Z2, Beckman Coulter, США). Для определения чистоты и жизнеспособности клеток использовали меченные PerCP анти-CD14-Ат (eBioscience, США) и пропидиум иодид (PI, eBioscience). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре (BD Accuri®C6 Flow Cytometer, BD Biosciences) с использованием программного обеспечения C6 Flow Plus.

CD14⁺ Мц/Мф помещали в 24-луночный планшет в концентрации 1,0-1,5 × 10⁶ кл/мл и культивировали в среде TexMACS (Miltenyi Biotec) с 5,0 × 10⁻⁵ М2-меркаптоэтанолом (Acros Organics, США) во влажной атмосфере с 5% CO₂.

при 37 °C в течение 24 часов. В качестве активатора Мц/Мф использовали бактериальный липополисахарид (ЛПС) из *Salmonella typhi* (Пирогенал, МЕДГАМАЛ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Рекомбинантный GM-CSF (Miltenyi Biotec) добавляли в пробы вместе с активатором в указанных ниже концентрациях.

Для оценки экспрессии CD14, CD16, CD119, CD124 и CD197 использовали Ат, конъюгированные с флуоресцентными метками: CD14-PerCP (eBioscience), CD16-FITC, CD119-PE, CD124-APC и CD197-AF488 (BioLegend, США). Настройку цветовой компенсации проводили с помощью одноцветных контролей. Для выставления границ зоны позитива использовали неокрашенный контроль и FMO-контроль. Уровень неспецифического связывания учитывали с помощью изотип-контролей (Iso IgG2a, — APC, PE, AF488 и Iso IgG1, κ — FITC, PE, BioLegend, США).

Концентрации интерлейкина-1β (IL-1β), IL-6, IL-10, и TNFα в культуральных супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем («Вектор-Бест», Россия). Анализ осуществляли на автоматическом иммуноферментном анализаторе (ChemWell 2910, Awareness Technology, inc., США).

Статистический анализ был выполнен с использованием IBM SPSS Statistics for Windows, версия 20.0 (Armonk, NY: IBM Corp). Ни одна из выборок не имела нормального распределения по критерию Колмогорова—Смирнова. Поэтому для сравнения независимых выборок использовался непараметрический критерий Манна—Уитни. Для исследуемых выборок были рассчитаны и представлены медиана (Me) с первым и третьим квартилями ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Различия между выборками считались значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты

На рисунке 1 представлена стратегия гейтирования, позволяющая идентифицировать CD14⁺, CD16⁺, CD119⁺, CD124⁺ и CD197⁺ клетки. Чистота выделенных магнитной сепарацией CD14⁺ клеток была на уровне 98,7 (92,5–99,4) %, жизнеспособность составляла 96,3 (94,0–99,8) %.

CD14 является высокоаффинным рецептором для ЛПС и других компонентов бактериальной стенки. Взаимодействие CD14 с лигандами индуцирует продукцию и высвобождение провоспалительных цитокинов [16]. CD16 (FCγRIII) молекулы участвуют в осуществляемых Мф цитолизисе и фагоцитозе опсонизированных Ат-клеток [19]. CD119 является рецептором интерферона-γ

(IFNγ). Взаимодействие этого рецептора со своим лигандом запускает классическую провоспалительную M1-активацию макрофагальных клеток [8]. CD124 является рецептором IL-4. Связывание этого рецептора со своим лигандом инициирует альтернативную противовоспалительную M2-активацию Мф [15]. CD197 представляет собой хемокиновый C-C рецептор 7 (CCR7). Он стимулирует миграцию Мц/Мф в Т-зависимые зоны лимфоидных органов, где они вовлекаются в адаптивный иммуногенез [18].

Как показано на рисунке 2 и следует из таблицы 1, GM-CSF в диапазоне концентраций 0,01–10,0 нг/мл существенно снижал содержание CD197⁺ клеток среди неактивированных Мф. При этом он не оказывал существенного влияния на количество клеток в CD14⁺, CD16⁺, CD119⁺ и CD124⁺ субпопуляциях (табл. 1).

Активация Мц/Мф ЛПС приводила к статистически значимому увеличению количества только CD197⁺ клеток (с 8,31 (6,65–66,05) до 20,38 (7,88–50,75) $p < 0,05$). Как показано на рисунке 3 и в таблице 2, GM-CSF был способен снижать среди активированных Мф процентное содержание не только CD197⁺ клеток, но также CD14⁺, CD16⁺ и CD119⁺ клеток, не оказывая при этом существенного влияния на количество Мф, экспрессирующих CD124.

Активация ЛПС приводила к выраженному увеличению макрофагальной продукции TNFα, IL-1β, IL-6 и IL-10 (данные не представлены). Согласно данным, представленным в таблице 3, GM-CSF в максимальной концентрации (10 нг/мл) достоверно усиливал макрофагальную продукцию TNFα и IL-6, цитокинов, способных

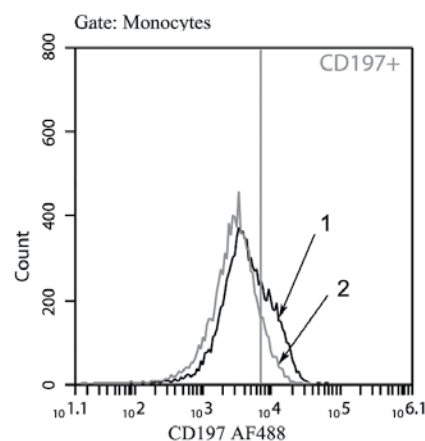


Рисунок 2. Гистограмма неактивированных CD197⁺ Мц/Мф

Примечание. 1 – неактивированные Мц/Мф, культивированные без GM-CSF; 2 – неактивированные Мц/Мф, культивированные с GM-CSF.

Figure 2. Histogram of non-activated CD197⁺ Mc/Mphs

Note. 1, non-activated Mc/Mphs without GM-CSF; 2, non-activated Mc/Mphs with GM-CSF.

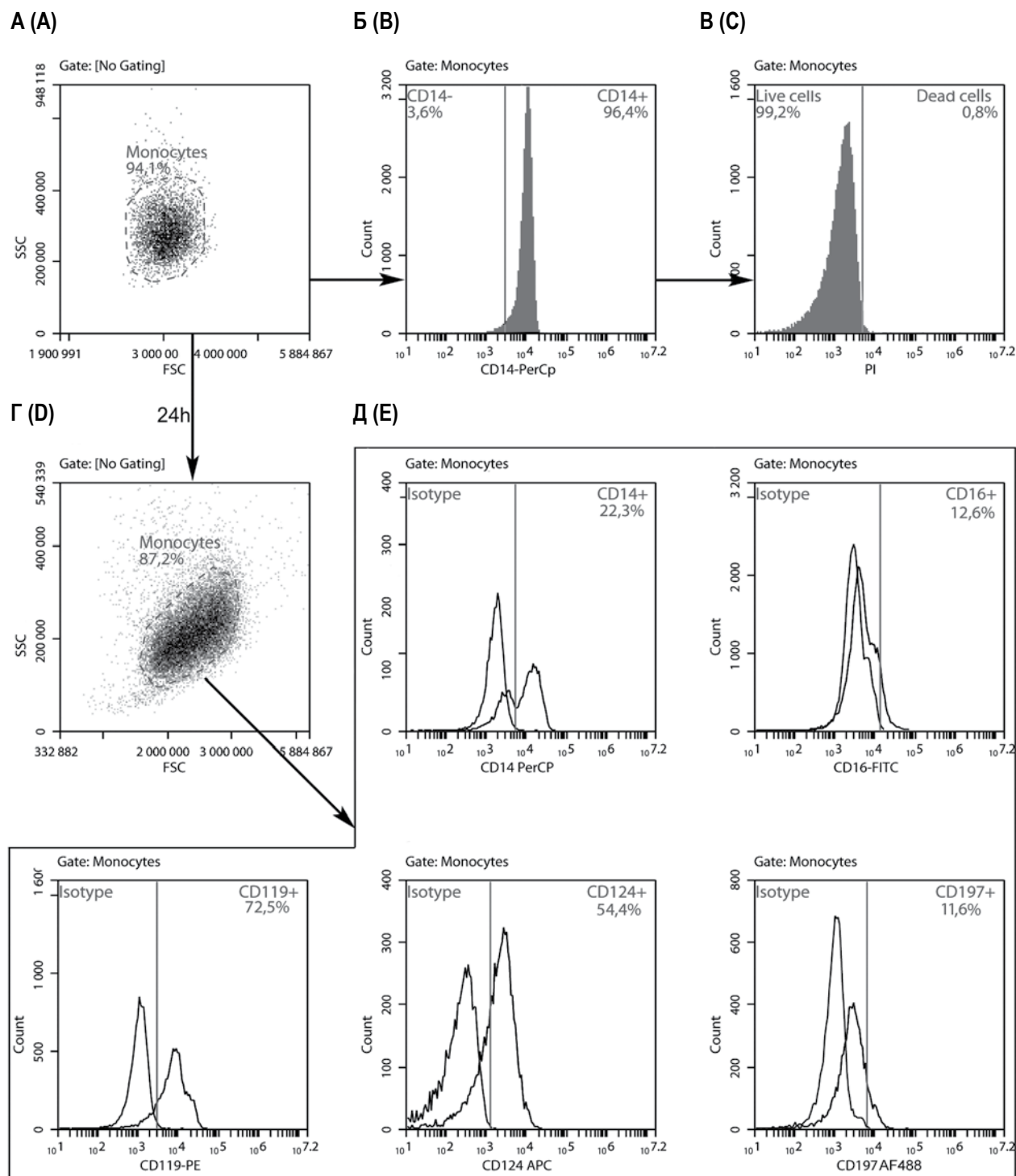


Рисунок 1. Алгоритм цитометрического анализа Мц/Мф

Примечание. А) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию до инкубации; Б) содержание CD14⁺ клеток до инкубации; В) жизнеспособность клеток, определяемая по окрашиванию PI: зона позитива – мертвые, зона негатива – живые; Г) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию после их культивирования; Д) содержание CD14⁺, CD16⁺, CD119⁺, CD124⁺ и CD197⁺ клеток среди прокультивированных Мц/Мф.

Figure 1. The flow cytometry algorithm for phenotyping of Mc/Mphs

Note. A) Forward scatter (FSC) vs. side scatter (SSC) dot plot of cells prior to incubation; B) Histogram of CD14⁺ cells prior to incubation; C) Cell viability, as visualized by PI staining: positive cells are dead, negative cells are alive; D) Forward scatter (FSC) vs. side scatter (SSC) dot plot of cells after 24 h incubation; E) Identification of CD14⁺, CD16⁺, CD119⁺, CD124⁺ and CD197⁺ cells among Mc/Mphs.

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ CD14⁺, CD16⁺, CD119⁺, CD124⁺, CD197⁺ (%) КЛЕТОК СРЕДИ НЕАКТИВИРОВАННЫХ Мц/Мф

TABLE 1. CD14⁺, CD16⁺, CD119⁺, CD124⁺, CD197⁺ (%) CELLS AMONG Mc/Mphs WITHOUT ACTIVATION

Маркер Marker	GM-CSF (нг/мл) GM-CSF (ng/ml)				
	0,0	0,01	0,1	1,0	10,0
CD14 ⁺	25,05 (23,07-32,16)	32,30 (11,94-38,25)	22,76 (11,43-34,53)	23,82 (9,55-33,49)	19,72 (11,69-41,79)
CD16 ⁺	11,06 (4,87-16,35)	5,95 (3,82-11,60)	4,59 (3,52-17,39)	8,7 (3,32-17,09)	8,35 (3,32-18,32)
CD119 ⁺	83,16 (78,07-88,75)	74,58 (58,49-82,18)	80,79 (69,83-84,08)	81,32 (70,01-88,82)	82,65 (78,62-89,37)
CD124 ⁺	47,01 (14,76-57,57)	39,60 (11,55-54,93)	47,43 (11,22-55,10)	44,45 (11,41-55,48)	47,05 (9,64-55,13)
CD197 ⁺	8,31 (6,65-66,05)	3,68* (3,58-7,73)	3,23* (3,08-5,67)	6,29* (2,51-41,62)	5,4* (2,69-47,58)

Примечание. Здесь и далее данные представлены в виде медианы, в скобках первый и третий квартили; *p < 0,05 – в сравнении с клетками без GM-CSF.

Note. Here and further data was presented as median and first and third quartiles; *p < 0.05, compared with cells without GM-CSF.

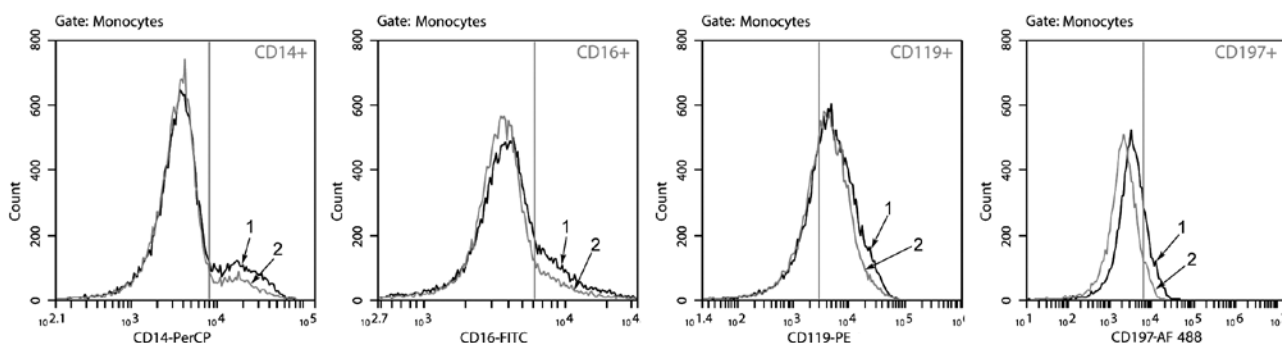


Рисунок 3. Гистограммы активированных CD14⁺, CD16⁺, CD119⁺, CD197⁺ Мц/Мф

Примечание. 1 – Мц/Мф, активированные без GM-CSF; 2 – Мц/Мф, активированные с GM-CSF.

Figure 3. Histograms of activated CD14⁺, CD16⁺, CD119⁺, CD197⁺ Mc/Mphs

Note. 1, activated Mc/Mphs without GM-CSF; 2, activated Mc/Mphs with GM-CSF.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ CD14⁺, CD16⁺, CD119⁺, CD124⁺, CD197⁺ (%) КЛЕТОК СРЕДИ АКТИВИРОВАННЫХ Мц/Мф

TABLE 2. CD14⁺, CD16⁺, CD119⁺, CD124⁺, CD197⁺ (%) CELLS AMONG Mc/Mphs WITH ACTIVATION

Маркер Marker	GM-CSF (нг/мл) GM-CSF (ng/ml)				
	0,0	0,01	0,1	1,0	10,0
CD14 ⁺	25,01 (11,37-33,46)	18,42* (7,56-30,70)	20,99* (7,98-28,95)	20,91* (7,99-31,94)	20,35* (23,07-32,16)
CD16 ⁺	12,05 (4,94-24,10)	9,11* (3,27-14,29)	8,13* (3,60-16,96)	7,75* (3,55-13,47)	8,13* (3,77-12,70)
CD119 ⁺	84,55 (65,02-86,62)	77,92 (74,54-79,66)	77,15* (65,45-80,28)	78,31* (68,12-80,31)	79,29* (67,94-79,68)
CD124 ⁺	45,12 (15,91-56,74)	45,70 (14,31-53,22)	43,79 (16,83-54,3)	42,62 (16,92-53,26)	44,92 (16,11-53,05)
CD197 ⁺	20,38 (7,88-50,75)	12,34* (6,59-46,22)	16,55* (5,44-39,62)	11,60* (5,55-38,97)	11,52* (5,46-41,86)

Примечание. *p < 0,05 – в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие GM-CSF.

Note. *p < 0.05, compared with activation cells without GM-CSF.

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В МАКРОФАГАЛЬНЫХ СУПЕРНАТАНТАХ

TABLE 3. CYTOKINE PRODUCTION (pg/ml) IN MACROPHAGE SUPERNATANTS

Цитокин Cytokine	GM-CSF (нг/мл) GM-CSF (ng/ml)				
	0,0 (без GM-CSF) (without GM-CSF)	0,01	0,1	1,0	10,0
TNF α	1198,2 (745,1-1553,6)	1284 (533,8-1638)	1166 (496,3-1516)	1282,2 (551,1-1599,8)	1418,6** (1002,4-1849,9)
IL-1 β	459,0 (265,8-507,6)	300,6 (118,2-621,6)	372,6 (183,6-683,4)	369,0 (337,8-754,8)	399 (288-757,8)
IL-6	8339 (4734-14577)	10881 (6328-13633)	9336 (5711-13269)	9192 (5103-13315)	12216** (8921-17225)
IL-10	118,98 (95,87-127,54)	124,95 (86,25-161,03)	139,2 (92,93-165,3)	93,6 (78,75-140,1)	89,85 (75,68-139,65)

Примечание. * $p < 0,05$ – в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие GM-CSF.

Note. * $p < 0.05$, compared with activation cells without GM-CSF.

поддерживать воспаление. В то же время продукция IL-1 β и IL-10, осуществляемая активированными Мц/Мф, не претерпевала существенных изменений под воздействием GM-CSF.

Обсуждение

Макрофагальные клетки обладают эффекторными, антигенпрезентирующими и иммунорегуляторными свойствами. Они играют ключевую роль в механизме, обеспечивающем взаимодействие между врожденным и приобретенным иммунитетом. Активация Мф приводит к резкому усилению их функциональной активности. Различают два вида макрофагальной активации. Классическая макрофагальная активация развивается под действием ЛПС и цитокинов, продуцируемых Т-хелперами 1 типа, среди которых ключевую роль играет IFN γ . Активированные таким образом Мф обладают выраженной провоспалительной активностью, они высоко экспрессируют CD40 (рецептор из надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли альфа) и CD64 (высокоаффинный Fc-рецептор IgG), продуцируют TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12 и IL-23, а также активные формы азота (NO) [26]. Классически активированные Мф обладают цитотоксическими свойствами и защищают организм от внутриклеточных патогенов [20]. Альтернативная макрофагальная активация развивается под действием глюкокортикоидов и цитокинов (IL-4, IL-10 и IL-13), продуцируемых Т-хелперами 2 типа. Такая активация приводит к усилению экспрессии CD163 (рецептор гемоглобин-гаптоглобиновых комплексов) и CD206 (маннозный рецептор), к стимуляции макрофагальной продукции противовоспалительных цитокинов, таких как трансформирующий ростовой фактор- β (transforming growth factor- β , TGF- β) и IL-10, и придает Мф

способность поддерживать регенеративные процессы [21]. Альтернативно активированные Мф играют важную роль в защите организма от внеклеточных патогенов [20].

В литературе доминирует мнение, что GM-CSF является провоспалительным цитокином, который способствует миграции макрофагальных клеток на периферию и поддерживает классическую M1-активацию Мф. Считается, что функциональный баланс между мигрировавшими M1 Мф и резидентными M2 Мф в значительной, если не в определяющей степени, определяет течение воспалительного процесса [12]. Однако, согласно недавно опубликованным данным, прямое ингаляционное воздействие GM-CSF на легочные Мф может придавать им противовоспалительные свойства [11]. Показано, что продукция GM-CSF в опухолевых очагах может способствовать альтернативной активации Мф, поддерживающей опухолевый рост [23]. Таким образом, GM-CSF, по-видимому, не является цитокином, односторонне поляризующим макрофагальную активацию. Это предположение подтверждается данными, не показавшими доминирование экспрессии провоспалительных генов в Мф, подвергшихся воздействию GM-CSF [12].

Согласно данным, представленным в настоящей работе, роль GM-CSF в развитии воспаления может быть двоякой. С одной стороны, посредством локальной стимуляции макрофагальной продукции провоспалительных цитокинов, в том числе TNF α и IL-6, GM-CSF может стимулировать миграцию макрофагальных клеток в воспалительный очаг и поддерживать их выживаемость [6]. С другой стороны, за счет своего негативного влияния на экспрессию CD14, CD16, CD119 и, возможно, других молекул, являющихся рецепторами провоспалительных лигандов, GM-CSF

мог бы предотвращать (сдерживать) развитие избыточных воспалительных реакций, которые могут мешать сбалансированному иммуногенезу и приводить к чрезмерному тканевому повреждению.

В нашем исследовании GM-CSF снижал количество макрофагальных клеток, экспрессирующих хемокиновый рецептор CCR7, который опосредует хемотаксис клеток в лимфоидную ткань. Ранее было показано, что потеря иммунными клетками CCR7 и приобретение ими другого хемокинового рецептора CCR5, способствует их миграции в воспалительные ткани [1, 9]. В целом снижение на Мф экспрессии CCR7 должно содействовать накоплению Мф в очаге воспаления и сдерживанию их миграционной ак-

тивности в лимфатические узлы. Биологический смысл это феномена может заключаться в создании на периферии временных условий, необходимых для поглощения Мф антигенных молекул и их дифференцировки в дендритные клетки. Такая дифференцировка сопровождается приобретением дендритными клетками CCR7 и способности мигрировать в лимфатические узлы [24], где они запускают адаптивный иммуногенез.

Выводы

Полученные данные предполагают наличие многогранного влияния GM-CSF на макрофагальные клетки, которое в целом направлено на их вовлечение в адаптивный иммуногенез.

Список литературы / References

1. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 947-964. (In Russ.)]
2. Becher B., Tugues S., Greter M. GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation. *Immunity*, 2016, Vol. 45, no. 5, pp. 963-973.
3. Broughton S.E., Nero T.L., Dhagat U., Kan W.L., Hercus T.R., Tvorogov D., Lopez A.F., Parker M.W. The β c receptor family – Structural insights and their functional implications. *Cytokine*, 2015, Vol. 74, no. 2, pp. 247-258.
4. Codarri L., Gyulveszi G., Tosevski V., Hesse L., Fontana A., Magnenat L., Suter T., Becher B. ROR gamma t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 6, pp. 560-567.
5. Croxford A.L., Spath S., Becher B. GM-CSF in neuroinflammation: licensing myeloid cells for tissue damage. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 10, pp. 651-662.
6. Darrieutort-Laffite C., Boutet M.A., Chatelais M., Brion R., Blanchard F., Heymann D., le Goff B. IL-1 β and TNF α promote monocyte viability through the induction of GM-CSF expression by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Mediators Inflamm.*, 2014, 241840. doi: 10.1155/2014/241840.
7. El-Behi M., Ciric B., Dai H., Yan Y., Cullimore M., Safavi F., Zhang G.X., Dittel B.N., Rostami A. The encephalitogenicity of T(H) 17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 6, pp. 568-575.
8. Eshleman E.M., Delgado C., Kearney S.J., Friedman R.S., Lenz L.L. Down regulation of macrophage IFNGR1 exacerbates systemic L. monocytogenes infection. *PLoS Pathog.*, 2017, Vol. 13, e1006388. doi: 10.1371/journal.ppat.1006388.
9. Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, 2001, Vol. 194, no. 12, pp. 1711-1720.
10. Greter M., Helft J., Chow A., Hashimoto D., Mortha A., Agudo-Cantero J., Boqunovic M., Gautier E.L., Miller J., Leboeuf M., Lu G., Aloman C., Brown B.D., Pollard J.W., Xiong H., Randolph G.J., Chipuk J.E., Frenette P.S., Merad M. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 6, pp. 1031-1046.
11. Halstead, E. S., Umstead, T. M., Davies, M. L., Kawasawa, Y. I., Silveyra, P., Howyrlak, J., Yang L., Guo W., Hu S., Hewage E.K., Chroneos Z.C. GM-CSF overexpression after influenza A virus infection prevents mortality and moderates M1-like airway monocyte/macrophage polarization. *Resp. Res.*, 2018, Vol. 19, no. 1, p. 3.
12. Hamilton T.A., Zhao C., Pavicic Jr P. G., Datta S. (2014). Myeloid colony-stimulating factors as regulators of macrophage polarization. *Front. Immunol.*, Vol. 5, p. 554.
13. Hercus T.R., Dhagat U., Kan W.L., Broughton S.E., Nero T.L., Perugini M., Sandow J.J., d'Andrea R.J., Ekert P.G., Hughes T., Parker M.W., Lopez A.F. Signalling by the β c family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2013, Vol. 24, no. 3, pp. 189-201.
14. Hercus T.R., Guthridge M.A., Ekert P.G., King-Scott J., Parker M.W., Lopez A.F. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 7, pp. 1289-1298.
15. Hurdal R., Brombacher F. Interleukin-4 receptor alpha: from innate to adaptive immunity in murine models of Cutaneous Leishmaniasis. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1354. doi: 10.3389/fimmu.2017.01354.
16. Lau M.Y., Dharmage S.C., Burgess J.A., Win A.K., Lowe A.J., Lodge C., Perret G., Hui J., Thomas P.S., Morrison S., Giles G.G., Hopper J., Abramson M.J., Walters E.H., Matheson M.C. The interaction between farming/

rural environment and TLR2, TLR4, TLR6 and CD14 genetic polymorphisms in relation to early- and late-onset asthma. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 43681. doi: 10.1038/srep43681.

17. Mach N., Gillessen S., Wilson S.B., Sheehan C., Mihm M., Dranoff G. Differences in dendritic cells stimulated *in vivo* by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.*, 2000, Vol. 60, no. 12, pp. 3239-3246.

18. Meniailo M.E., Malashchenko V.V., Shmarov V.A., Gazatova N.D., Melashchenko O.B., Goncharov A.G., Seledtsova G.V., Seledtsov V.I. Interleukin-8 favors pro-inflammatory activity of human monocytes/macrophages. *Int. Immunopharmacol.*, 2018, Vol. 56, pp. 217-221.

19. Mukherjee R., Barman P.K., Thatoi P.K., Tripathy R., Das B.K., Ravindran B. Non-classical monocytes display inflammatory features: validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 13886. doi: 10.1038/srep13886.

20. Seledtsov V.I., Seledtsova G.V. A balance between tissue-destructive and tissue-protective immunities: a role of toll-like receptors in regulation of adaptive immunity. *Immunobiology*, 2012, Vol. 217, no. 4, pp. 430-435.

21. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaili S.A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J.T., Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.*, 2018, Vol. 233, no. 9, pp. 6425-6440.

22. Shiomi A., Usui T. Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 568543. doi: 10.1155/2015/568543.

23. Sielska M., Przanowski P., Wylot B., Gabrusiewicz K., Maleszewska M., Kijewska M., Zawadzka M., Kucharska J., Vinnakota K., Kettenmann H., Kotulska K., Grajkowska W., Kaminska B. Distinct roles of CSF family cytokines in macrophage infiltration and activation in glioma progression and injury response. *J. Pathol.*, 2013, Vol. 230, no. 3, pp. 310-321.

24. Son Y., Kim B.Y., Park Y.C., Kim K. Diclofenac Inhibits 27-hydroxycholesterol-induced differentiation of monocytic cells into mature dendritic cells. *Immune Netw.*, 2017, Vol. 17, no. 3, pp. 179-185.

25. van de Laar L., Coffey P.J., Woltman A.M. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 15, pp. 3383-3393.

26. Vogel D.Y., Glim J.E., Stavenhagen A.W., Breur M., Heijnen P., Amor S., Dijkstra C.D., Beelen R.H. Human macrophage polarization *in vitro*: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, 2014, Vol. 219, no. 9, pp. 695-703.

27. Wicks I.P., Roberts A.W. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2016, Vol. 12, no. 1, pp. 37-48.

Авторы:

Газатова Н.Д. — научный сотрудник центра медицинских биотехнологий ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Меняйло М.Е. — младший научный сотрудник центра медицинских биотехнологий ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Малашченко В.В. — младший научный сотрудник центра медицинских биотехнологий ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Гончаров А.Г. — к.м.н., директор института живых систем ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Мелашченко О.Б. — научный сотрудник центра медицинских биотехнологий ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Морозова Е.М. — младший научный сотрудник центра медицинских биотехнологий ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Седецов В.И. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник центра медицинских биотехнологий ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Gazatova N.D., Research Associate, Center of Medical Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Meniailo M.E., Junior Research Associate, Center of Medical Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Malashchenko V.V., Junior Research Associate, Center of Medical Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Goncharov A.G., PhD (Medicine), Director, Institute of Live Systems, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Melashchenko O.B., Research Associate, Center of Medical Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Morozova E.M., Junior Research Associate, Center of Medical Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Seledtsov V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Center of Medical Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Поступила 27.08.2018

Отправлена на доработку 19.09.2018

Принята к печати 20.09.2018

Received 27.08.2018

Revision received 19.09.2018

Accepted 20.09.2018

ВЛИЯНИЕ НК-КЛЕТОК НА АНГИОГЕНЕЗ В УСЛОВИЯХ КОНТАКТНОГО И ДИСТАНТНОГО СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ И КЛЕТКАМИ ТРОФОБЛАСТА

Маркова К.Л.¹, Степанова О.И.¹, Шевелева А.Р.¹, Костин Н.А.²,
Михайлова В.А.^{1,3}, Сельков С.А.^{1,3}, Соколов Д.И.^{1,3}

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

² Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий», Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Регуляция ангиогенеза в зоне маточно-плацентарного контакта определяет адекватную инвазию трофобласта, формирование и развитие плаценты, успешное протекание беременности. Наиболее значительное влияние на ангиогенез оказывают НК-клетки, макрофаги, трофобласт. На сегодняшний день довольно подробно описаны функции клеток-участников формирования плаценты как по отдельности (*in vitro*), так и в составе тканей (*in situ*). Однако до сих пор не создано моделей, отражающих взаимодействие НК-клеток, трофобласта и эндотелия в ходе ангиогенеза. До настоящего времени остается неразрешенным вопрос о вкладе каждой клеточной популяции в регуляцию не только ангиогенеза в плаценте, но и о перекрестной регуляции функций клеток-участников. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение контактного и дистантного влияния НК-клеток на образование капилляроподобных структур сокультурой эндотелиальных клеток и клеток трофобласта под влиянием различных цитокинов (bFGF, VEGF, PlGF, TGF- β , IL-8, IFN γ , IL-1 β). Введение в сокультуру ЭК и трофобласта НК-клеток в условиях дистантного и контактного культивирования не изменяло длину капилляроподобных структур, образованных ЭК. При контактном культивировании НК-клеток с сокультурой ЭК и трофобласта в присутствии IL-1 β длина капилляроподобных структур не изменялась по сравнению с культивированием в тех же условиях, но в отсутствие цитокина. При дистантном культивировании НК-клеток с сокультурой ЭК и трофобласта в присутствии IL-1 β произошло увеличение длины капилляроподобных структур по сравнению с культивированием в тех же условиях, но в отсутствие цитокина. При контактном, но не дистантном, культивировании НК-клеток с сокультурой ЭК и трофобласта в присутствии VEGF длина капилляроподобных структур была больше по сравнению с культивированием в тех же условиях, но в отсутствие цитокина. В трех-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Маркова К.Л., Степанова О.И., Шевелева А.Р., Костин Н.А., Михайлова В.А., Сельков С.А., Соколов Д.И. «Влияние НК-клеток на ангиогенез в условиях контактного и дистантного сокультивирования с эндотелиальными клетками и клетками трофобласта» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 427-440.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-427-440

© Маркова К.Л. и соавт., 2019

For citation:

K.L. Markova, O.I. Stepanova, A.R. Sheveleva, N.A. Kostin, V.A. Mikhailova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov "Natural killer cell effects upon angiogenesis under conditions of contact-dependent and distant co-culturing with endothelial and trophoblast cells", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 427-440. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-427-440

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-427-440

компонентной клеточной системе провоспалительный цитокин $IFN\gamma$ не оказывал эффекта в отношении ангиогенеза. При дистантном, но не контактном, культивировании НК-клеток с сокультурой ЭК и трофобласта в присутствии $TGF-\beta$ длина капилляроподобных структур была меньше по сравнению с культивированием в тех же условиях, но в отсутствие цитокина. В условиях дистантного культивирования $TGF-\beta$ запускает ингибирующий ангиогенез сигнал от НК-клеток. Установлено снижение длины капилляроподобных структур в условиях трехкомпонентной клеточной сокультуры в присутствии проангиогенных факторов: IL-8, PlGF (только при контактном культивировании) и bFGF (при контактном и дистантном культивировании). Таким образом, эффекты цитокинов в отношении ангиогенеза в трехкомпонентной сокультуре (НК-клетки, трофобласт, эндотелий) отличаются от установленных ранее в однокомпонентных (только эндотелий) и двухкомпонентных (сокультура эндотелия и трофобласта) клеточных моделях. Данные, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют о наличии в плаценте цитокиново-контактной регуляции межклеточных взаимодействий.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки, трофобласт, НК-клетки, ангиогенез, цитокины

NATURAL KILLER CELL EFFECTS UPON ANGIOGENESIS UNDER CONDITIONS OF CONTACT-DEPENDENT AND DISTANT CO-CULTURING WITH ENDOTHELIAL AND TROPHOBLAST CELLS

Markova K.L.^a, Stepanova O.I.^a, Sheveleva A.R.^a, Kostin N.A.^b,
Mikhailova V.A.^{a, c}, Selkov S.A.^{a, c}, Sokolov D.I.^{a, c}

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

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

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

Abstract. Regulation of angiogenesis in the utero-placental bed determines adequate trophoblast invasion, placenta formation and development, as well as successful course of pregnancy. Natural killer (NK) cells, macrophages and trophoblast have the most significant effect on angiogenesis. To date, the functions of cells participating in placenta formation have been described in detail, both individually (*in vitro*) and in tissues (*in situ*). However, no models have yet been created that reflect the interactions of NK cells, trophoblast and endothelium during angiogenesis. It remains unclear, how each cell population contributes to placental angiogenesis regulation, and to the cross-regulation of participating cell functions. Therefore, the aim of this research was to study contact and distant effects of NK cells upon formation of tube-like structures through co-culture of endothelial and trophoblast cells influenced by various cytokines (bFGF, VEGF, PlGF, $TGF-\beta$, IL-8, $IFN\gamma$ and IL-1 β). Introduction of NK cells to the co-culture of endothelial and trophoblast cells under conditions of both contact and distance-dependent culturing did not change the length of tube-like structures formed by endothelial cells. During contact-dependent culturing of NK cells with co-culture of endothelial and trophoblast cells in presence of IL-1 β , the length of tubule-like structures remained unchanged, compared with the length of tube-like structures formed under the same culturing conditions, but without the cytokine added. During distant culturing of NK cells with co-culture of endothelial and trophoblast cells in the presence of IL-1 β , the length of tube-like structures increased as compared with those formed under the same culturing conditions but without the cytokine. During contact-dependent (but not distant) culturing of NK cells with the co-culture of endothelial and trophoblast cells in the presence of VEGF, the length of tube-like structures was greater than those formed under the same culturing conditions but without the cytokine. When used in a three-component cell system, the pro-inflammatory cytokine $IFN\gamma$ had no effect upon angiogenesis. During distant (but not contact-dependent) culturing of NK cells with co-culture of endothelial and trophoblast cells in the presence of $TGF-\beta$, the length of tube-like structures was less than the length of tube-like structures formed under the same culturing conditions but without the cytokine. Under conditions of distant culturing, $TGF-\beta$ triggered a signal in NK cells that inhibited angiogenesis. Decreased length of tube-like structures under conditions of a three-component cell co-culture in the presence of the following pro-angiogenic factors was

revealed: IL-8, PlGF (during contact-dependent culturing only) and bFGF (during both contact-dependent and distant culturing). Thus, the effects of cytokines upon angiogenesis in a three-component co-culture (NK cells, trophoblast and endothelium) differed from those revealed previously in single-component (endothelium only) and two-component (co-culture of endothelium and trophoblast) cell models. The results of these experiments indicated that regulation of placental cell interactions involved both cellular contacts and effects produced by cytokines.

Keywords: endothelial cells, trophoblast, natural killer cells, angiogenesis, cytokines

Introduction

Placenta formation is a coordinated process that requires participation of a variety of cell populations on both the fetal and maternal sides. An imbalance of cell interactions in the uteroplacental bed can lead to various obstetric complications such as preeclampsia or chronic placental insufficiency [17, 86].

Adequate development of placental vasculature plays a key role in placenta formation [15, 72]. Placenta vasculature is formed by vasculogenesis and then angiogenesis [2, 42]. VEGF, bFGF, PlGF, TGF- β , IFN γ , IL-1 β , IL-6 and IL-8 can be singled out from other cytokines produced in the placenta and decidua in considerable quantities. These cytokines actively affect angiogenesis. They also participate in regulation of immune cell function and in formation of immunological tolerance during pregnancy. The sources of these cytokines are both endothelial cells and the cellular microenvironment, which includes trophoblast, decidual NK cells, and decidual and placental macrophages [1, 3, 21, 54, 61].

Development of placental vasculature occurs against a background of close interaction between endothelial and trophoblast cells. In particular, this interaction occurs during transformation of the uterine spiral arteries [9, 36, 74]. Endovascular trophoblast invasion and the cytokines produced cause apoptosis of uterine spiral artery endothelial cells [35, 87]. Concurrently, trophoblast produces angiogenic factors (VEGF and MMP) and cytokines (IL-1 β , IFN γ , TNF α , IL-4 and IL-10). Trophoblast affects the nature of angiogenesis in the placenta, decidua and endometrium [1]. Specific contacts are created between endothelial cells and endovascular trophoblast cells [5, 12].

Trophoblast invasion is regulated by the cellular microenvironment in which decidual NK cells play a pivotal role [49]. Decidual NK cells secrete a wide range of cytokines, chemokines and growth factors (IP-10, IL-8, VEGF, PlGF and IL-22) [85, 88], which affect the trophoblast cell phenotype [50, 68, 90]. Trophoblast cells are semiallogenic compared with the mother, thus during implantation trophoblast cells should avoid the adverse effects of maternal immune cells (decidual NK cells, in particular). This can be achieved through interactions between the inhibitory receptors on decidual NK cells (KIR2DL1/S1 and KIR2DL2/S2, Nkp46, Nkp30 and Nkp44;

LILRB1 and CD94/NKG2A [28, 57]) and molecules of the MHC class I locus on trophoblast cells (HLA-C, HLA-E and HLA-G [19]). Soluble HLA-G (sHLA-G) secreted by trophoblast cells inhibits endothelial cell proliferation and migration, as well as the angiogenesis induced by bFGF or VEGF. It does this by binding to the CD160 receptor on the surface of endothelial cells and causing apoptosis [30, 52]. sHLA-G1 has also been shown to cause apoptosis of NK cells [11, 23, 30, 89].

At pregnancy onset, the level of NK cells in the uterus increases dramatically to comprise about 70% of all endometrial leukocytes. As gestation progresses, the number of decidual NK cells decreases approaching zero in late pregnancy [13, 55, 81]. Uterine NK cells with the CD56^{bright}CD16^{dim/-} phenotype are subdivided into decidual NK cells and endometrial NK cells. Like the CD56^{dim/low}CD16^{bright} population of peripheral blood NK cells, they express KIR and have lytic granules [22, 34]. Uterine NK cells differ from peripheral blood NK cells due to their lower cytotoxicity and greater regulatory activity [88]. Moreover, decidual NK cells and endometrial NK cells express tetraspanin (CD9) and CD151 along with a number of immunosuppressive and angiogenic genes (expressed by no other subpopulation of peripheral blood NK cells) [34, 47, 80, 88]. Decidual NK cells secrete IL-2, IL-15, IFN γ , VEGF-A, VEGF-C, IL-8, TGF- β , PlGF, Ang1, Ang2 [43], uPA, uPAR, MMP [64] MIP1a, GM-CSF, CSF1, and other mediators [66] able to influence endothelial cells and the cellular microenvironment. Decidual NK cells are capable of cytotoxic actions via three main mechanisms: (i) exocytosis of lytic granules (contact-dependent interaction), (ii) ligand-mediated interaction with Fas and TRAIL death receptors (contact-dependent interaction) [59], and (iii) secretion of TNF α and IFN γ cytokines, and soluble forms of Fas (sCD95) receptors (distant interaction).

To date, the functions of cells participating in placental formation have been described in detail, both individually (*in vitro*) and in tissues (*in situ*). However, models have not yet been developed to reflect the interaction between NK cells, macrophages, trophoblast and endothelium during angiogenesis. Currently, the relative contribution of each cell population to the regulation of placental angiogenesis and to the cross-regulation of participating cell

functions remains unclear. In fact, all existing *in situ* models and factual descriptions are limited in this sense. Therefore, the aim of this research was to study the effect of NK cells on the formation of tube-like structures by endothelial cells when co-cultured with trophoblast cells.

Materials and Methods

Cells

Trophoblast cells of the JEG-3 line (ATCC, USA) were used. These reproduce the morphological, phenotypic and functional characteristics of the invasive trophoblast of the first trimester of pregnancy [38, 44]. The cells were cultured in DMEM supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (FCS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.5 mM L-glutamine, 1 ml MEM and 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA). The cell monolayer was disintegrated using Versene and Trypsin solutions (Biolot, Russia) mixed in a 1:1 ratio.

Endothelial cells of the EA.Hy926 cell line were kindly provided by Dr. C.J. Edgel (University of North Carolina, USA). These cells reproduce all the main characteristics of endothelial cells [27]. The cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 10% FCS, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA), 8 mmol/L L-glutamine and HAT (Sigma, USA). Subcultivation was performed once every 3-4 days, with monolayer disintegration caused by exposure to Versene solution for 5 minutes.

Cells of the NK-92MI cell line (ATCC, USA) reproduce basic phenotypic and functional characteristics of activated NK cells [32, 46]. The cells were cultured in α -MEME containing 12.5% inactivated FCS, 12.5% inactivated donor horse serum, 0.2 mM myoinositol, 0.02 mM folic acid, 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 10 mM HEPES buffer, and 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA). All experiments with cell lines were carried out in an incubator, in a humid atmosphere at 37 °C under 5% CO₂. Cell viability was assessed using Trypan blue solution and was at least 96%.

Cytokines

To activate the cells, recombinant human cytokines were used: bFGF (1, 10 and 20 ng/ml), VEGF (1, 10 and 100 ng/ml), PlGF (1, 5 and 20 ng/ml), TGF- β (1, 5 and 10 ng/ml), IL-8 (1, 10 and 100 ng/ml, all from CytoLab, Israel); IFN γ (40, 400 and 1000 U/ml, Gammaferon, Ferment Scientific Production Association (NPO); Sanitas, Lithuania); IL-1 β (10, 100 and 1000 U/ml, Betaleukin, Scientific Research Institute of Extremely Pure Biopreparations (NIIOChB), St. Petersburg, Russia).

To assess formation of tube-like structures, 1.5×10^5 endothelial cells of the EA.Hy926 cell line

and 7.5×10^5 cells of the JEG-3 cell line, both in 250 µL of medium without FCS, were added to the wells of a 24-well plate pre-treated with Matrigel Growth Factor Reduced (Becton Dickinson, USA) [62, 69]. 5.5×10^4 cells of the NK-92MI cell line per well in 500 µL of medium without FCS were added to a number of the wells (directly to each well, contact-dependent culturing). Polycarbonate membrane inserts (1 µm pore size, BD, USA) were installed into other wells and then 5.5×10^4 cells of the NK-92MI cell line in 500 µL of culture medium without FCS were added to these inserts (distant culturing). Cytokines were added to both the wells and to the polycarbonate inserts. Culture medium (500 µL) was added to the control wells. FCS content was adjusted to 2.5% in all wells and inserts. The plate was incubated for 24 hours (37 °C, 5% CO₂). The experiments were repeated twice. Three repetitions were carried out for each position in the experiment. Using the AxioObserver.Z1 microscope and the Axio Vision computer image analysis system (Zeiss, Germany), five fields of view were taken into consideration and the length (in micrometres) of the produced tube-like structures in each well was estimated (Figure 1).

Laser scanning confocal microscopy

The relative position of endothelial cells and trophoblast cells in the absence of NK-92MI cells was assessed using the Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope (Germany). An oil immersion lens with a magnification of 20.0×0.7 was also used. Vital fluorescent dyes were used to stain the cells, green for endothelial cells (Calcein AM, BD, USA), and red for trophoblast cells (SNARF-1, ThermoFisher Scientific, USA), as per the manufacturer's directions. Matrigel matrix for cell culturing was preliminarily superimposed onto a cover glass (Carl Roth GmbH, Germany) placed into a well of a 24-well plate. Endothelial and trophoblast cells were then cultured on the Matrigel matrix as mentioned above. To fix the cells, we used the mounting medium with DAPI (BIOZOL, Germany). All images were obtained using identical settings of laser power and fluorochrome detection ranges. Figure 2 (see 2nd page of cover) shows images corresponding to the maximum brightness projection obtained using ImageJ software. The areas occupied by cells were calculated using the ImageJ software.

Statistical analyses were conducted using Statistica 10 software. The data are presented descriptively, with the nonparametric Mann–Whitney U-test used for between group comparisons. We estimated the length of tube-like structures formed by endothelial cells under different co-culturing conditions and with different cytokine additions. We then compared the results obtained with the control sample (endothelial cells cultured with trophoblast cells in culture medium without inducers). The level of tube-like structure

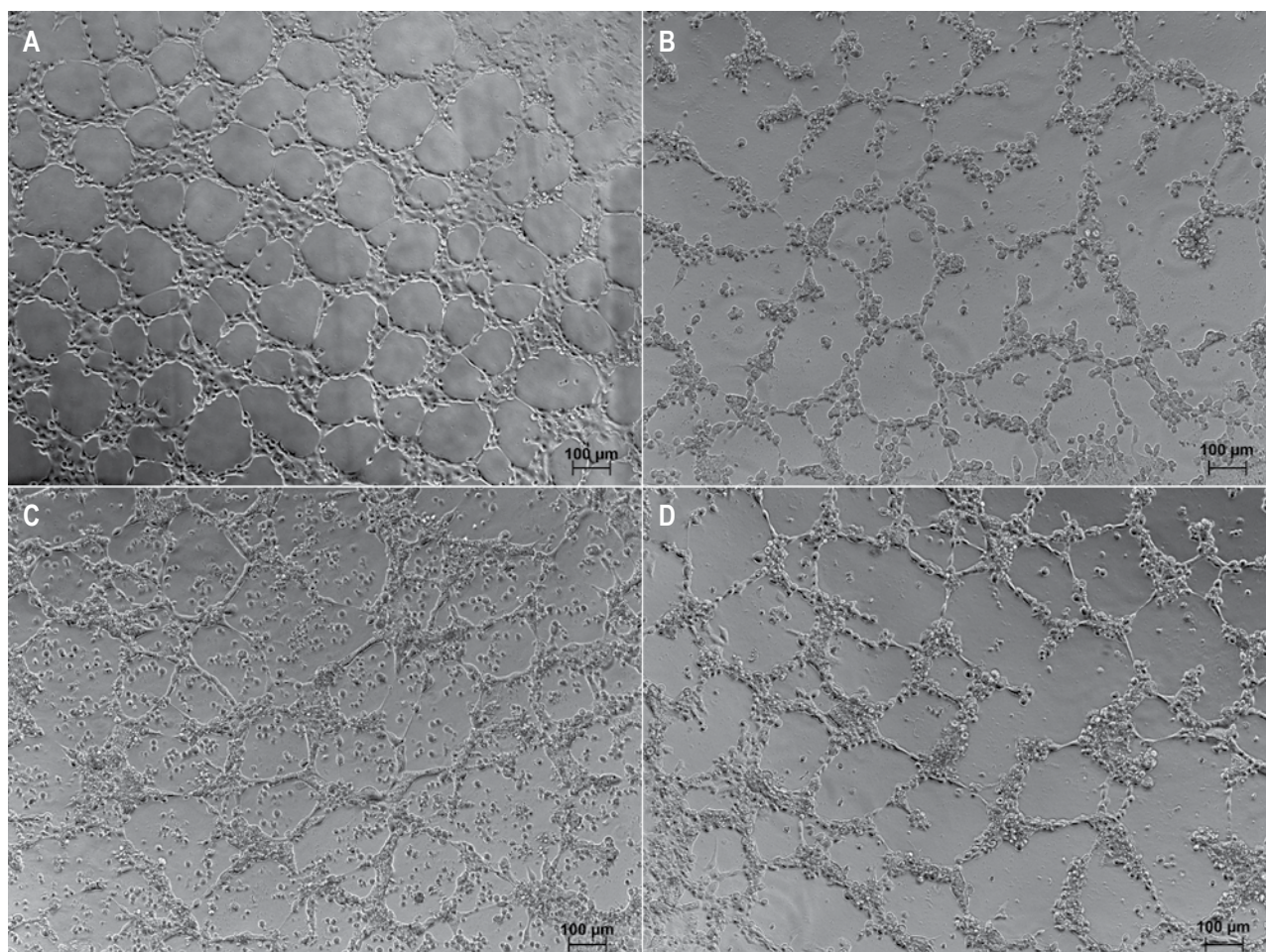


Figure 1. Tube-like structures formed by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line in the presence of: A, 2.5% FCS (constitutive level); B, trophoblast cells of the JEG-3 cell line; C, contact-dependent culturing of endothelial cells of the EAhy926 cell line, trophoblast cells of the JEG-3 cell line and natural killers of the NK-92MI cell line; D, distant culturing of endothelial cells of the EAhy926 cell line, trophoblast cells of the JEG-3 cell line and natural killers of the NK-92 cell line. Phase contrast, $\times 100$.

formation by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line in the culture medium supplemented with 2.5% FCS was taken as zero.

Results

The length of tube-like structures formed by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line was the same whether monocultured or co-cultured with cells of the JEG-3 cell line (Figure 1, Figure 3).

Scanning confocal microscopy demonstrated that when co-cultured on the Matrigel matrix, endothelial and trophoblast cells produced branched and dense cell strands (tube-like structures) of nonuniform composition (Figure 2, see 2nd page of cover). Endothelial cells (green) adjoined each other closely, exactly as trophoblast cells (violet) did. Moreover, endothelial cells contacted trophoblast cells closely to form branched cell strands. Trophoblast cells formed cell strands independently and when integrated into tube-like structures formed by endothelial

cells, thus replacing or covering endothelial cells. Most of the endothelial and trophoblast cells had a round shape of the same size. In some parts of the strands, endothelial cells took a prolate shape. Using ImageJ software, we calculated the area occupied by each cell type. In Figure 2 (see 2nd page of cover), endothelial and trophoblast cells occupied $76 \mu\text{m}^2$ and $59 \mu\text{m}^2$, respectively. Thus, endothelial cells comprised approximately 56%, and trophoblast cells approximately 44% of a cell strand area ($135 \mu\text{m}^2$).

Introduction of NK-92MI cells into this co-culture of endothelial and trophoblast cells under conditions of both distant and contact-dependent culturing did not change the length of tube-like structures formed by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line (Figure 1, Figure 3).

During contact-dependent culturing of endothelial cells and trophoblast cells of the JEG-3 cell line with NK cells in the presence of bFGF 10 ng/ml, the length of tube-like structures decreased compared with the

length of tube-like structures formed under the same culturing conditions but without bFGF (Figure 3). During distant culturing of endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line with NK cells in the presence of bFGF, the length of tube-like structures decreased at all concentrations of bFGF compared with the length of tube-like structures formed under the same culturing conditions but without addition of the cytokine. It was established that the length of tube-like structures formed during distant culturing of endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line with NK cells in the presence of bFGF 10 ng/ml was longer than the length formed under the same culturing conditions but in the presence of bFGF 1 ng/ml. It was also longer than the length of tube-like structures formed during contact-dependent culturing of endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line with NK cells in the presence of the same cytokine concentration (Figure 3).

During contact-dependent culturing of endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line with NK cells in the presence of VEGF, the length of tube-like structures increased at all VEGF concentrations compared with the length formed under the same culturing conditions but without VEGF (Figure 4). The length of tube-like structures formed during distant culturing of endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line with NK cells in the presence of VEGF remained unchanged compared with the length formed under the same culturing conditions but without the growth factor.

During contact-dependent culturing of endothelial and trophoblast cells with NK cells in the presence of PlGF 1 and 20 ng/ml, the length of tube-like structures was less than the length formed under the same culturing conditions but without addition of PlGF (Figure 4). The length of tube-like structures formed during distant culturing of endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line with NK cells in the presence of PlGF remained unchanged compared with the length formed under the same culturing conditions but without the growth factor.

During both contact-dependent and distant culturing of endothelial and trophoblast cells with NK cells in the presence of IFN γ , the length of tube-like structures did not change compared with the length formed under the same culturing conditions but without IFN γ (Figure 5).

During distant culturing of endothelial cells and trophoblast cells of the JEG-3 cell line with NK cells in the presence of IL-1 β 0.1 ng/ml, the length of tube-like structures increased compared with the length formed under the same culturing conditions but without IL-1 β . It was also increased compared with the length formed during contact-dependent culturing of endothelial and trophoblast cells with the same IL-1 β concentration. During contact-dependent culturing of endothelial and trophoblast

cells of the JEG-3 cell line in the presence of NK cells and IL-1 β , the length of tube-like structures remained unchanged (Figure 5).

In the presence of IL-8 1 and 100 ng/ml, the length of tube-like structures formed during contact-dependent culturing of endothelial and trophoblast cells with NK cells decreased compared with the length of tube-like structures formed under the same culturing conditions but without IL-8. During distant culturing of endothelial and trophoblast cells with NK cells in the presence of IL-8, the length of tube-like structures did not differ from the length formed under the same culturing conditions but without the addition of IL-8 (Figure 6).

The length of tube-like structures formed during distant culturing of endothelial and trophoblast cells with NK cells in the presence of TGF- β 5 and 10 ng/ml was decreased compared with the length of tube-like structures formed under the same culturing conditions but without the cytokine. During distant culturing of endothelial and trophoblast cells with NK cells in the presence of TGF- β 5 ng/ml, the length of tube-like structures was less than the length formed during contact-dependent culturing of endothelial and trophoblast cells with NK cells in the presence of TGF- β 5 ng/ml (Figure 6).

Discussion

Angiogenesis in the placenta and in the decidua is regulated by endothelial cells, trophoblast cells, NK cells, macrophages and other microenvironment cells via contact interactions and cytokine production. Studies on the interactions between placental cells *in vitro* are difficult due to the challenges with isolating pure primary cultures of endothelial, decidual NK and trophoblast cells from the placenta of the same woman. The use of cell lines in this case is the most convenient alternative to study the interactions of cells in culture. The advantage of our approach is that the modeling of interactions between endothelial cells and microenvironment cells are under conditions that are close to those experienced *in vivo* [6]. Endothelial cells placed on a three-dimensional matrix do not proliferate, and instead quickly attach and form a network of tube-like structures [10, 33]. When cultured on the Matrigel matrix, trophoblast cells form tube-like structures and simultaneously show their endovascular phenotype [37]. Trophoblast invasion and participation in vascular remodeling in the uteroplacental bed have been studied [39, 77]. It is assumed that trophoblast cells cause apoptosis of endothelial cells and replace them, thereby contributing to formation of blood flow between mother and fetus [35, 53]. We found no literature describing the mutual arrangement of trophoblast cells and endothelial cells in placental vessels. We established in this research that trophoblast cells did

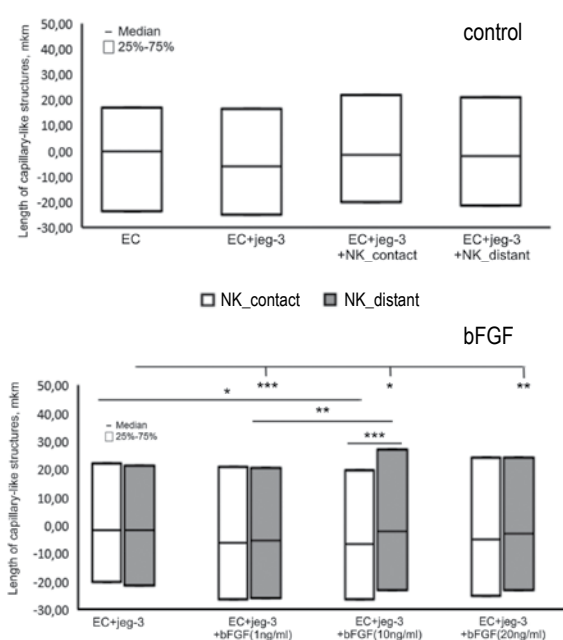


Figure 3. Formation of tube-like structures by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line in the presence of cells of the JEG-3 cell line and bFGF during their distant or contact-dependent culturing with cells of the NK92MI cell line

Note. EC, culturing of endothelial cells (constitutive level); EC+JEG-3, culturing of endothelial cells with unstimulated cells of the JEG-3 cell line; EC+JEG-3+NK_contact, contact-dependent culturing of endothelial cells with unstimulated cells of the JEG-3 cell line and unstimulated cells of the NK92MI cell line; EC+JEG-3+NK_distant, distant culturing of endothelial cells with unstimulated cells of the JEG-3 cell line and unstimulated cells of the NK92MI cell line; EC+JEG-3+bFGF, culturing of endothelial cells with cells of the JEG-3 cell line in the presence of bFGF. NK_distant, distant culturing: a porous polycarbonate membrane separates NK cells from the co-culture of endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line. NK_contact, contact-dependent co-culturing of cells of the NK-92MI cell line, endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line. The significance of differences between groups: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

not change the length of tube-like structures formed by endothelial cells, which was consistent with prior work [76]. Using confocal microscopy, we found that trophoblast cells made up almost half of the tube-like structure. Previous research established that, when remodeling the uterine spiral arteries, trophoblast cells induced apoptosis of endothelial cells and replaced them by differentiating into endovascular trophoblast [35, 87]. Our model revealed that trophoblast cells cause death of some endothelial cells during tube-like structure formation by endothelial cells on the Matrigel matrix. Trophoblast cells use endothelial cells as a frame and replace them by integrating into them.

We suggested that co-culturing of three cell lines (endothelial cells, trophoblast cells and NK cells) could serve as a model of placental processes. Introduction of cells of the NK-92MI cell line into the co-culture

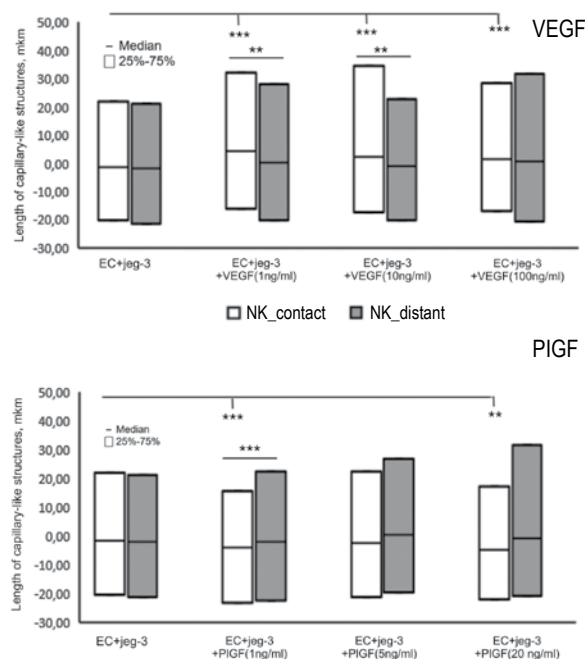


Figure 4. Formation of tube-like structures by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line in the presence of cells of the JEG-3 cell line and VEGF or PlGF during their distant or contact-dependent culturing with cells of the NK92MI cell line

Note. EC+JEG-3, culturing of endothelial cells with cells of the JEG-3 cell line; EC+JEG-3+VEGF, culturing of endothelial cells with cells of the JEG-3 cell line in the presence of VEGF; EC+JEG-3+PlGF, culturing of endothelial cells with cells of the JEG-3 cell line in the presence of PlGF. NK_distant, distant culturing: a porous polycarbonate membrane separates NK cells from the co-culture of endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line. NK_contact, contact-dependent co-culturing of cells of the NK-92MI cell line, endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line. The significance of differences between groups: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

of endothelial and trophoblast cells under conditions of both distant and contact-dependent culturing did not change the length of tube-like structures formed by endothelial cells. We found no literature indicating that NK cells acquired the phenotype and properties of decidual NK cells when cultured with trophoblast cells and/or endothelial cells on the Matrigel matrix. Studies are currently underway in this area. Cerdeira et al. showed that cytotoxic NK cells, under the action of TGF- β and methylating agents, changed their phenotype to that characteristic of decidual NK cells [18]. Macrophages and trophoblast are the main sources of TGF- β in the placenta [1, 3]. Therefore, the absence of changes in the length of tube-like structures in a three-component cell culture indirectly supports the assumption that NK cells of the NK-92MI cell line acquire regulatory functions characteristic of decidual NK cells.

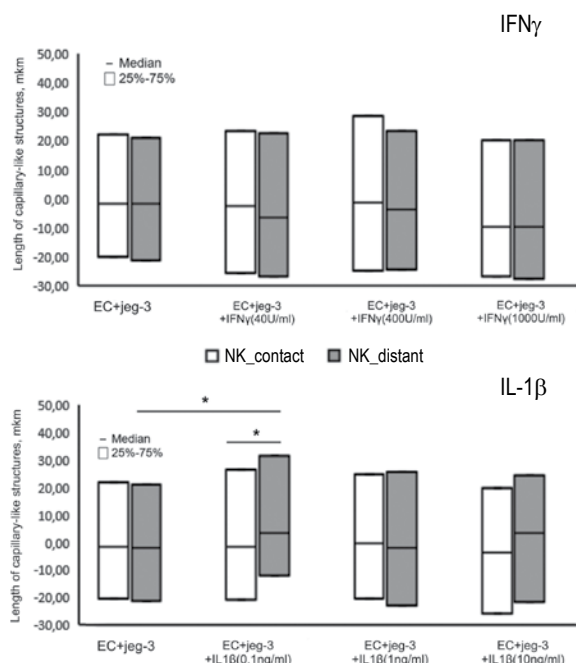


Figure 5. Formation of tube-like structures by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line in the presence of cells of the JEG-3 cell line and IFN γ or IL-1 β during their distant or contact-dependent culturing with cells of the NK92MI cell line

Note. EC+JEG-3, culturing of endothelial cells with trophoblast cells; EC+JEG-3+IFN γ , culturing of endothelial cells with cells of the JEG-3 cell line in the presence of IFN γ ; EC+JEG-3+IL-1 β , culturing of endothelial cells with unstimulated cells of the JEG-3 cell line in the presence of IL-1 β . NK_distant, distant culturing: a porous polycarbonate membrane separates NK cells from the co-culture of endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line. NK_contact, contact-dependent co-culturing of cells of the NK-92MI cell line, endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line. The significance of differences between groups: *, $p < 0.05$.

Stimulation of NK cells by IL-1 β increases their cytotoxic function [40] due to contact interaction with a target cell. We established that, during contact-dependent culturing of NK cells with the co-culture of endothelial and trophoblast cells in the presence of IL-1 β , the length of tube-like structures remained unchanged compared with the length formed under the same culturing conditions but without the cytokine. Under conditions of contact-dependent culturing, trophoblast cells expressing the HLA-C and HLA-G molecules on their surface change the functional properties of NK cells [60, 84], while suppressing their cytotoxic function. In turn, during distant culturing of NK cells with the co-culture of endothelial and trophoblast cells in the presence of IL-1 β , the length of tube-like structures increased against the length formed under the same culturing conditions but without the cytokine. Previously, it was established that IL-1 β stimulated angiogenesis during co-culturing of endothelial and trophoblast

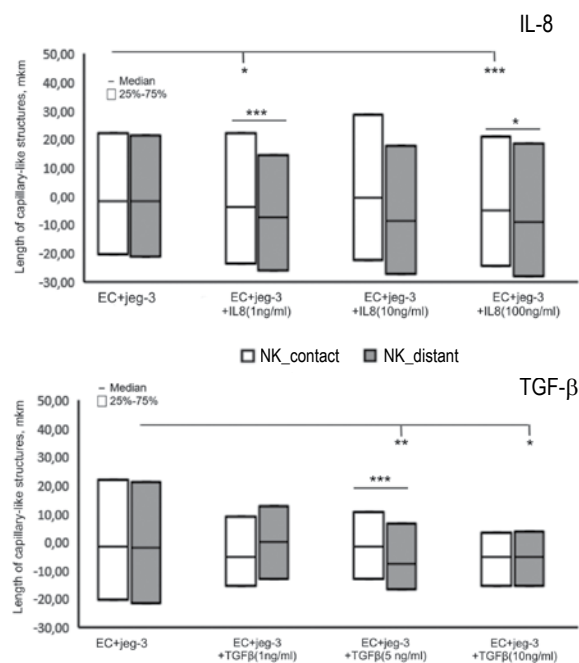


Figure 6. Formation of tube-like structures by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line in the presence of cells of the JEG-3 cell line and IL-8 or TGF- β during their distant or contact-dependent culturing with cells of the NK92MI cell line

Note. EC+JEG-3, culturing of endothelial cells with cells of the JEG-3 cell line; EC+JEG-3+IL-8, culturing of endothelial cells with cells of the JEG-3 cell line in the presence of IL-8; EC+JEG-3+TGF- β , culturing of endothelial cells with unstimulated cells of the JEG-3 cell line in the presence of TGF- β . NK_distant, distant culturing: a porous polycarbonate membrane separates NK cells from the co-culture of endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line. NK_contact, contact-dependent co-culturing of cells of the NK-92MI cell line, endothelial cells and cells of the JEG-3 cell line. The significance of differences between groups: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

cells [76]. Moreover, trophoblast secretory products activated by IL-1 β promote elongation of tube-like structures. Acting through the trophoblast [78], IL-1 β apparently stimulated angiogenesis, primarily affecting endothelial cells as a component of the co-culture. Under conditions of distant culturing with the co-culture of endothelial and trophoblast cells in the presence of IL-1 β , NK cells apparently acquire regulatory characteristics and show no cytotoxic effects.

Trophoblast [26, 75], endothelial [29, 51, 67] and NK [20, 82] cells carry receptors for VEGF on their surface and are potentially capable of responding to its effects. Moreover, all these cells are sources of VEGF in the placenta [4, 17]. The main effects of this cytokine are to increase cell viability and stimulate all stages of angiogenesis. We established that, during contact-dependent (but not distant) culturing of NK cells with the co-culture of endothelial and trophoblast cells in the presence of VEGF, the length

of tube-like structures was greater than the length of tube-like structures formed under the same culturing conditions but without VEGF. It was noted previously that VEGF dose-dependently increased the length of blood vessels formed by endothelial cells in the co-culture with trophoblast [76]. Therefore, during contact-dependent culturing, NK cells do not alter the stimulating effect of VEGF on angiogenesis in the co-culture of endothelial and trophoblast cells. In contrast, during distant culturing in the absence of contact with trophoblast cells, NK cells can inhibit the stimulating effect of VEGF on angiogenesis in the co-culture of endothelial and trophoblast cells. This may be associated with the production of TNF α by NK cells, which is capable of inhibiting angiogenesis in the absence of contact interactions between NK cells and trophoblast [31].

We established that the length of tube-like structures remained unchanged during contact-dependent and distant culturing of NK cells with the co-culture of endothelial and trophoblast cells in the presence of IFN γ . IFN γ is the most important regulator in the placenta cytokine network operating like a check and balance system. As an apoptogenic factor for endothelial cells, IFN γ can suppress blood vessel growth [7, 63]. During co-culturing of endothelial and trophoblast cells in the presence of IFN γ , stimulation of angiogenesis was observed previously [76]. IFN γ has been established to cause trophoblast apoptosis [41], which undermines the ability of trophoblast to protect endothelial cells from the cytotoxic effects of NK cells. IFN γ has also been shown to activate the cytotoxic effects of NK cells [65]. However, as noted above, trophoblast can limit the cytotoxic effects of NK cells due to its contact (expression of HLA-G) and distant influences (production of cytokines and sHLA-G). The result is that when used in a three-component cell system, the proinflammatory cytokine IFN γ has no effect on angiogenesis.

We established that, during distant (but not contact-dependent) culturing of NK cells with the co-culture of endothelial and trophoblast cells in the presence of TGF- β , the length of tube-like structures was less than the length formed under the same culturing conditions but without the cytokine. The inhibitory effect of TGF- β (a cytokine with proven stimulatory and inhibitory effects on angiogenesis [4]) on the length of tube-like structures in a three-component cell co-culture is not unexpected. TGF- β is a pleiotropic cytokine with a variety of effects on target cells depending on concentration and the cellular microenvironment [45, 70, 76]. Macrophages and trophoblast are the main sources of TGF- β in the placenta. It was established elsewhere that TGF- β promoted elongation of tube-like structures formed by endothelial cells in co-culture with trophoblast [76]. Therefore, during contact-dependent culturing of NK

cells and the co-culture of endothelial and trophoblast cells, NK cells acted as an angiogenesis regulator and mitigated the TGF- β effect on length stimulation. In contrast, under distant culturing conditions, TGF- β triggered a signal in NK cells that inhibited angiogenesis. Trophoblast is apparently able to suppress the negative effect of NK cells on angiogenesis only against the background of direct contact. Increased production of TGF- β by trophoblast was revealed to occur in preeclampsia. In this case, increased production of TGF- β by trophoblast was considered to be a negative event accompanied by disordered angiogenesis in the placenta. The data obtained in our research indicated even more complicated regulation of placental cell interactions based both on cellular contacts and on effects produced by cytokines. Due to contact (via HLA-G) and cytokine (via TGF- β) signals, trophoblast is able to limit the negative effect of NK cells on the endothelium and suppress inflammation in situations of pathological processes in the placenta.

Cytokines IL-8, PlGF and bFGF are the most important pro-angiogenic factors [24, 25, 48, 56, 73] stimulating proliferation and increasing trophoblast cell viability [8]. These cytokines also activate NK cells [48, 50, 58, 79]. A decrease in the length of tube-like structures under conditions of a three-component cell co-culture in the presence of the following pro-angiogenic factors was revealed in our research: IL-8, PlGF (during contact-dependent culturing only) and bFGF (during both contact-dependent and distant culturing). Earlier work established that bFGF and IL-8 promoted elongation of tube-like structures formed by endothelial cells during co-culture with trophoblast, while PlGF promoted a decrease in length of the formed tube-like structures [76]. Thus, the observed inhibitory effect of PlGF continued to persist only under conditions of contact-dependent culturing of NK cells with the co-culture of endothelial and trophoblast cells. This effect disappeared during distant culturing. During contact-dependent and distant culturing of NK cells with the co-culture of endothelial and trophoblast cells in the presence of bFGF and IL-8, the effects of these cytokines on the co-culture changed to the opposite ones. This change occurred when NK cells were introduced into the co-culture. We did not find any literature describing the effect of PlGF, bFGF and IL-8 on the functional activity of NK cells, their cytokine production, or their interactions with endothelial and trophoblast cells. However, there are indirect data, including those presented in this paper, arguing for a change in cell behavior in multicomponent co-cultures as a result of various distant and contact interactions. For example, decidual NK cells secrete: IL-2, IL-15, IFN γ , VEGFA, VEGFC, IL-8, TGF- β , PlGF, Ang1, Ang2 [43], uPA, uPAR, MMP [64] MIP1a, GM-CSF,

CSF1 and other factors [66] that may have direct or indirect (through other cells) pro-angiogenic or anti-angiogenic effects. The pro-angiogenic properties of PlGF become apparent only when VEGF is present in the microenvironment of endothelial cells [14]. Published evidence demonstrates that sHLA-G secreted by trophoblast cells can induce apoptosis of endothelial cells by binding to the CD160 receptor expressed on the endothelial cell surface, as well as by inhibiting bFGF-induced angiogenesis [30]. The soluble form of sHLA-G secreted by trophoblast stimulates proliferation of decidual NK cells [83], while inhibiting their cytotoxic activity. It has also been established that sHLA-G suppresses the functional activity of NK cells in tumor diseases [71].

Conclusion

Cells of the NK-92MI cell line reproduce basic phenotypic and functional characteristics of activated NK cells and show a cytotoxic effect on target cells. The data obtained in this research provide indirect evidence that NK cells of the NK-92MI cell line acquire regulatory functions characteristic of decidual NK cells when cultured with the co-culture of endothelial cells and trophoblast. Under conditions of contact-dependent culturing, trophoblast expressing

HLA-C and HLA-G molecules on their surface change the functional properties of NK cells [60, 84], while suppressing their cytotoxic function. Under conditions of distant culturing with the co-culture of endothelial and trophoblast cells in the presence of specific cytokines (IL-1 β), NK cells also acquire regulatory characteristics and do not show inhibitory effects. In a three-component co-culture, cytokines affect all cells at once. As a result, the effects of cytokines on target cells differ from those revealed in single- and two-component cell models previously. The data obtained in this research support regulation of placental cell interactions involving both cellular contacts and effects produced by cytokines.

This research was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 17-15-01230: culturing of endothelial cells, assessment of the formation of tube-like structures) and partially carried out within the framework of the government program No. AAAA 18-118011020016-9: culturing of NK cells and trophoblast cells. The confocal microscopy was carried out using the equipment of the Resource Center for the Molecular and Cell Technologies Development under St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia.

Список литературы / References

1. Айламазян Э.К., Степанова О.И., Сельков С.А., Соколов Д.И. Клетки иммунной системы матери и клетки трофобласта: «Конструктивное сотрудничество» ради достижения совместной цели // Вестник Российской академии медицинских наук, 2013. Т. 11. С. 12-21. [Ailamazian E.K., Stepanova O.I., Selkov S.A., Sokolov D.I. Cells of immune system of mother and trophoblast cells: constructive cooperation for the sake of achievement of the joint purpose. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2013, no. 11, pp. 12-21. (In Russ.)]
2. Сельков С.А., Соколов Д.И. Иммунологические механизмы контроля развития плаценты // Журнал акушерства и женских болезней, 2010. Т. 59, № 1. С. 6-11. [Selkov S.A., Sokolov D.I. Immunologic control of placenta development. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women Diseases*, 2010, Vol. 59, no. 1, pp. 6-11. (In Russ.)]
3. Соколов Д.И., Сельков С.А. Децидуальные макрофаги: роль в иммунном диалоге матери и плода // Иммунология, 2014. Т. 35, № 2. С. 113-117. [Sokolov D.I., Selkov S.A. Decidual macrophages: role in immune dialogue between mother and fetus. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no. 2, pp. 113-117. (In Russ.)]
4. Соколов Д.И., Сельков С.А. Иммунологический контроль формирования сосудистой сети плаценты. СПб.: Н-Л, 2012. 208 с. [Sokolov D.I., Selkov S.A. Immunological control of vascular network of the placenta development]. St. Petersburg: N-L, 2012. 208 p.
5. Agostinis C., Bossi F., Masat E., Radillo O., Tonon M., de Seta F., Tedesco F., Bulla R. MBL interferes with endovascular trophoblast invasion in pre-eclampsia. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, Vol. 2012, 484321. doi: 10.1155/2012/484321.
6. Arnaoutova I., George J., Kleinman H.K., Benton G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis*, 2009, Vol. 12, no. 3, pp. 267-274.
7. Ashkar A.A., di Santo J.P., Croy B.A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 2, pp. 259-270.
8. Athanassiades A., Lala P.K. Role of placenta growth factor (PlGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. *Placenta*, 1998, Vol. 19, no. 7, pp. 465-473.
9. Augustin H.G. Angiogenesis in the female reproductive system. *EXS*, 2005, no. 94, pp. 35-52.
10. Benton G., Kleinman H.K., George J., Arnaoutova I. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) *in vitro* and *in vivo* with cancer cells. *Int. J. Cancer*, 2011, Vol. 128, no. 8, pp. 1751-1757.
11. Blaschitz A., Lenfant F., Mallet V., Hartmann M., Bensussan A., Geraghty D.E., le Bouteiller P., Dohr G. Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur. J. Immunol.*, 1997, Vol. 27, no. 12, pp. 3380-3388.

12. Bulla R., Agostinis C., Bossi F., Rizzi L., Debeus A., Tripodo C., Radillo O., de Seta F., Ghebrehiwet B., Tedesco F. Decidual endothelial cells express surface-bound C1q as a molecular bridge between endovascular trophoblast and decidual endothelium. *Mol. Immunol.*, 2008, Vol. 45, no. 9, pp. 2629-2640.
13. Bulmer J.N., Morrison L., Longfellow M., Ritson A., Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum. Reprod.*, 1991, Vol. 6, no. 6, pp. 791-798.
14. Cai J., Ahmad S., Jiang W.G., Huang J., Kontos C.D., Boulton M., Ahmed A. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes*, 2003, Vol. 52, no. 12, pp. 2959-2968.
15. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011, Vol. 473, no. 7347, pp. 298-307.
16. Cartwright J.E., Fraser R., Leslie R., Wallace A.E., James J.L. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction*, 2010, Vol. 140, pp. 803-813.
17. Cerdeira A.S., Karumanchi S.A. Angiogenic factors in preeclampsia and related disorders. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2012, Vol. 2, no. 11, pii: a006585. doi: 10.1101/cshperspect.a006585.
18. Cerdeira A.S., Rajakumar A., Royle C.M., Lo A., Husain Z., Thadhani R.I., Sukhatme V.P., Karumanchi S.A., Kopcow H.D. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 8, pp. 3939-3948.
19. Chazara O., Xiong S., Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, Vol. 90, no. 4, pp. 703-716.
20. Chen W.S., Kitson R.P., Goldfarb R.H. Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1). *In vivo*, 2002, Vol. 16, no. 6, pp. 439-445.
21. Choudhury R.H., Dunk C.E., Lye S.J., Aplin J.D., Harris L.K., Jones R.L. Extravillous trophoblast and endothelial cell crosstalk mediates leukocyte infiltration to the early remodeling decidual spiral arteriole wall. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 10, pp. 4115-4128.
22. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.*, 2001, Vol. 22, no. 11, pp. 633-640.
23. Curigliano G., Criscitiello C., Gelao L., Goldhirsch A. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clin. Cancer Res.*, 2013, Vol. 19, no. 20, pp. 5564-5571.
24. Demir R., Seval Y., Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem.*, 2007, Vol. 109, no. 4, pp. 257-265.
25. Distler J.H., Hirth A., Kurowska-Stolarska M., Gay R.E., Gay S., Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q. J. Nucl. Med.*, 2003, Vol. 47, no. 3, pp. 149-161.
26. Dunk C., Ahmed A. Expression of VEGF-C and activation of its receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 in trophoblast. *Histol. Histopathol.*, 2001, Vol. 16, no. 2, pp. 359-375.
27. Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, Vol. 80, no. 12, pp. 3734-3737.
28. el Costa H., Tabiasco J., Berrebi A., Parant O., Aguerre-Girr M., Piccinni M.P., le Bouteiller P. Effector functions of human decidual NK cells in healthy early pregnancy are dependent on the specific engagement of natural cytotoxicity receptors. *J. Reprod. Immunol.*, 2009, Vol. 82, no. 2, pp. 142-147.
29. Eroglu A., Ersoz C., Karasoy D., Sak S. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, VEGF-D, VEGFR-3 and D2-40 expressions in primary breast cancer: Association with lymph node metastasis. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2017, Vol. 26, no. 2, pp. 245-249.
30. Fons P., Chabot S., Cartwright J.E., Lenfant F., L'Faqihi F., Giustiniani J., Herault J.P., Gueguen G., Bono F., Savi P., Aguerre-Girr M., Fournel S., Malecaze F., Bensussan A., Plouet J., le Bouteiller P. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood*, 2006, Vol. 108, no. 8, pp. 2608-2615.
31. Fraser R., Whitley G.S., Thilaganathan B., Cartwright J.E. Decidual natural killer cells regulate vessel stability: implications for impaired spiral artery remodelling. *J. Reprod. Immunol.*, 2015, Vol. 110, pp. 54-60.
32. Gong J.H., Maki G., Klingemann H.G. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*, 1994, Vol. 8, no. 4, pp. 652-658.
33. Grant D.S., Kinsella J.L., Kibbey M.C., LaFlamme S., Burbelo P.D., Goldstein A.L., Kleinman H.K. Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells. *J. Cell Sci.*, 1995, Vol. 108, Pt 12, pp. 3685-3694.
34. Hanna J., Goldman-Wohl D., Hamani Y., Avraham I., Greenfield C., Natanson-Yaron S., Prus D., Cohen-Daniel L., Arnon T.I., Manaster I., Gazit R., Yutkin V., Benharroch D., Porgador A., Keshet E., Yagel S., Mandelboim O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat. Med.*, 2006, Vol. 12, no. 9, pp. 1065-1074.
35. Harris L.K. Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta*, 2010, Vol. 31, pp. S93-98.
36. Harris L.K., Jones C.J., Aplin J.D. Adhesion molecules in human trophoblast – a review. II. extravillous trophoblast. *Placenta*, 2009, Vol. 30, no. 4, pp. 299-304.
37. Highet A.R., Buckberry S., Mayne B.T., Khoda S.M., Bianco-Miotto T., Roberts C.T. First trimester trophoblasts forming endothelial-like tubes *in vitro* emulate a 'blood vessel development' gene expression profile. *Gene Expr. Patterns*, 2016, Vol. 21, no. 2, pp. 103-110.

38. Jingting C., Yangde Z., Yi Z., Huining L., Rong Y., Yu Z. Heparanase expression correlates with metastatic capability in human choriocarcinoma. *Gynecol. Oncol.*, 2007, Vol. 107, no. 1, pp. 22-29.
39. Kalkunte S., Lai Z., Tewari N., Chichester C., Romero R., Padbury J., Sharma S. *In vitro* and *in vivo* evidence for lack of endovascular remodeling by third trimester trophoblasts. *Placenta*, 2008, Vol. 29, no. 10, pp. 871-878.
40. Kanar M.C., Thiele D.L., Ostensen M., Lipsky P.E. Regulation of human natural killer (NK) cell function: induction of killing of an NK-resistant renal carcinoma cell line. *J. Clin. Immunol.*, 1988, Vol. 8, no. 1, pp. 69-79.
41. Karmakar S., Dhar R., Das C. Inhibition of cytotrophoblastic (JEG-3) cell invasion by interleukin 12 involves an interferon gamma-mediated pathway. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 53, pp. 55297-55307.
42. Kaufmann P., Mayhew T.M., Charnock-Jones D.S. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta*, 2004, Vol. 25, no. 2-3, pp. 114-126.
43. Kim M., Park H.J., Seol J.W., Jang J.Y., Cho Y.S., Kim K.R., Choi Y., Lydon J.P., Demayo F.J., Shibuya M., Ferrara N., Sung H.K., Nagy A., Alitalo K., Koh G.Y. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. *EMBO Mol. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 9, pp. 1415-1430.
44. Kohler P.O., Bridson W.E. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1971, Vol. 32, no. 5, pp. 683-687.
45. Komai T., Okamura T., Yamamoto K., Fujio K. The effects of TGF-beta on immune responses. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 2016, Vol. 39, no. 1, pp. 51-58.
46. Komatsu F., Kajiwara M. Relation of natural killer cell line NK-92-mediated cytotoxicity (NK-92-lysis) with the surface markers of major histocompatibility complex class I antigens, adhesion molecules, and Fas of target cells. *Oncol. Res.*, 1998, Vol. 10, no. 10, pp. 483-489.
47. Koopman L.A., Kopcow H.D., Rybalov B., Boyson J.E., Orange J.S., Schatz F., Masch R., Lockwood C.J., Schachter A.D., Park P.J., Strominger J.L. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, no. 8, pp. 1201-1212.
48. Kurtoglu E., Altunkaynak B.Z., Aydin I., Ozdemir A.Z., Altun G., Kokcu A., Kaplan S. Role of vascular endothelial growth factor and placental growth factor expression on placenta structure in pre-eclamptic pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2015, Vol. 41, no. 10, pp. 1533-1540.
49. Lash G.E., Otun H.A., Innes B.A., Percival K., Searle R.F., Robson S.C., Bulmer J.N. Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Hum. Reprod.*, 2010, Vol. 25, no. 5, pp. 1137-1145.
50. Lash G.E., Schiessl B., Kirkley M., Innes B.A., Cooper A., Searle R.F., Robson S.C., Bulmer J.N. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 80, no. 3, pp. 572-580.
51. LaValley D.J., Zanutelli M.R., Bordeleau F., Wang W., Schwager S.C., Reinhart-King C.A. Matrix stiffness enhances VEGFR-2 internalization, signaling, and proliferation in endothelial cells. *Converg. Sci. Phys. Oncol.*, 2017, Vol. 3. doi: 10.1088/2057-1739/aa9263.
52. le Bouteiller P., Fons P., Herault J.P., Bono F., Chabot S., Cartwright J.E., Bensussan A. Soluble HLA-G and control of angiogenesis. *J. Reprod. Immunol.*, 2007, Vol. 76, no. 1-2, pp. 17-22.
53. le Bouteiller P., Pizzato N., Barakonyi A., Solier C. HLA-G, pre-eclampsia, immunity and vascular events. *J. Reprod. Immunol.*, 2003, Vol. 59, no. 2, pp. 219-234.
54. Lvova T.Y., Stepanova O.I., Furaeva K.N., Korenkov D.A., Sokolov D.I., Selkov S.A. Effects of placental tissue secretory products on the formation of vascular tubules by EA.Hy926 endothelial cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2013, Vol. 155, no. 1, pp. 108-112.
55. Lyall F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy – a review. *Placenta*, 2005, Vol. 26, Suppl. A, pp. S31-6.
56. Lyons J.M., 3rd, Schwimer J.E., Anthony C.T., Thomson J.L., Cundiff J.D., Casey D.T., Maccini C., Kucera P., Wang Y.Z., Boudreaux J.P., Woltering E.A. The role of VEGF pathways in human physiologic and pathologic angiogenesis. *J. Surg. Res.*, 2010, Vol. 159, no. 1, pp. 517-527.
57. Male V., Sharkey A., Masters L., Kennedy P.R., Farrell L.E., Moffett A. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire. *Eur. J. Immunol.*, 2011, Vol. 41, no. 10, pp. 3017-3027.
58. Manaster I., Gazit R., Goldman-Wohl D., Stern-Ginossar N., Mizrahi S., Yagel S., Mandelboim O. Notch activation enhances IFN-gamma secretion by human peripheral blood and decidual NK cells. *J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 84, no. 1, pp. 1-7.
59. Martinez-Lostao L., de Miguel D., Al-Wasaby S., Gallego-Lleyda A., Anel A. Death ligands and granulysin: mechanisms of tumor cell death induction and therapeutic opportunities. *Immunotherapy*, 2015, Vol. 7, no. 8, pp. 883-882.
60. Matsunami K., Miyagawa S., Nakai R., Yamada M., Shirakura R. Protection against natural killer-mediated swine endothelial cell lysis by HLA-G and HLA-E. *Transplant. Proc.*, 2000, Vol. 32, no. 5, pp. 939-940.
61. Mikhailova V.A., Belyakova K.L., Selkov S.A., Sokolov D.I. Peculiarities of NK cells differentiation: CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells at pregnancy and in non-pregnant state. *Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 19-26. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-19-26.
62. Mousseau Y., Mollard S., Qiu H., Richard L., Cazal R., Nizou A., Vedrenne N., Remi S., Baaj Y., Fourcade L., Funalot B., Sturtz F.G. *In vitro* 3D angiogenesis assay in egg white matrix: comparison to Matrigel, compatibility to various species, and suitability for drug testing. *Lab. Invest.*, 2014, Vol. 94, no. 3, pp. 340-349.

63. Murphy S.P., Tayade C., Ashkar A.A., Hatta K., Zhang J., Croy B.A. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol. Reprod.*, 2009, Vol. 80, no. 5, pp. 848-859.
64. Naruse K., Lash G.E., Bulmer J.N., Innes B.A., Otun H.A., Searle R.F., Robson S.C. The urokinase plasminogen activator (uPA) system in uterine natural killer cells in the placental bed during early pregnancy. *Placenta*, 2009, Vol. 30, no. 5, pp. 398-404.
65. Ni J., Cerwenka A. STAT5 loss awakens the dark force in natural killer cells. *Cancer Discov.*, 2016, Vol. 6, no. 4, pp. 347-349.
66. Okada H., Nakajima T., Sanezumi M., Ikuta A., Yasuda K., Kanzaki H. Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, Vol. 85, no. 12, pp. 4765-4770.
67. Park K., Amano H., Ito Y., Kashiwagi S., Yamazaki Y., Takeda A., Shibuya M., Kitasato H., Majima M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) signaling enhances angiogenesis in a surgical sponge model. *Biomed. Pharmacother.*, 2016, Vol. 78, pp. 140-149.
68. Pijnenborg R. The origin and future of placental bed research. *Eur. J. Obstet Gynecol. Reprod. Biol.*, 1998, Vol. 81, no. 2, pp. 185-90.
69. Ponce M.L. Tube formation: an *in vitro* matrigel angiogenesis assay. *Methods Mol. Biol.*, 2009, Vol. 467, pp. 183-188.
70. Principe D.R., Doll J.A., Bauer J., Jung B., Munshi H.G., Bartholin L., Pasche B., Lee C., Grippo P.J. TGF-beta: duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2014, Vol. 106, no. 2, djt369. doi: 10.1093/jnci/djt369.
71. Rebmann V., Regel J., Stolke D., Grosse-Wilde H. Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. *Semin. Cancer Biol.*, 2003, Vol. 13, no. 5, pp. 371-377.
72. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997, Vol. 386, pp. 671-674.
73. Robson A., Harris L.K., Innes B.A., Lash G.E., Aljunaidy M.M., Aplin J.D., Baker P.N., Robson S.C., Bulmer J.N. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB J.*, 2012, Vol. 26, no. 12, pp. 4876-4885.
74. Rosario G.X., Konno T., Soares M.J. Maternal hypoxia activates endovascular trophoblast cell invasion. *Dev. Biol.*, 2008, Vol. 314, no. 2, pp. 362-375.
75. Singh M., Kindelberger D., Nagymanyoki Z., Ng S.W., Quick C.M., Yamamoto H., Fichorova R., Fulop V., Berkowitz R.S. Vascular endothelial growth factors and their receptors and regulators in gestational trophoblastic diseases and normal placenta. *J. Reprod. Med.*, 2012, Vol. 57, no. 5-6, pp. 197-203.
76. Sokolov D.I., Lvova T.Y., Okorokova L.S., Belyakova K.L., Sheveleva A.R., Stepanova O.I., Mikhailova V.A., Selkov S.A. Effect of cytokines on the formation tube-like structures by endothelial cells in the presence of trophoblast cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2017, Vol. 163, no. 1, pp. 148-158.
77. Trew A.J., Lash G.E., Baker P.N. Investigation of an *in vitro* model of trophoblast invasion. *Early Pregnancy*, 2000, Vol. 4, no. 3, pp. 176-190.
78. Tsukihara S., Harada T., Deura I., Mitsunari M., Yoshida S., Iwabe T., Terakawa N. Interleukin-1beta-induced expression of IL-6 and production of human chorionic gonadotropin in human trophoblast cells via nuclear factor-kappaB activation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2004, Vol. 52, no. 3, pp. 218-223.
79. Tsunematsu H., Tatsumi T., Kohga K., Yamamoto M., Aketa H., Miyagi T., Hosui A., Hiramatsu N., Kanto T., Hayashi N., Takehara T. Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 2012, Vol. 130, no. 2, pp. 356-364.
80. Vacca P., Moretta L., Moretta A., Mingari M.C. Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy. *Trends Immunol.*, 2011, Vol. 32, no. 11, pp. 517-523.
81. van den Heuvel M.J., Chantakru S., Xuemei X., Evans S.S., Tekpetey F., Mote P.A., Clarke C.L., Croy B.A. Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus: regulatory mechanisms in the mouse and human. *Immunol. Invest.*, 2005, Vol. 34, no. 3, pp. 273-293.
82. Wada Y., Ozaki H., Abe N., Mori A., Sakamoto K., Nagamitsu T., Nakahara T., Ishii K. Role of vascular endothelial growth factor in maintenance of pregnancy in mice. *Endocrinology*, 2013, Vol. 154, no. 2, pp. 900-910.
83. Wallace A.E., Fraser R., Cartwright J.E. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Hum. Reprod. Update*, 2012, Vol. 18, no. 4, pp. 458-471.
84. Wang S.S., Han J.Y., Wu X.W., Cao R.H., Qi H.G., Xia Z.X., Chen D., Gong F.L., Chen S. A study of HLA-G1 protection of porcine endothelial cells against human NK cell cytotoxicity. *Transplant. Proc.*, 2004, Vol. 36, no. 8, pp. 2473-2474.
85. Wang Y., Xu B., Li M.Q., Li D.J., Jin L.P. IL-22 secreted by decidual stromal cells and NK cells promotes the survival of human trophoblasts. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2013, Vol. 6, no. 9, pp. 1781-1790.
86. Wheeler K.C., Jena M.K., Pradhan B.S., Nayak N., Das S., Hsu C.D., Wheeler D.S., Chen K., Nayak N.R. VEGF may contribute to macrophage recruitment and M2 polarization in the decidua. *PLoS ONE*, 2018, Vol. 13, no. 1, e0191040. doi: 10.1371/journal.pone.0191040.
87. Whitley G.S., Cartwright J.E. Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta*, 2010, Vol. 31, no. 6, pp. 465-474.
88. Yagel S. The developmental role of natural killer cells at the fetal-maternal interface. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2009, Vol. 201, no. 4, pp. 344-350.

89. Zeng M.H., Fang C.Y., Wang S.S., Zhu M., Xie L., Li R., Wang L., Wu X.W., Chen S. A study of soluble HLA-G1 protecting porcine endothelial cells against human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Transplant. Proc.*, 2006, Vol. 38, no. 10, pp. 3312-3314.

90. Zhou Y., Bellinard V., Feng K.T., McMaster M., Fisher S.J. Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C. *Dev. Biol.*, 2003, Vol. 263, no. 1, pp. 114-125.

Авторы:

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

Степанова О.И. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Шевелева А.Р. — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Костин Н.А. — сотрудник ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий», Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

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

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

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

Stepanova O.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg Russian Federation

Sheveleva A.R., Researcher, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg Russian Federation

Kostin N.A., Associate, Resource Center for Development of Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

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

Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Immunology and Cell Interactions Department, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg Russian Federation

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Head, Cell Interactions Laboratory, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Associate Professor, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ (MMP2, MMP3, MMP9) И ГЕНА НЕОАНГИОГЕНЕЗА (VEGF) ПРИ МИКРОАНГИОПАТИЯХ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Шевченко А.В.¹, Прокофьев В.Ф.¹, Коненков В.И.¹, Климонтов В.В.¹,
Тян Н.В.¹, Черных Д.В.², Трунов А.Н.², Черных В.В.²

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

² ФГБУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Целью исследования являлся анализ ассоциированности полиморфизма генов *MMP2*, *MMP3*, *MMP9*, *VEGF* с развитием непролиферативной диабетической ретинопатии (ДР) у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2).

В исследование включен 201 пациент с СД2. Среди них 90 человек с ДР и 111 человек без признаков ДР. Исследовали полиморфизм генов *MMP2* (*rs2438650*), *MMP3* (*rs3025058*), *MMP9* (*rs3918242*) и *VEGF* (*rs699947* и *rs3025039*). Генотипирование осуществляли методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и методом TaqMan-зондов.

При анализе комплексных генотипов пяти полиморфных позиций выявлена определенная закономерность в позитивно и негативно объединенных комплексах. Показано увеличение частоты *СС* генотипа в полиморфной позиции *-1306* гена *MMP2* в группе пациентов с «ранним» развитием осложнения и повышение у пациентов с наличием ДР комбинации высокого уровня *HbA1c* генотипами *MMP2-1306СС* и *MMP9-1562СТ*. Компьютерное моделирование с визуальной реконструкцией сетевых взаимодействий генотипов, вовлеченных в регуляцию деструкции и ангиогенеза, и уровней *HbA1c*-продукции — интегрального показателя гликемии — выявило наличие различий в структурно-функциональной организации ген-генных и ген-белковых взаимодействий в группах больных с наличием и отсутствием ДР.

Построение интерактивных биологических сетей транскрипционной регуляции и метаболических путей и их топологический анализ позволяют строить и изучать генные и белковые взаимодействия

Адрес для переписки:

Шевченко Алла Владимировна
Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр Институт
цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук»
630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.
Тел.: 8 (952) 901-36-80.
E-mail: shalla64@mail.ru

Address for correspondence:

Shevchenko Alla V.
Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology,
Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian
Branch of Russian Academy of Sciences
630060, Russian Federation, Novosibirsk, Timakova str., 2.
Phone: 7 (952) 901-36-80.
E-mail: shalla64@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев, В.И. Коненков,
В.В. Климонтов, Н.В. Тянь, Д.В. Черных, А.Н. Трунов,
В.В. Черных «Полиморфизм генов внеклеточных
протеиназ ремоделирования соединительной ткани
(*MMP2*, *MMP3*, *MMP9*) и гена неоангиогенеза (*VEGF*)
при микроангиопатиях сетчатки глаза у пациентов
с сахарным диабетом 2 типа» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 441-450.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-441-450
© Шевченко А.В. и соавт., 2019

For citation:

A.V. Shevchenko, V.F. Prokofiev, V.I. Konenkov,
V.V. Klimontov, N.V. Tyan, D.V. Chernykh, A.N. Trunov,
V.V. Chernykh "Polymorphisms of extracellular connective
tissue remodeling proteinases and *MMP2*, *MMP3*,
MMP9 genes, and neoangiogenesis *VEGF* gene in retinal
microangiopathy in the patients with type 2 diabetes mellitus",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 3, pp. 441-450.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-441-450
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-441-450

применительно к исследованию патогенеза осложнений СД 2 типа для разработки в последующем подходов к персонализированной профилактике и терапии.

Ключевые слова: диабетическая ретинопатия, гены матриксных металлопротеиназ, ген фактора роста эндотелия сосудов, генные сети, математическое моделирование

POLYMORPHISMS OF EXTRACELLULAR CONNECTIVE TISSUE REMODELING PROTEINASES AND *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* GENES, AND NEOANGIGENESIS *VEGF* GENE IN RETINAL MICROANGIOPATHY IN THE PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Shevchenko A.V.^a, Prokofiev V.F.^a, Konenkov V.I.^a, Klimontov V.V.^a,
Tyan N.V.^a, Chernykh D.V.^b, Trunov A.N.^b, Chernykh V.V.^b

^a Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk Branch of the S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex "Eye microsurgery", Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The aim of our study was to perform an association analysis between *MMP2*, *MMP3*, *MMP9*, *VEGF* gene polymorphisms and development of non-proliferative diabetic retinopathy (DR) in the type 2 diabetic patients (DM).

201 DM patients: 90 cases of DR and 111 subjects without DR features were included into the study. Polymorphic variants of *MMP2* (*rs2438650*), *MMP3* (*rs3025058*), *MMP9* (*rs3918242*), and *VEGF* (*rs699947* and *rs3025039*) genes were assayed. The genetic typing was carried out by restriction fragment length polymorphism and TaqMan methods.

The analysis of complex genotypes at the five polymorphic positions has revealed some significant findings in positive and negatively incorporated complexes. Increased frequencies of *MMP2-1306 CC* genotype in the group of patients with "early" development of complication, and more frequent combination of high-level HbA1c with *MMP2-1306CC* and *MMP9-1562CT* genotypes were shown in DR patients. Computer-assisted modelling with visual reconstruction of network interactions between the genotypes involved into the destruction events and angiogenesis, as well as altered HbA1c levels (an integral parameter of glycemia), has revealed some differences in structural and functional organization of gene-gene and gene-protein interactions between the groups of patients with DR *versus* those without this disorder. Conclusion. A design of interactome biological networks based on transcription regulation and metabolic pathways, as well as their topological analysis allows to build and study interactions of genes and proteins, with reference to pathogenetic studies of DM2 complications aiming for development of approaches to personalized prevention and therapy in future times.

Keywords: diabetic retinopathy, matrix metalloproteinases genes, vascular endothelial growth factor gene, genic networks, mathematical modelling

Введение

Диабетическая ретинопатия (ДР) — одно из наиболее частых и социально значимых осложнений сахарного диабета (СД), непосредственно связанное с продолжительностью заболевания [2]. Основу патогенеза ДР составляют генетические, метаболические, гемодинамические, биохимические, иммунологические факторы, способствующие в том числе и патологическому ангиогенезу [14, 32]. Механизмы

реализации патогенного эффекта гипергликемии на сетчатку глаза остаются предметом интенсивного изучения. Показано, что при СД в сетчатке глаза активируется продукция матриксных металлопротеиназ (ММР), осуществляющих катаболизм компонентов внеклеточного матрикса и играющих важную роль в межклеточных взаимодействиях [14, 18]. У пациентов с ДР выявлено повышение уровня ММР-9 и ММР-2 в сетчатке и в стекловидном теле, увеличение активно-

сти *MMP*-9, *MMP*-3 и *MMP*-2 в эпиретинальных мембранах у пациентов с пролиферативной ДР [18, 21, 24]. Предполагают, что участие *MMP* в развитии ДР связано с увеличением проницаемости гематоретинального барьера и активацией ангиогенеза. Показано, что у больных с пролиферативной ДР ферменты семейства *MMP* (*MMP*-2 и *MMP*-9) включаются в патологический ангиогенез, деградируя базальную мембрану капилляров, стимулируя вращение вновь образованных сосудов в стекловидное тело, что вызывает рецидивирующие кровоизлияния и разрастание глиальной ткани [6, 14, 20]. Фактор роста эндотелия сосудов (*VEGF*) — важный ангиогенный фактор, участвующий в патогенезе ДР. В ряде клинических исследований выявлена связь ДР с уровнем *VEGF* во влаге передней камеры и в стекловидном теле. Кроме того, есть данные о корреляции уровня *MMP* и *VEGF* при ДР [8, 10]. Индивидуальные особенности продукции *VEGF* и *MMP* в нормальных и патологических условиях в значительной степени детерминированы генетически. В регуляторных регионах генов *VEGF*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* выявлены полиморфные локусы, ассоциированные с изменением уровня их экспрессии [4, 17]. В ряде исследований показана ассоциированность полиморфизма регуляторных регионов генов с развитием и течением ДР, однако данные неоднозначны в разных популяционных группах [5, 13, 29], причем в России подобные исследования единичны.

Целью данного исследования был анализ ассоциированности полиморфизма в регуляторных регионах генов *MMP2* (*rs2438650*), *MMP3* (*rs3025058*), *MMP9* (*rs3918242*), *VEGF* (*rs699947* и *rs3025039*) с развитием непролиферативной ДР у пациентов с СД 2 типа.

Материалы и методы

Пациенты

В исследование включен 201 пациент с СД 2 типа, в том числе 156 женщин и 45 мужчин европеоидного происхождения в возрасте 43–70 лет, считающих себя и своих родителей русскими. Критериями исключения являлись: наличие клинических или лабораторных признаков СД 1 типа; признаки других специфических типов СД; острые и обострения хронических воспалительных заболеваний органа зрения; первичная открытоугольная глаукома; увеит; лечение локальными или системными ингибиторами ангиогенеза в течение трех месяцев перед исследованием.

Диагноз ДР выставлялся специалистами Новосибирского филиала ФГАУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ им. акад. С.Н. Федорова» на основании обследования, включавшего: визометрию,

определение границ поля зрения и наличие скотом, бинокулярную офтальмоскопию с использованием налобного офтальмоскопа Heine Omega 200 и линзы 20 дптр, щелевой лампы Karl Zeiss SL 115 Classic и линзы Ocular Max Field 78 дптр, двухмерное ультразвуковое сканирование на установке Tomey UD 1000. По результатам обследования пациенты разделены на 2 группы: без признаков ДР (111 человек) и с ДР (90 человек). Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека», Федеральным законом Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. N 323 ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» и одобрено комитетами по биомедицинской этике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» и Новосибирского филиала ФГБУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ им. акад. С.Н. Федорова». У всех пациентов было получено информированное согласие на забор биологического материала, а также использование данных исследования в научных целях.

Генотипирование

Исследовали полиморфизм регуляторных регионов генов *MMP2* (*rs2438650*), *MMP3* (*rs3025058*), *MMP9* (*rs3918242*) и *VEGF* (*rs699947* и *rs3025039*). Генотипирование *rs3025058*, *rs3918242* и *rs699947* осуществляли методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Полиморфный участок промоторного региона гена амплифицировали с использованием пары специфичных праймеров [3, 19, 26], затем продукты амплификации подвергали гидролизу соответствующей эндонуклеазой рестрикции («СибЭнзим», г. Новосибирск). Электрофорез проводили в 2,5% агарозном геле. Полиморфные позиции *rs2438650* и *rs3025039* анализировали с помощью Real-Time ПЦР с использованием коммерческих тест-систем методом TaqMan-зондов (Синтол, Россия) на амплификаторе «ДТ-96» (ДНК-Технология) согласно инструкции фирмы-производителя.

Статистическая обработка

Межгрупповые различия клинических параметров сравниваемых групп пациентов оценивали с помощью критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. Частоту встречаемости отдельных генотипов и комплексов определяли как процентное отношение индивидов, несущих генотип/комплекс генотипов, к общему числу обследованных в группе. Достоверность различий ча-

стот распределения изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по критерию χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц. Математическую обработку связи генетических признаков с количественными лабораторными показателями проводили в соответствии с методическими и аналитическими подходами квартильного анализа. В качестве параметров повышенной концентрации показателей принимаются диапазоны выше $p75$, а сниженной — ниже $p25$. Визуализацию парных ген-генных и ген-белковых (HbA1c) взаимодействий в группах с наличием и отсутствием ДР в виде интерактивной биологической сети осуществляли в программе Cytoscape v. 3.6.0 [23]. Интерпретация результатов визуализации осуществлялась на основе общих глобальных и локальных топологических свойств биологических сетей [7]. Статистическая обработка проводилась с помощью специализированных пакетов прикладных программ StatSoft Statistica 10.0, IBM SPSS Statistics 23 и пакета оригинальных программ объемной обработки биоинформации, включая многокомпонентный генетический анализ, на основе методов комбинаторики в теории вероятности. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты

Выделенные группы не различались между собой по возрасту, индексу массы тела (ИМТ), холестерина липопротеидов низкой и высокой плотности (ЛПНП и ЛПВП), общего холестерина и триглицеридов. Длительность СД ($11,7 \pm 6,7$ лет против $15,3 \pm 6,9$ лет, $p = 0,0002$) и уровень HbA_{1c} ($8,2 \pm 1,9\%$ против $9,1 \pm 1,7\%$, $p = 0,0004$) ожидаемо оказались больше у пациентов с ДР. Частоты генотипов анализируемых полиморфных позиций генов *MMP3*, *MMP9* и *VEGF +936* в группах больных СД 2 типа с наличием и отсутствием ДР находились в равновесии Харди–Вайнберга. Наблюдалось отклонение от распределения Харди–Вайнберга в сторону уменьшения гетерозиготности *MMP2 -1306* у пациентов двух групп ($\chi^2 = 6,84$, $p = 0,009$ у пациентов с ДР и $\chi^2 = 8,65$, $p = 0,003$ у пациентов без ДР) и *VEGF -2578* у пациентов с СД2 и наличием ДР ($\chi^2 = 6,36$, $P = 0,01$), что может быть обусловлено тем, что обе группы представлены пациентами, страдающими СД 2 типа. Нами не выявлено достоверных различий при анализе частот отдельных генотипов *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* и *VEGF +936* в группах больных с наличием и отсутствием ДР. Частота гетерозиготного варианта гена *VEGF -2578* снижена у пациентов с развитием сосудистого осложне-

ния ($OR = 0,46$, $OR\ 95\%C\ 0,26-0,81$, $\chi^2 = 6,59$, $P = 0,0102$). При анализе комплексных генотипов пяти полиморфных позиций выявлен ряд как позитивно, так и негативно ассоциированных с патологией комплексов (табл. 1). Различия частот комплексных генотипов, объединяющих полиморфные позиции генов *MMP* и *VEGF* обладают достаточно высокой степенью достоверности и величиной относительного риска развития ДР. Кроме того, наблюдается определенная закономерность в позитивно и негативно объединенных комплексах. Так, например, позиция *VEGF +936* в негативных комплексах представлена *CC* генотипом, в то время как в позитивно ассоциированных с ДР комплексах в этой позиции только *CT* генотип. Другая позиция данного гена представлена только гетерозиготным вариантом в комплексах, являющихся протективными для развития ДР.

Учитывая, что на развитие ДР значительное влияние оказывает длительность СД и уровень гликемии, мы проанализировали особенности полиморфизма изучаемых генов с учетом этих клинических факторов с использованием дизайна «случай–контроль». При сравнении подгрупп пациентов с длительностью заболевания менее 15 лет и наличием ДР относительно пациентов с длительным (более 15 лет) СД и отсутствием признаков ДР выявлено увеличение частоты *CC* генотипа в полиморфной позиции *-1306* гена *MMP2* в группе пациентов с «ранним» развитием осложнения ($OR = 2,7$, $p = 0,04$, табл. 2).

При анализе частот генотипов с учетом уровня HbA_{1c} у пациентов двух групп был применен квантильный подход. Анализ выявил достоверное повышение у пациентов с наличием ДР комбинации высокого уровня HbA_{1c} генотипами *MMP2 -1306CC* и *MMP9 -1562CT* ($OR = 2,4$, $p = 0,03$ и $OR = 4,49$, $p = 0,02$ соответственно). Частота сочетаний невысокого уровня HbA_{1c} (LL) с генотипами *MMP2 -1306CC*, *MMP3 -11715A5A*, *MMP3 -11715A6A*, *MMP9 -1562CC*, *VEGF -2578 CA*, *VEGF +936 CC* у пациентов с наличием ДР оказалась достоверно ниже, чем в группе без ДР ($OR = 0,1$; $OR = 0,18$; $OR = 0,15$; $OR = 0,24$; $OR = 0,10$; $OR = 0,21$ соответственно) (табл. 3).

Нами проведено исследование парных ген-генных и ген-белковых (HbA_{1c}) взаимодействий в группах больных с наличием предрасположенности и устойчивости к развитию ДР. Выполнена визуализация этих взаимодействий в виде биологических сетей и изучена особенность их топологии с помощью программы Cytoscape (рис. 1 и 2). Как видно из рисунка 1, характерной особенностью структурно-функциональной организации генно-белковой сети, ассоциированной с устойчивостью к развитию ДР, является ее способность

ТАБЛИЦА 1. АНАЛИЗ РАЗЛИЧИЙ ЧАСТОТ КОМПЛЕКСНЫХ ГЕНОТИПОВ ГЕНОВ *MMP2*, *MMP3* И *MMP9*, *VEGF* В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ СД 2 ТИПА С НАЛИЧИЕМ И ОТСУТСТВИЕМ ДР

TABLE 1. ANALYSIS OF FREQUENCIES DISTINCTIONS OF COMPLEX GENOTYPES OF *MMP2*, *MMP3* AND *MMP9*, *VEGF* GENES IN GROUPS OF DM PATIENTS WITH AND WITHOUT DR

Полиморфная позиция Polymorphic position	Генотип Genotype	Пациенты с ДР Patients with DR N = 90 (%)	Пациенты без ДР Patients without DR N = 111 (%)	OR	OR_CI95	P_tmF ₂
VEGF-2578:VEGF+936	CA-CC	19 (21,1)	45 (40,5)	0,39	0,21-0,74	0,0038
VEGF-2578:MMP3-1171	CA-55	5 (5,6)	17 (15,3)	0,33	0,12-0,92	0,0392
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306	CA-CC-CC	8 (8,9)	24 (21,6)	0,36	0,15-0,84	0,0193
VEGF-2578:VEGF+936:MMP3-1171	CA-CC-56	9 (10,0)	28 (25,2)	0,33	0,15-0,74	0,0060
VEGF-2578:VEGF+936:MMP9-1562	CA-CC-CC	9 (10,0)	27 (24,3)	0,35	0,15-0,78	0,0095
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP3-1171	CA-CC-CC-56	4 (4,5)	17 (15,3)	0,26	0,08-0,80	0,0186
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	CA-CC-CC-CC	4 (4,5)	16 (14,4)	0,28	0,09-0,87	0,0307
VEGF-2578:VEGF+936:MMP3-1171:MMP9-1562	CA-CC-56-CC	5 (5,6)	19 (17,1)	0,28	0,10-0,80	0,0152
VEGF-2578:MMP3-1171	AA-56	16 (17,8)	8 (7,2)	2,78	1,13-6,85	0,0282
MMP2-1306:MMP3-1171:MMP9-1562	CC-66-CT	6 (6,7)	0	17,36	0,96-312,49	0,0071
VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	CT-CC-CC	19 (21,3)	8 (7,2)	3,49	1,45-8,43	0,0060
VEGF+936:MMP3-1171:MMP9-1562	CT-56-CC	16 (17,8)	8 (7,2)	2,78	1,13-6,85	0,0282
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	CA-CT-CC-CC	9 (10,1)	2 (1,8)	6,13	1,29-29,15	0,0128
VEGF+936:MMP2-1306:MMP3-1171:MMP9-1562	CT-CC-56-CC	12 (13,5)	4 (3,6)	4,17	1,30-13,42	0,0162

Примечание. OR – отношение шансов; OR_CI95 – 95%-й доверительный интервал; P_tmF₂ – двусторонний точный метод Фишера.

Note. OR, odds ratio; OR_CI95, 95% confidence interval; P_tmF₂, bilateral Fisher's exact test.

к саморегуляции уровней промоторной активности генов регуляторов ангиогенеза (*VEGF*, *MMP*) и HbA1c-продукции за счет замкнутых регуляторных контуров с отрицательными и положительными обратными связями, представленных двумя закрытыми триплетами с общим хабом в виде белкой вершины HbA1c-LL (нижний квартиль гликированного гемоглобина). Такая топология генно-регуляторной сети обеспечивает сбалансированное протекание процессов ангиогенеза и функционирования внеклеточного матрикса в сетчатке глаза, что препятствует развитию ДР у больных СД2. Тогда как для топологии интерактивной сети *Hb-MMP-VEGF*, свойственной больным с ДР (рис. 2), характерен низкий уровень кластеризации за счет присутствия только двух открытых триплетов без общего белкового (HbA1c-НН) хаба. Такая структурно-функциональная организация генно-регуляторной сети

не способна, с одной стороны, обеспечить взаимную саморегуляцию промоторной активности генов регуляторов ангиогенеза и ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса, а с другой стороны – создать активный регуляторный контур для обеспечения оптимального уровня продукции гликированного гемоглобина. Представленные на данном рисунке 2 паттерны генов и ген-белковые взаимодействия, на наш взгляд, могут определять предрасположенность к развитию ДР, влияя на интенсивность процессов иммунного воспаления и активацию аномального неоангиогенеза в сетчатке.

Обсуждение

Несмотря на доказанную значимость клинических признаков как факторов риска ДР, даже в совокупности они не объясняют полностью риск развития данного осложнения. Наиболее

ТАБЛИЦА 2. АНАЛИЗ РАЗЛИЧИЙ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ *MMP2*, *MMP3* И *MMP9*, *VEGF* В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ С РАЗВИТИЕМ ДР ПРИ ДЛИТЕЛЬНОСТИ СД МЕНЕЕ 15 ЛЕТ И ОТСУТСТВИЕМ ДР ПРИ ДЛИТЕЛЬНОСТИ СД БОЛЕЕ 15 ЛЕТ

TABLE 2. ANALYSIS OF FREQUENCIES DISTINCTIONS OF GENOTYPES *MMP2*, *MMP3* AND *MMP9*, *VEGF* GENES IN PATIENTS WITH DR DURATION DM LESS THAN 15 YEARS AND WITHOUT DR AT DURATION DM MORE THAN 15 YEARS

Полиморфная позиция Polymorphic position	Генотип Genotype	Пациенты с ДР СД < 15 лет Patients with DR DM < 15 years N = 45 (%)	Пациенты без ДР СД > 15 лет Patients without DR DM > 15 years N = 45 (%)	OR	OR 95%CI	P
<i>MMP2</i> -1306	CC	32 (71,1)	21 (47,7)	2,70*	1,03-7,13	0,0422
	TC	8 (17,8)	17 (38,7)	0,34	0,11-1,00	0,0507
	TT	5 (11,1)	6 (13,6)	0,79	0,22-2,81	0,9682
<i>MMP3</i> -1171	5A5A	8 (17,8)	8 (17,8)	1,00	0,30-3,34	0,7827
	5A6A	29 (64,4)	22 (48,9)	1,89	0,75-4,83	0,2018
	6A6A	8 (17,8)	15 (33,3)	0,43	0,14-1,28	0,1470
<i>MMP9</i> -1562	CC	30 (66,7)	32 (71,1)	0,81	0,30-2,18	0,8198
	CT	15 (33,3)	12 (26,7)	1,38	0,51-3,75	0,6454
	TT	0	1 (2,2)	ns		
<i>VEGF</i> -2578	AA	12 (26,7)	15 (33,3)	0,73	0,29-1,80	0,6454
	AC	18 (40,00)	15 (33,3)	1,33	0,56-3,15	0,6617
	CC	15 (33,3)	15 (33,4)	1,00	0,42-2,40	0,8231
<i>VEGF</i> +936	CC	24 (53,3)	32 (71,1)	0,46	0,19-1,11	0,1280
	CT	20 (44,5)	13 (28,9)	1,97	0,82-4,71	0,1893
	TT	1 (2,2)	0	ns		

Примечание. * – χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность = 4,13; p = 0,0422.

Note. *, Chi-square test with Yates correct = 4.13, p = 0.0422.

ТАБЛИЦА 3. СОВМЕСТНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЯ HbA1C И ГЕНОТИПОВ *MMP* И *VEGF* У ПАЦИЕНТОВ С СД2 И ДР ОТНОСИТЕЛЬНО ПАЦИЕНТОВ С СД2, НО БЕЗ ДР

TABLE 3. THE JOINT ANALYSIS OF HbA1C LEVEL AND *MMP* AND *VEGF* GENOTYPES AT DM PATIENTS WITH DR CONCERNING DM PATIENTS WITHOUT DR

Уровень HbA1c/генотип Level HbA1c/genotype	Пациенты с СД2 и ДР Patients with DM and DR N = 85	Пациенты с СД2 без ДР Patients with DM without DR N = 104	OR	OR's 95%CI	P(t _m F ₂)
LL/ <i>MMP2</i> -1306CC	2 (2,4)	20 (19,2)	0,10	0,02-0,45	0,0004
LL/ <i>MMP3</i> -11715A6A	3 (3,543)	20 (19,2)	0,15	0,04-0,54	0,0013
LL/ <i>MMP3</i> -11715A5A	2 (2,4)	12 (11,5)	0,18	0,04-0,85	0,0230
LL/ <i>MMP9</i> -1562CC	7 (8,2)	28 (26,9)	0,24	0,10-0,59	0,0012
LL/ <i>VEGF</i> -2578 CA	2 (2,4)	20 (19,2)	0,10	0,02-0,45	0,0002
LL/ <i>VEGF</i> +936 CC	7 (8,2)	31 (29,8)	0,21	0,09-0,51	0,0002
HH/ <i>MMP2</i> -1306CC	20 (23,8)	12 (11,5)	2,40	1,09-5,25	0,0320
HH/ <i>MMP9</i> -1562CT	10 (11,8)	3 (2,9)	4,49	1,19-16,88	0,0207

Примечание. Высокий (HH) уровень гликированного Hb у больных СД2 (HbA1c > 9,79%); низкий (LL) уровень гликированного Hb у больных СД2 (HbA1c < 7,25%); P_{t_mF₂} – двусторонний точный метод Фишера.

Note. High level (HH) of glycated hemoglobin at DM patients (HbA1c > 9.79%); low level (LL) of glycated hemoglobin at DM patients (HbA1c < 7.25 %); P_{t_mF₂}, bilateral Fisher's exact test.

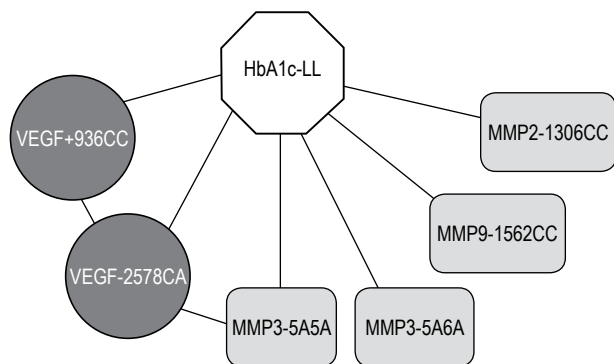


Рисунок 1. Ген-белковая сеть *Hb-MMP-VEGF* при сахарном диабете 2 типа с наличием резистентности к развитию ретинопатии

Figure 1. Gene-proteins network *Hb-MMP-VEGF* at diabetes mellitus type 2 and retinopathy resistance

значимые факторы — продолжительность СД и уровень *HbA1c*, по некоторым данным, объясняют приблизительно 11% риска развития ДР и ее осложнений. До 90% риска развития патологии объясняется вкладом других факторов, включая генетические [15, 25]. Гены *MMP* и *VEGF* представляют определенный интерес в качестве генов-кандидатов развития ДР, учитывая значение продуктов этих генов для регуляции проницаемости гематоретинального барьера и процесса ангиогенеза [24, 29] и доказанной ассоциированности генетического полиморфизма регуляторных регионов этих генов с уровнем их экспрессии [1, 5, 17]. Однако исследования, оценивающие ассоциированность полиморфизма этих генов с развитием диабетических микроангиопатий, достаточно не однородны. Yang и соавт., исследуя полиморфизм генов *MMP* в китайской популяции, предположили, что *MMP2-1306C* может быть связан с развитием ДР у пациентов с СД2. Однако выявленные ими различия были не велики, а частоты генотипов не различались между подгруппами с НПДР, ППДР, ПДР [30]. При анализе пяти полиморфизмов *MMP2* и двух полиморфизмов *MMP9*, включая *MMP2-1306C/T* и *MMP9-1562C/T* у кавказоидов Чехии, не показано ассоциации с ДР. При этом уровни *MMP2* и *MMP9* в плазме крови статистически различались между НПДР, ППДР, ПДР группами, и самый высокий уровень отмечался у пациентов с ПДР. Кроме того, высокий уровень *MMP2* был достоверно ассоциирован с наличием генотипов *MMP2-1306CC* и *-1306CT* [5]. При анализе распределения генотипов *MMP3-1171 5A/6A*, выполненном в китайской популяции, не выявлено значимых различий между группами больных СД 2 с наличием и отсутствием ДР [31]. В ряде проведенных исследований, подкрепленных метаанализами, нет достовер-

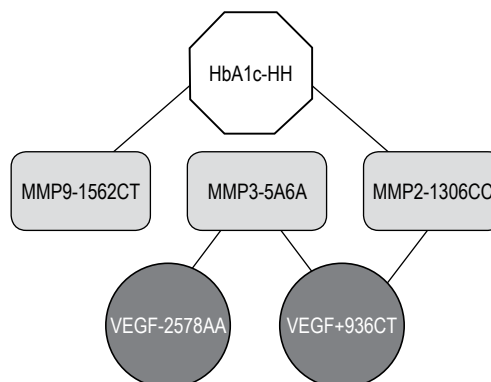


Рисунок 2. Ген-белковая сеть *Hb-MMP-VEGF* при сахарном диабете 2 типа с наличием предрасположенности к развитию ретинопатии

Figure 2. Gene-proteins network *Hb-MMP-VEGF* at diabetes mellitus type 2 and retinopathy susceptibility

ных различий частот генотипов *VEGF-2578C/A* (*rs699947*) в группах итальянцев и австралийцев и в азиатских группах [10, 13, 29]. Напротив, авторы другого метаанализа утверждают, что выявляются достоверные различия между группами в данной полиморфной позиции, но только для кавказоидов, но не для азиатских популяций. Наличие *VEGF-2578A* аллельного варианта гена связывают с риском развития ДР [12]. Относительно позиции *VEGF+936C/T* (*rs3025039*) достоверные различия выявлены только для некоторых азиатских популяций. Наличие минорного аллельного варианта в этой позиции связывают с повышенным риском развития ДР [9, 10, 13, 29]. Противоречивость результатов приведенных исследований может быть связана как с этническими различиями обследованных пациентов, так и с критериями формирования групп, влиянием негенетических факторов, прежде всего длительности СД и качества гликемического контроля на риск развития ДР. Немаловажный вклад в различия результатов разных исследований может в том числе вносить влияние других генов и полиморфных позиций анализируемого гена на развитие заболевания. Анализ возможно в нашем исследовании синергизма выявил наличие комплексов как двух позиций одного гена, так и нескольких полиморфных позиций разных генов, ассоциированных со сниженным/повышенным риском развития ДР у пациентов с СД2. Доказано, что индивидуальные генетические полиморфизмы являются слабым фактором риска развития болезни и могут быть использованы в качестве прогностической модели ее развития в очень редких случаях. Но хорошо известно, что опасным для возникновения многих заболеваний является сочетание неблагоприятных аллелей нескольких генов с аддитивным эффектом [16]. Это необходимо учитывать на этапе оценки ком-

плексного влияния продуктов полиморфных генов на развитие болезни с целью создания панели молекулярных маркеров прогнозирования, ранней диагностики и клинического течения заболеваний.

Учитывая, что длительность СД является одним из ведущих факторов риска развития ДР, мы проанализировали различия частот генотипов *MMPs* и *VEGF* в группе пациентов с ДР при длительности заболевания менее 15 лет и в группе пациентов с длительным (более 15 лет) СД, не имеющих диабетического поражения сетчатки. Используя метод «случай-контроль», мы показали, что генотип *CC* в позиции *-1306* гена *MMP2* ассоциирован с развитием ДР в первые 15 лет заболевания. Функциональный эффект полиморфизма в промоторе гена *MMP2* на уровень экспрессии фермента был описан ранее. Показано, что замена *C→T* в позиции *MMP2 -1306* приводит к более низкому уровню экспрессии за счет нарушения целостности *Sp1* сайта связывания (*CCACC* box) промоторного региона гена [22], и, к снижению уровня *MMP-2* [4]. Таким образом, можно предполагать, что более высокая продукция *MMP-2* у больных СД2 — носителей генотипа *CC* в позиции *MMP2 -1306* способствует более раннему развитию ДР.

В ряде исследований показано, что высокий уровень гликемии может модулировать экспрессию и активность *MMP*. Причем механизмы регулирования до конца не ясны, но могут затрагивать в том числе и модификацию промоторных регионов генов [27, 28, 33]. Положительные корреляции выявлены также и между уровнем глюкозы и *VEGF* у пациентов с СД и ДР [11]. Мы показали, что сочетание высокого уровня *HbA1c* с наличием генотипов, ассоциированных с более высоким уровнем экспрессии *MMP* (*MMP2 -1306CC* и *MMP9 -1562CT*) повышает риск развития ДР у пациентов с СД 2 типа. При этом значимость ассоциации уровня *HbA1c* с развитием ДР повышалась при комбинации *HbA1c* с вариантами

исследованных генов. Значение *OR* при квантительном анализе различий только уровня *HbA1c* в этих группах без учета полиморфизма не является достоверным.

Проведенное нами в данной работе компьютерное моделирование с визуальной реконструкцией сетевых взаимодействий генотипов, вовлеченных в регуляцию процессов деструкции и ангиогенеза, и уровней *HbA1c*-продукции — интегрального показателя гликемии — выявило наличие различий в структурно-функциональной организации ген-генных и ген-белковых взаимодействий в группах больных с наличием и отсутствием ДР, характеризующихся разным уровнем сбалансированности процессов иммунного воспаления, ангиогенеза и функционирования внеклеточного матрикса в сетчатке глаза. Ввиду того, что гены, полиморфизмы которых исследованы нами, кодируют структуры белков, активно влияющих на внутриклеточный метаболизм, можно предположить, что их структура отражает и геномно-метаболические взаимодействия. Эти заключения представляются тем более важными, что нами проанализированы полиморфные участки генов, связанные не со структурой их белковых продуктов, а с регуляторными участками генов, влияющих на количество продуцируемых клетками белков, обладающих способностью влиять на процессы ангиогенеза и ремоделирования соединительной ткани, являющейся основой для прорастания сосудистой и капиллярной сетей.

Таким образом, как показывают наши исследования, построение интерактивных биологических сетей транскрипционной регуляции и метаболических путей и их топологический анализ на основе биоинформационной платформы Cytoscape позволяют строить и изучать генные и белковые взаимодействия применительно к исследованию патогенеза осложнений СД 2 типа для разработки в последующем подходов к персонализированной профилактике и терапии.

Список литературы / References

1. Климонтов В.В., Тянь Н.В., Орлов Н.Б., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Мякина Н.Е., Булумбаева Д.М., Коненков В.И. Взаимосвязь уровня фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови и полиморфизма гена *VEGFA* с ишемической болезнью сердца у больных сахарным диабетом 2-го типа // Кардиология, 2017. Т. 57, № 5. С. 17-22. [Klimontov V.V., Tyan N.V., Orlov N.B., Shevchenko A.V., Prokofiev V.F., Myakina N.E., Bulumbaeva D.M., Konenkov V.I. Association of serum levels and gene polymorphism of vascular endothelium growth factor with coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Kardiologiya = Cardiology*, 2017, Vol. 57, no. 5, pp. 17-22. (In Russ.)]
2. Abu El-Asrar A., Midea E., Al-Shabrawey M., Mohammad G. New developments in the pathophysiology and management of diabetic retinopathy. *J. Diabetes Res.*, 2013, Vol. 2013, 424258. doi: 10.1155/2013/424258.
3. Banyasz I., Szabo S., Bokodi G., Vannay A., Vászárhelyi B., Szabó A., Tulassay T., Rigó J. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe preeclampsia. *Mol. Hum. Reprod.*, 2006, Vol. 12, pp. 233-236.
4. Belo V., Luizon M., Carneiro P., Gomes V., Lacchini R., Lanna C., Souza-Costa D. Effect of metabolic syndrome risk factors and *MMP-2* genetic variations on circulating *MMP-2* levels in childhood obesity. *Mol. Biol. Rep.*, 2013, Vol. 40, no. 3, pp. 2697-704.

5. Beránek M., Kolar P., Tschoplova S., Kankova K., Vasku A. Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy. *Mol. Vis.*, 2008, Vol. 14, pp. 1114-1121.
6. Busti C., Falcinelli E., Momi S., Gresele P. Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. *Intern. Emerg. Med.*, 2009, Vol. 5, pp. 13-25.
7. Csermely P., Korcsmáros T., Kiss H.J., London G., Nussinov R. Structure and dynamics of molecular networks: a novel paradigm of drug discovery: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.*, 2013, Vol. 138, no. 3, pp. 333-408.
8. Di Y., Nie Q.-Z., Chen X.-L. Matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor expression change in experimental retinal neovascularization. *Int. J. Ophthalmol.*, 2016, Vol. 9, no. 6, pp. 804-808.
9. Fattah A., Eltanamly R., Nabih M., Kamal M. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism is not associated with diabetic retinopathy in egyptian patients. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.*, 2016, Vol. 23, no. 1, pp. 75-78.
10. Gong J., Sun Y. Association of VEGF gene polymorphisms with diabetic retinopathy: a meta-analysis. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 12, e84069. doi: 10.1371/journal.pone.0084069.
11. Guo L., Jiang F., Tang Y.-T., Si M.-Y., Jiao X.-Y. The association of serum vascular endothelial growth factor and ferritin in diabetic microvascular disease. *Diabetes Technol. Ther.*, 2014, Vol. 16, no. 4, pp. 224-234.
12. Guo L., Lyu H. Meta analysis of the association between vascular endothelial growth factor -2578 C/A polymorphism and risk for diabetic retinopathy. *Chin. J. Exp. Ophthalmol.*, 2015, Vol. 33, no. 1, pp. 70-75.
13. Han L., Zhang L., Xing W., Zhuo R., Lin X.L., Hao Y., Wu Q., Zhao J. The associations between VEGF gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis of 11 case-control studies review article. *J. Diabetes Res.*, 2014, Vol. 2014, 805801. doi: 10.1155/2014/805801.
14. Kowluru R., Zhong Q., Santos J. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2012, Vol. 21, no. 6, pp. 797-805.
15. Kuo J., Wong T., Rotter J. Challenges in elucidating the genetics of diabetic retinopathy. *JAMA Ophthalmol.*, 2014, Vol. 132, no. 1, pp. 96-107.
16. Lvovs D., Favorova O.O., Favorov A.V. A polygenic approach to the study of polygenic diseases. *Acta Naturae*, 2012, Vol. 4, no. 3, pp. 62-76.
17. Metzger S., Koutsimpelas D., Brieger J. Transcriptional regulation of the VEGF gene in dependence of individual genomic variations. *Cytokine*, 2015, Vol. 76, no. 2, pp. 519-526.
18. Mohammad G., Kowluru R. Matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy and mitochondrial dysfunction. *Lab. Invest.*, 2010, Vol. 90, pp. 1365-1372.
19. Okamoto K., Mimura K., Murawak Y., Yuasa I. Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase MMP-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease. *J. Gastr. Hepatol.*, 2005, Vol. 20, no. 7, pp. 1102-1108.
20. Opdenakker G. Matrix metalloproteinase in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmologica*, 2015, Vol. 93, S. 255.
21. Peeters S., Engelen L., Buijs J., Chaturvedi N., Fuller J., Schalkwijk C., Stehouwer C. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2, -3, -10, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are associated with vascular complications in patients with type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2015, Vol. 14, p. 31.
22. Price S., Greaves D., Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele specific transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, pp. 7549-7558.
23. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 2003, Vol. 13, no. 11, pp. 2498-2504.
24. Singh M., Tyagi S. Metalloproteinases as mediators of inflammation and the eyes: molecular genetic underpinnings governing ocular pathophysiology. *Int. J. Ophthalmol.*, 2017, Vol. 10, no. 8, pp. 1308-1318.
25. Sun J., Keenan H., Cavallerano J., Asztalos B., Schaefer E., Sell D., Strauch C., Monnier V., Doria A., Aiello L., King G. Protection from retinopathy and other complications in patients with type 1 diabetes of extreme duration: the Joslin 50-Year Medalist Study. *Diabetes Care*, 2011, Vol. 34, no. 4, pp. 968-974.
26. Takahashi M., Haro H., Wakabayashi Y., Kawa-Uchi T., Komori H., Shinomiya K. The association of degeneration of the intervertebral disc with 5a/6a polymorphism in the promoter of the human matrix metalloproteinase-3 gene. *J. Bone Joint Surg.*, 2001, Vol. 83 (B), pp. 491-495.
27. Tarallo S., Beltramo E., Berrone E., Dentelli P., Porta M. Effects of high glucose and thiamine on the balance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in vascular cells. *Acta Diabetologica*, 2010, Vol. 7, no. 2, pp. 105-111.
28. Tsai W.-C., Liang F.-C., Cheng J.-W., Lin L.-P., Chang S.-C., Chen H.-H., Pang J.-H.S. High glucose concentration up-regulates the expression of matrix metalloproteinase-9 and -13 in tendon cells. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2013, Vol. 14, p. 255.
29. Xie X.-J., Yang Y.-M., Jiang J.-K., Lu Y.-Q. Association between the vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms and diabetic retinopathy risk: a meta-analysis. *J. Diabetes*, 2017, Vol. 9, no. 8, pp. 738-753.

30. Yang J., Fan X.-H., Guan Y.Q., Li Y., Sun W., Yang X.-Z., Liu R. MMP-2 gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus diabetic retinopathy. *Int. J. Ophthalmol.*, 2010, Vol. 3, no. 2, pp. 137-140.
31. Yang J., Zhang T., Cui X., Ma Y., Wang H. Correlation of polymorphism of MMP-3 gene with the risk of type 2 diabetic retinopathy. *Ann. Eye Sci.*, 2016, Vol. 31, no. 3. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2016.09.11.
32. Yuen M., Chow W., Lam K. Diabetic retinopathy: from pathophysiology to treatment. Review Article. *HKJ Ophthalmol.*, 2016, Vol. 20, no. 3, pp. 106-108.
33. Zhong Q., Kowluru R.A. Regulation of matrix metalloproteinase-9 by epigenetic modifications and the development of diabetic retinopathy. *Diabetes*, 2013, Vol. 62, no. 7, pp. 2559-2568.

Авторы:

Шевченко А.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Прокофьев В.Ф. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Коненков В.И. — д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Климонтов В.В. — д.м.н., профессор РАН, заведующий лабораторией эндокринологии, заместитель руководителя филиала по научной работе, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Тян Н.В. — младший научный сотрудник лаборатории эндокринологии, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Черных Д.В. — к.м.н., врач-офтальмолог ФГБУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия

Трунов А.Н. — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия

Черных В.В. — д.м.н., профессор, директор ФГБУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shevchenko A.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Prokofiev V.F., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Konenkov V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Klimontov V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Endocrinology, Deputy Director for Science, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Tyan N.V., Junior Research Associate, Laboratory of Endocrinology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh D.V., PhD (Medicine), Ophthalmologist, Novosibirsk Branch, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex “Eye Microsurgery”, Novosibirsk, Russian Federation

Trunov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Research, Novosibirsk Branch, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex “Eye Microsurgery”, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Novosibirsk Branch, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex “Eye Microsurgery”, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 31.08.2018
Отправлена на доработку 19.09.2018
Принята к печати 10.10.2018

Received 31.08.2018
Revision received 19.09.2018
Accepted 10.10.2018

CD20⁺В-ЛИМФОЦИТЫ – ВЫСОКОИНФОРМАТИВНЫЙ БИОМАРКЕР ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА

**Эллиниди В.Н.¹, Хромов-Борисов Н.Н.², Феоктистов А.А.³,
Лямина А.В.¹, Калинина Н.М.^{1,4}**

¹ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ Клиника «Мать и дитя», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Плазматические клетки часто принято считать одним из значимых критериев гистологической диагностики хронического эндометрита (ХЭ). Низкое их количество в строме эндометрия, неравномерность распределения и сходство с клетками цитогенной стромы эндометрия определяют трудности их идентификации при рутинном гистологическом методе исследования, а их отсутствие ставит под сомнение диагноз ХЭ.

В работе представлены данные сравнительного ROC-анализа двух иммуногистохимических показателей хронического эндометрита: CD20⁺В-лимфоцитов и CD138⁺ плазматических клеток (ПК). В группу исследования включены 937 женщин с ХЭ, обследованные по поводу бесплодия и неудачных попыток ЭКО. Контрольную группу составили 103 женщины без признаков ХЭ, проходившие обследование по поводу мужского фактора бесплодия. Чувствительность показателя CD20⁺В-лимфоцитов для установления диагноза ХЭ составила 98% (Se = 0,98), что в 1,44 раза выше в сравнении с чувствительностью CD138⁺ПК, соответственно, 68% (Se = 0,68). Специфичность обоих показателей для диагностики отсутствия ХЭ была высокой – 98% (Sp = 0,98) и 99% (Sp = 0,99) соответственно. Определены пороговые диагностические количественные значения двух показателей в эндометрии (точки отсечения-COR) для установления диагноза ХЭ: при использовании CD138⁺ПК – 1 кл/5 мм² и CD20⁺В-лимфоцитов – 5 кл/5 мм². Анализ линейной регрессии показал высоко значимую (p = 0,00053) связь CD138⁺ПК от CD20⁺В-лимфоцитов: при увеличении количества CD20⁺В-лимфоцитов имеет место тенденция возрастания числа CD138⁺ПК, что подтверждает прямую их патогенетическую связь. Установленные при иммуногистохимическом исследовании топографические и количественные особенности CD20 В-лимфоцитов в эндометрии позволяют его рекомендовать как высокочувствительный и значимый ранний диагностический показатель хронического эндометрита.

Ключевые слова: хронический эндометрит, плазматические клетки, CD138, CD20, В-лимфоциты, иммуногистохимическое исследование

Адрес для переписки:

Эллиниди Вера Николаевна
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России
191119, Россия, Санкт-Петербург, Лиговский пр.,
120, кв. 27.
Тел.: 8 (911) 706-10-16.
E-mail: ellinidiv@rambler.ru

Address for correspondence:

Ellinidi Vera N.
A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation
Medicine
191119, Russian Federation, St. Petersburg,
Ligovsky ave., 120, apt 27.
Phone: 7 (911) 706-10-16.
E-mail: ellinidiv@rambler.ru

Образец цитирования:

В.Н. Эллиниди, Н.Н. Хромов-Борисов,
А.А. Феоктистов, А.В. Лямина, Н.М. Калинина
«CD20⁺ В-лимфоциты – высокоинформативный
биомаркер для ранней диагностики хронического
эндометрита» // Медицинская иммунология, 2019.
Т. 21, № 3. С. 451-456.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-451-456

© Эллиниди В.Н. и соавт., 2019

For citation:

V.N. Ellinidi, N.N. Khromov-Borisov, A.A. Feoktistov,
A.V. Lyamina, N.M. Kalinina "CD20⁺ B lymphocytes, a
highly informative biomarker for early diagnosis of chronic
endometritis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 451-456.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-451-456

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-451-456

CD20⁺B LYMPHOCYTES, A HIGHLY INFORMATIVE BIOMARKER FOR EARLY DIAGNOSIS OF CHRONIC ENDOMETRITIS

Ellinidi V.N.^a, Khromov-Borisov N.N.^b, Feoktistov A.A.^c,
Lyamina A.V.^a, Kalinina N.M.^{a, d}

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

^b R. Vreden Research Institute of Traumatology and Orthopaedics, St. Petersburg, Russian Federation

^c Mother and Child Clinics, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Plasma cells are often considered to be among important criteria in histological diagnosis of chronic endometritis (CE). Low plasma cell numbers in endometrial stroma, uneven distribution and similarity to the cells of cytogenic endometrial stroma represent difficulties with their identification by routine histological methods of study, and their absence prevents distinct diagnosis of CE. The paper presents data on comparative ROC-analysis of two immunohistochemical parameters of chronic endometritis: CD20⁺B lymphocytes and CD138⁺ plasma cells (PC). The study group included 937 women with CE, who were examined for infertility and failed IVF attempts. The control group consisted of 103 women without signs of CE who were studied for male infertility factor.

The sensitivity of CD20⁺B cell assays for the diagnosis of CE was 98% (Se = 0.98), thus being 1.44 times higher compared to the sensitivity of CD138⁺PC, that was, respectively, 68% (Se = 0.68). The specificity of both indicators for the diagnosis of the absence of CE was high, i.e., 98% (Sp = 0.98), and 99% (Sp = 0.99), respectively. The threshold quantitative values for the two endometrial parameters (cutoff point) for the CE diagnosis were also determined when using CD138⁺PC-1 cell/5mm² and CD20⁺B lymphocytes-5cell/5mm². Analysis of linear regression showed a highly significant ($p = 0.00053$) relationship of CD138⁺PC from CD20⁺B lymphocytes: With increased numbers of CD20⁺B lymphocytes, there is a trend for higher CD138⁺PC numbers which confirms their direct pathogenetic relationship. The topographic and quantitative features of CD20⁺B lymphocytes in the endometrium determined during immunohistochemical examination allow us to recommend this approach as a highly sensitive and significant early diagnostic indicator of chronic endometritis.

Keywords: chronic endometritis, plasma cells, CD138, CD20, B lymphocytes, immunohistochemical assay

Введение

Хронический эндометрит (ХЭ) — особый тип хронического воспаления слизистой матки с минимальными клиническими проявлениями. Это определяет решающее диагностическое значение гистологического метода [2, 8, 10].

Общепринятое ориентирование морфологов при оценке хронизации воспалительного процесса на один диагностический критерий — наличие в эндометрии плазматических клеток с отсутствием количественной оценки клеток гуморального иммунного ответа и субклиническом течении ХЭ — создает значительные предпосылки к гиподиагностике заболевания и определяет в целом низкую частоту его распространенности (1-3%) [9].

Известно, что плазматические клетки формируются в результате дифференцировки терминальной антиген-зависимой стадии развития В-лимфоцитов, которые обеспечивают в ткани локальный гуморальный иммунный ответ [6].

Плазматические клетки отличаются от В-лимфоцитов не только специфической морфологи-

ей, но и потерей экспрессии маркеров кластерной дифференцировки В-лимфоцитов — CD20, CD19, CD22. Специфический поверхностный антиген плазматических клеток CD138 значительно повышает их идентификацию в стромальном инфильтрате [3, 7, 8, 10].

В соответствии с этим для выявления плазматических клеток в тканях используется иммуногистохимический метод с применением антител к CD138.

Цель исследования — определить диагностическую значимость двух иммуногистохимических биомаркеров гуморального иммунного ответа — CD138⁺ плазматических клеток и CD20⁺В-лимфоцитов в эндометрии при хроническом эндометрите.

Материалы и методы

В исследование были включены 937 женщин с установленным диагнозом ХЭ, проходившие обследование в клинике «Мать и дитя» по поводу бесплодия и неудачных попыток ЭКО за период 2011-2016 гг. Контрольную группу составили 103 женщины без ХЭ, обследованные по поводу мужского фактора бесплодия. Группы были сба-

лансированы по возрасту: в группе с ХЭ возраст пациенток был от 19 до 51 года с медианой в 34 года, в контрольной группе — от 23 до 47 лет с медианой 33 года.

Для гистологического исследования соскобы фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, проводили через изопропиловый спирт в автомате LeicaASP200 (Германия) и заливали в парафин. Срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в бальзам.

Иммуногистохимическое исследование выполнялось в автомате Bond-MaxLeica с использованием полимерной системы Novolink (Великобритания) и моноклональных мышиных антител фирмы DAKO (Дания): CD20, (clone L260), рабочее разведение 1:150 и CD138 (clone Syndecan-1), форма ready-to-use (RTU). Результаты иммуногистохимической реакции оценивали путем прямого подсчета окрашенных клеток под микроскопом Leica DM2000 при увеличении микроскопа $\times 100$ на 5 мм² площади препарата соскоба эндометрия.

Основным статистическим методом был ROC-анализ, при проведении которого и интерпретации результатов руководствовались стандартом (ГОСТ Р 53022.3-2008) [1]. При выполнении ROC-анализа использовали интерактивную программу

MetaboAnalyst 3.0 [11]. Основными показателями качества и информативности предлагаемого диагностического теста были общепринятые чувствительность (Se), специфичность (Sp), отношения правдоподобий и предсказательные вероятности для положительных и отрицательных результатов теста (LR⁺, LR⁻, PPV и NPV соответственно). Для статистической оценки этих показателей использовали оригинальную программу DiagStat.xls. В соответствии с новейшими научно обоснованными рекомендациями международного коллектива статистиков [4], при проверке статистических гипотез в качестве критического уровня значимости использовано значение 0,005. Для всех показателей вычисляли 95%-е доверительные интервалы (ДИ). Для статистического анализа использовали непараметрические параметры: тест Манна–Уитни с поправкой по Бонферони, для корреляции и регрессии использованы интерактивная программа BoxPlotR (<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>) и программа PAST.

Результаты

В группе у женщин с ХЭ CD138⁺ плазматические клетки (ПК) были обнаружены в 68% (637 из 937) случаев и отсутствовали в 32% (300 из 937) случаев (табл. 1). У женщин контрольной груп-

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА И ИНФОРМАТИВНОСТИ ROC-АНАЛИЗА ДЛЯ БИОМАРКЕРОВ CD138⁺ПК И CD20⁺В-ЛИМФОЦИТОВ В ЭНДОМЕТРИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА

TABLE 1. KEY INDICATORS OF THE QUALITY AND INFORMATIVENESS ROC-ANALYSES OF BIOMARKERS CD138⁺PC AND CD20⁺B LYMPHOCYTES IN THE ENDOMETRIUM FOR THE DIAGNOSTICS OF THE CHRONIC ENDOMETRITIS (CE)

	COP (кл/5 мм ²) (cells/5 mm ²)	Группы Groups		p
		ХЭ CE	К C	
Объемы выборок Sample sizes	N	937	103	
CD138⁺ плазматические клетки Plasma cells	> 0,75	637	0	1,2 × 10 ⁵
	< 0,75	300	103	
		Se = _{0,65} 0,68 _{0,71}	Sp = _{0,97} 0,99 _{1,0}	
		LR ⁺ = ₁₉ 71 ₂₇₉₀	LR ⁻ = _{2,8} 3,1 _{3,4}	
	Prev = _{0,1} 0,2 _{0,3}	PPV = _{0,71} 0,95 _{0,99}	NPV = _{0,89} 0,93 _{0,95}	
CD20⁺ В-лимфоциты B lymphocytes	> 4,5	903	1	2 × 10 ³⁷
	< 4,5	34	102	
		Se = _{0,95} 0,96 _{0,95}	Sp = _{0,95} 0,98 _{1,0}	
		LR ⁺ = ₁₉ 51 ₄₁₆	LR ⁻ = ₁₉ 26 ₃₈	
	Prev = _{0,1} 0,2 _{0,3}	PPV = _{0,75} 0,93 _{0,99}	NPV = _{0,98} 0,99 _{1,00}	

Примечание. n – объем выборки; COP – оптимальная точка отсечения; Se – чувствительность; Sp – специфичность; LR⁺ и LR⁻ – отношения правдоподобий для положительных и отрицательных результатов теста соответственно; Prev – распространенность ХЭ; PPV и NPV – предсказательные вероятности для положительного и отрицательного результатов теста соответственно. Границы 95% ДИ для оцениваемых показателей указаны в виде подстрочных индексов.

Note. n, sample size; COP, cut-off-point; Se, sensitivity; Sp, specificity; LR⁺ and LR⁻, positive and negative likelihood ratios; Prev, prevalence of CE; PPV and NPV, positive and negative predictive values. Limits of 95% CI are shown as subscripts.

пы (К) CD138⁺ПК в эндометрии не выявлялись. Результаты исследования показали, что при ХЭ постоянным показателем гуморального иммунного ответа были CD20⁺В-лимфоциты, которые выявлялись в эндометрии у всех (937) женщин с ХЭ, в том числе и при отсутствии плазматических клеток.

Для оценки чувствительности и специфичности двух биомаркеров, определения их диагностической значимости для установления диагноза ХЭ был проведен ROC-анализ.

Количественные показатели CD138⁺ПК и CD20⁺В-лимфоцитов были выше у женщин с ХЭ, в сравнении с контрольной группой со статистически высокими значимыми различиями (табл. 1, $p < 0,0001$).

ROC-анализ позволил определить оптимальные дискриминирующие значения (точки отсечения — COP), которые составили, соответственно, 0,75 кл/5 мм² — для биомаркера CD138⁺ и 4,5 кл/5 мм² — для биомаркера CD20⁺ (табл. 1). Таким образом, превышение порогового значения в количестве 1 кл/5 мм² в эндометрии для биомаркера CD138⁺ и превышение порогового значения в количестве 5 кл/5 мм² для биомаркера CD20⁺ с высокой вероятностью (не менее 83%) свидетельствуют о наличии ХЭ (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки).

Оба биомаркера показали высокую специфичность для диагностики ХЭ: $Sp = 0,96$ — для CD138⁺ПК и $Sp = 0,99$, соответственно, для CD20⁺В-лимфоцитов. Чувствительность биомаркера CD138⁺ПК для диагностики ХЭ была ниже в сравнении с чувствительностью биомаркера CD20⁺В-лимфоцитов, соответственно, $Se = 0,68$ и $Se = 0,96$ (табл. 1).

Важнейшими характеристиками качества и информативности диагностического теста являются показатели прогностической ценности — вероятность наличия заболевания при известном положительном (патологическом) результате теста (predictive value positive (PPV) и вероятность отсутствия заболевания при отрицательном (нормальном) результате теста (negative (NPV). Прогностическая ценность диагностического теста зависит от чувствительности и специфичности теста и распространенности заболевания (Prev). Таким образом, PPV — это пропорция истинно положительных результатов теста среди всех положительных значений, определяется как частота его совпадения с заболеванием и показывает, насколько велика вероятность наличия болезни при положительных (патологических) результатах диагностического теста.

Тогда как NPV — это пропорция истинно отрицательных (нормальных) результатов теста среди всех отрицательных результатов значений, определяется как частота его совпадения с отсутствием

заболевания. На основании данного критерия можно судить, насколько велика вероятность, что пациент здоров, если результаты диагностического теста отрицательные.

В таблице 1 представлены результаты оценки прогностических показателей для приемлемого значения распространенности ХЭ в диапазоне от 10 до 30% ($Prev = 0,20$ с размахом от 0,1 до 0,3). При такой распространенности ХЭ для обоих маркеров и PPV, и NPV превышают 90% (табл. 1), что позволит установить диагноз хронического эндометрита в не менее чем 93% случаев (с нижней границей 95% ДИ не ниже 71%). Более надежным критерием является диагностика ХЭ на основе CD20⁺В-лимфоцитов, который ранее для этих целей не использовался.

О более низкой информативности маркера CD138⁺ПК свидетельствует также значение отношения правдоподобий для отрицательных результатов теста (LR^-), то есть отношение вероятности получения ложноотрицательного результата к вероятности получения истинно отрицательного результата теста было $LR^- = 3,1$ для CD138⁺ПК по сравнению с $LR^- = 26$ для маркера CD20⁺В-лимфоцитов.

Результаты ROC-анализа показали, что площади под ROC-кривой (AUC) для обоих биомаркеров ХЭ статистически высоко значимо отличаются от неинформативного значения $AUC_{uninf} = 0,50$: для CD138⁺ $AUC = 0,84$ (с 95% ДИ от 0,83 до 0,86 и $p = 1,2 \times 10^5$), а для CD20⁺ $AUC = 0,994$ (с 95% ДИ от 0,990 до 0,997 и $p = 2 \times 10^{37}$) (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки).

Результаты иммуногистохимического исследования позволили установить два типа морфологии CD20⁺В-лимфоцитов при ХЭ: диффузно рассеянных лимфоцитов, расположенных в строме, вокруг желез, сосудов, и формирование скоплений по типу лимфоидно-подобных фолликулов (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки).

Для оценки корреляции и регрессии между двумя изучаемыми биомаркерами количественные значения CD20⁺В-лимфоцитов разбили на 6 групп с градацией: от 0 до 4 (X_{0-4}), от 5 до 8 (X_{5-8}), от 9 до 12 (X_{9-12}), от 13 до 16 (X_{13-16}), от 17 до 24 (X_{17-24}) и от 25 и более (X_{25}) кл/5 мм² (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки).

В каждой группе оценивали количественные показатели CD138⁺ПК. На графике видно, что с увеличением количества CD20⁺В-лимфоцитов имеет место тенденция возрастания числа CD138⁺ПК. Тенденция эта статистически высоко значима и хорошо описывается уравнением линейной регрессии, указанным под рисунком 3. Увеличение количества CD20⁺В-лимфоцитов в эндометрии сочеталось с достоверным нарастающим увеличением количества CD138⁺ПК ($p = 0,00053$), последние чаще определялись в зо-

нах CD20⁺В-фолликулов (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки; рис. 3, см. 3-ю стр. обложки).

Обсуждение

Отсутствие специфической отличительной морфологии между В- и Т-лимфоцитами при рутинном гистологическом методе исследования ограничивает возможности дифференциальной диагностики местного локального и гуморального иммунного ответа при хроническом воспалении. При рутинном гистологическом исследовании именно ПК отличаются своей морфологией (эксцентрично расположенным ядром со спицеобразным хроматином и широким ободком цитоплазмы) от В- и Т-лимфоцитов, в связи с чем на протяжении многих лет их рассматривают как один из наиболее значимых диагностических критериев хронического течения воспаления [2, 3, 8, 10]. Идентификация ПК в стромальном воспалительном инфильтрате при рутинном гистологическом исследовании затрудняет их низкое содержание. Тогда как отсутствие среди клеток воспаления типовых ПК вовсе исключает хронизацию воспалительного процесса в эндометрии.

Морфологическая диагностика ХЭ повышается при использовании иммуногистохимического метода, позволяющего с помощью специфических маркеров выявлять в ткани одиночные плазматические клетки [3, 5, 7, 10].

Результаты проведенного ROC-анализа показали, что оба биомаркера CD138⁺ПК и CD20⁺В-лимфоцитов имеют высокую специфичность для диагностики хронического эндометрита, соответственно, $Sp = 0,96$ и $Sp = 0,99$. Тогда как чувствительность биомаркера CD138⁺ПК ($Se = 0,68$) для диагностики ХЭ была в 1,44 раза ниже по сравнению с высокой чувствительностью биомаркера CD20⁺В-лимфоцитов ($Se = 0,96$). Таким образом, ориентирование патологов при диагностике ХЭ только на один критерий — CD138⁺ПК — приведет к гиподиагностике заболевания в 32% случаев. Более надежным методом является диагностика ХЭ с применением иммуногистохимического исследования биомаркера CD20⁺В-лимфоцитов.

Результаты анализа показателей прогностической ценности для двух биомаркеров показали, что использование в диагностике биомаркеров CD138⁺ПК и CD20⁺В-лимфоцитов при распространенности ХЭ в диапазоне от 10 до 30% позволит установить диагноз хронического эндометрита в не менее чем 93% случаев (с нижней границей 95% ДИ не ниже 71%).

О более низкой информативности маркера CD138⁺ПК свидетельствует также значение отношения правдоподобий для отрицательных результатов теста (LR^-), то есть отношение вероятности получения ложноотрицательного результата к вероятности получения истинно от-

рицательного результата теста было $LR^- = 3,1$ для CD138⁺ПК по сравнению с $LR^- = 26$ для маркера CD20⁺В-лимфоцитов.

По данным некоторых исследователей, обнаружение 1-2 плазматических клеток уже является значимым [7, 8] критерием для диагностики ХЭ. Это положение подтверждается и результатами нашего исследования с применением ROC-анализа, при котором пороговое значение для CD138⁺ПК составило 0,75 кл/5 мм². Таким образом, диагностическим критерием для установления диагноза ХЭ является обнаружение в эндометрии 1 кл/5 мм² CD138⁺ПК. Тогда как для CD20⁺В-лимфоцитов пороговое диагностическое значение в эндометрии было в 5 раз больше в сравнении с CD138⁺ПК и составило 5 кл/5 мм². Следует отметить, что столь низкое количественное значение показателя CD138⁺ПК в эндометрии не может достоверно отражать степень активности воспалительного процесса.

Увеличение количества CD138⁺ПК сочетается с распространением и выраженностью фиброза стромы эндометрия и высоко значимо зависит от увеличения количества CD20⁺В-лимфоцитов (коэффициент корреляции $r = 0,00053$). Так, при среднем значении CD20⁺В-лимфоцитов в количестве 5 кл/5 мм² определяются единичные CD138⁺ПК в эндометрии в количестве 1 кл/5 мм², тогда как при увеличении количества CD20⁺В-лимфоцитов от 25 кл/5 мм² возрастает и количество CD138⁺ПК до 5 кл/5 мм². Проведенный анализ линейной регрессии подтвердил патогенетическую связь между В-лимфоцитами и ПК.

Патогенетические механизмы установленной трансформации CD20⁺В-лимфоцитов в CD138⁺ПК при ХЭ остаются малоизученными и не исключают регулируемую роль эндокринной системы и гормонально-зависимой циклической трансформации эндометрия, и требуют дальнейшего изучения.

Мы выдвигаем гипотезу, что хроническое воспаление в эндометрии отличается от воспаления слизистых других гормон-независимых органов преимущественной трансформацией активированных CD20⁺В-лимфоцитов в два типа CD20⁺В-клеток памяти: диффузно-рассеянных с редкой их трансформацией в короткоживущие формы CD138⁺ПК и образованием В-фолликулов с постоянством нарастающего количества долгоживущих форм CD138⁺ПК, синтезирующих иммуноглобулины. Очевидно, последний тип является реализацией гиперчувствительности замедленного типа по типу аутоиммунного воспаления (рис. 4, см. 3-ю стр. обложки).

В основе низкой способности трансформации активированных CD20⁺В-лимфоцитов в CD138⁺ПК при хроническом эндометрите, воз-

можно, заложены эндокринные механизмы регуляции, что требует дальнейшего изучения.

Проведенное исследование позволило установить, что CD20⁺В-лимфоциты в эндометрии являются высокочувствительным и высоко-специфичным информативным биомаркером,

иммуногистохимическое определение которого повысит диагностику ХЭ на ранней стадии его клинического течения, а их количественная оценка может использоваться для объективной диагностики и контроля эффективности лечения заболевания.

Список литературы / References

1. ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. М.: Стандартинформ, 2009. 20 с. [GOST R 53022.3-2008. Laboratory clinical technologies. Requirements for the quality of clinical laboratory research. Part 3. Rules for assessing the clinical informativeness of laboratory tests]. Moscow: Standartinform, 2009. 20 p.
2. Хмельницкий О.К. Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний. СПб.: СОТИС-Мед, 1994. 480 с. [Khmel'nitsky O.K. Pathomorphological diagnostics of gynecological diseases.]. St. Petersburg: SOTIS-Med, 1994. 480 p.
3. Bayer-Garner I.B., Korourian S. Plasma cell in chronic endometritis are easily identified when stained with Syndecan-1. *Mod. Pathol.*, 2001, Vol. 14, pp. 877-879.
4. Benjamin D.J., Berger J., Johannesson M., Nosek B.A., Wagenmakers E.J., Berk R., Bollen K., et al. Redefine Statistical Significance. *PsyArXiv*, 2017.
5. Bouet P.E., el Hachem H., Monceau E., Gariépy G., Kadoch I.J., Sylvestre C. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. *Fertil. Steril.*, 2016, Vol. 105, pp. 106-110.
6. Calame K.L., Lin K.-I., Tunyapline C. Regulatory mechanism that determine the development and function of plasma cells. *Ann. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 21, pp. 205-209.
7. Crum C.P., Egawa K., Fenoglio C.M., Richart R.M. Chronic endometritis: The role of immunohistochemistry in the detection of plasma cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1983, Vol. 147, pp. 812-815.
8. Greenwood S.M., Moran J.J. Chronic endometritis morphologic and clinical observations. *Obstet. Gynecol.*, 1981, Vol. 58, pp. 176-184.
9. Kasius J.C., Fatemi H.M., Bourgain C., Sie-Go D.M., Eijkemans R.J., Fauser B.C., Devroey P., Broekmans F.J. The impact of chronic endometritis on reproductive outcome. *Fertil. Steril.*, 2011, Vol. 96, pp. 1451-1456.
10. Kitaya K.I., Yasuo T. Immunohistochemical and clinicopathological characterization of chronic endometritis. *Am J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 66, pp. 410-415.
11. Xia J., Wishart D.S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinformatics*, 2016, Vol. 55, 14.10.1-14.10.91. doi:10.1002/cpbi.11.

Авторы:

Эллиниди В.Н. — к.м.н., доцент, заведующая патологоанатомическим отделением ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Хромов-Борисов Н.Н. — к.б.н., старший научный сотрудник, научный редактор ФГБУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Феоктистов А.А. — к.м.н., главный врач, клиника «Мать и дитя», Санкт-Петербург, Россия

Лямина А.В. — врач-патологоанатом ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Калинина Н.М. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России; профессор, кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Ellinidi V.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pathology, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Khromov-Borisov N.N., PhD (Biology), Senior Research Associate, Scientific Editor, R. Vreden Research Institute of Traumatology and Orthopaedics, St. Petersburg, Russian Federation

Feoktistov A.A., PhD (Medicine), Chief Physician, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Mother and Child Clinics, St. Petersburg, Russian Federation

Lyamina A.V., Clinical Pathologist, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kalinina N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory Department, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 28.09.2018

Отправлена на доработку 17.10.2018

Принята к печати 19.10.2018

Received 28.09.2018

Revision received 17.10.2018

Accepted 19.10.2018

ВНЕБОЛЬНИЧНАЯ ПНЕВМОНИЯ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ: МИКРОФЛОРА, АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, РОЛЬ В РАЗВИТИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ CD4-ЛИМФОЦИТОВ

Акушева Д.Н.^{1,2}, Хохлова О.Е.^{1,2}, Камшилова В.В.³, Мотова А.И.³,
Перьянова О.В.^{1,2}, Упирова А.А.³, Поткина Н.К.^{1,2}, Ямамото Татсуо⁴

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

² Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия

³ КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

⁴ Международный медицинский образовательно-исследовательский центр (IMERC), Ниигата, Япония

Резюме. Гнойно-воспалительные заболевания различной нозологии и этиологии у ВИЧ-инфицированных являются одной из главных причин их гибели. Целью данной работы явилось определение спектра возбудителей внебольничной пневмонии и профиля их резистентности, зависимости от уровня CD4-лимфоцитов, а также выявление роли метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* и их молекулярно-генетических особенностей у ВИЧ-инфицированных пациентов г. Красноярск. В период 2012-2016 гг. было обследовано 152 ВИЧ-инфицированных пациента пульмонологического отделения с клиническим диагнозом «внебольничная пневмония». От больных забирались мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, плевральная жидкость, промывные воды, гной из плевры, а также мазок из носа и зева на выявление микрофлоры, кровь на стерильность. Использован бактериологический метод. Антибиотикочувствительность определяли диско-диффузионным методом; чувствительность стафилококков проводили методом скрининга, ПЦР, методом серийных разведений в плотной среде в соответствии с международными рекомендациями CLSI, EUCAST. Для генотипирования и определения молекулярно-генетических особенностей — ПЦР, М-ПЦР, секвенирование. Обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы WHONET (ВОЗ). Уровень значимости $p < 0,05$. На протяжении всего периода исследования от ВИЧ-инфицированных пациентов неизменно выделялись дрожжеподобные грибы рода *Candida* (30,4 и 35,6%). Данные микроорганизмы выделялись в монокультуре в этиологически значимом количестве от каждого третьего ВИЧ-инфицированного пациента. При этом они являлись активными ассоциантами, наиболее часто образуя ассоциации с представителями семейства *Enterobacteriaceae*. При этом установили, что наиболее часто грибы рода *Candida* в нижних отделах дыхательных путей выявлялись у ВИЧ-инфицированных с тяжелым иммунодефицитом с уровнем CD4 < 200 клеток/мкл. Также были выделены неферментирующие грамотри-

Адрес для переписки:

Хохлова Ольга Евгеньевна
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 1.
Тел.: 8 (391) 220-13-61.
E-mail: khokhlovaol@mail.ru

Address for correspondence:

Khokhlova Olga E.
Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky
Medical University
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zheleznyak str., 1.
Phone: 7 (391) 220-13-61.
E-mail: khokhlovaol@mail.ru

Образец цитирования:

Д.Н. Акушева, О.Е. Хохлова, В.В. Камшилова, А.И. Мотова, О.В. Перьянова, А.А. Упирова, Н.К. Поткина, Татсуо Ямамото «Внебольничная пневмония у ВИЧ-инфицированных: микрофлора, антибиотикорезистентность, роль в развитии в зависимости от уровня CD4-лимфоцитов» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 457-466. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-457-466
© Акушева Д.Н. и соавт., 2019

For citation:

D.N. Akusheva, O.E. Khokhlova, V.V. Kamshilova, A.I. Motova, O.V. Peryanova, A.A. Upirova, N.K. Potkina, Tatsuo Yamamoto "Community-acquired pneumonia in HIV-infected subjects: microflora, antibiotic resistance: dependence on the levels of CD4 lymphocytes", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 457-466. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-457-466

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-457-466

цательные бактерии (12,9%), стафилококки (8,9%), представители семейства *Enterobacteriaceae* (4,4%). Микроорганизмы характеризовались полирезистентностью к антимикробным препаратам. Клоном MRSA среди ВИЧ-инфицированных являлся ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIA)/coaIV/tst⁺; характеризующийся высоким уровнем вирулентности и мультирезистентностью. Таким образом, установлено, что в развитии внебольничной пневмонии у ВИЧ-инфицированных пациентов играют роль полирезистентные микроорганизмы, в том числе грибы рода *Candida*, грамотрицательные микроорганизмы, MRSA, зачастую в составе микробных ассоциаций. Наиболее часто грибы рода *Candida* выявлялись у ВИЧ-инфицированных с тяжелым иммунодефицитом с уровнем CD4 < 200 клеток/мкл. Высокая частота выделения таких штаммов требует коррекции антимикробной терапии внебольничной пневмонии у ВИЧ-инфицированных.

Ключевые слова: пневмония, ВИЧ-инфицированные, CD4-лимфоциты, микрофлора, антибиотикорезистентность, MRSA, молекулярно-генетические особенности

COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN HIV-INFECTED SUBJECTS: MICROFLORA, ANTIBIOTIC RESISTANCE: DEPENDENCE ON THE LEVELS OF CD4 LYMPHOCYTES

Akusheva D.N.^{a, b}, Khokhlova O.E.^{a, b}, Kamshilova V.V.^c, Motova A.I.^c, Peryanova O.V.^{a, b}, Upirova A.A.^c, Potkina N.K.^{a, b}, Yamamoto Tatsuo^d

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

^b Russian-Japanese Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk, Russian Federation

^c Krasnoyarsk State N.S. Karpovich Emergency Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

^d International Medical Education and Research Center, Niigata, Japan

Abstract. Purulent inflammatory diseases of various types and etiology comprise major causes of death among the HIV-infected individuals. The purpose of this work was to determine a variety of community-acquired pathogens causing pneumonia, their antibiotic resistance profiles, and dependence on the CD4 lymphocyte levels, as well as identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* species and their molecular genetic characteristics in HIV-infected patients from the Krasnoyarsk City. Over the period of 2012 to 2016, we have examined 152 HIV-infected patients at the Clinical Pulmonology Department with a verified diagnosis of community-acquired pneumonia. Sputum specimens, bronchoalveolar lavage, pleural fluid, washings, pleural pus, as well as nasal and pharyngeal smears were studied for microflora, and blood tests for sterility were performed in these patients, by means of bacteriological techniques. Antibiotic sensitivity was determined by the disc diffusion method; drug sensitivity of staphylococci was performed by screening, PCR technique, serial dilution in semi-solid medium, according to the CLSI and EUCAST recommendations. PCR, M-PCR, and gene sequencing were applied for genotyping and determination of their genetic features. The results were processed with WHONET digital program (WHO). The significance level was $p < 0.05$. During the entire study period, the yeast-like fungi of *Candida* genus (30.4 and 35.6%) were consistently isolated from HIV-infected patients. These microorganisms were isolated in a pure cultures at etiologically significant amounts from one-third of the HIV-infected cohort. At the same time, they formed active associations, mostly with *Enterobacteriaceae* family members. At the same time, *Candida* fungi were most frequently detected in the lower respiratory tract of those HIV-infected persons who showed severe immunodeficiency (CD4 cell levels < 200 cells/ μ l). We have also isolated non-fermenting Gram-negative bacteria (12.9%), staphylococci (8.9%), and *Enterobacteriaceae* (4.4%). The microorganisms were characterized by polyresistance to antimicrobial agents. The MRSA clone circulating in the HIV-infected cohort was characterized as ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2 (IIIA)/coaIV/tst⁺ with high virulence and multiresistance levels. Hence, we have found a number of poly-resistant microorganisms playing a role for development of community-acquired pneumonia in HIV-infected patients, i.e., *Candida* spp, Gram-negative microorganisms, MRSA, often presenting a component of microbial associations. *Candida* fungi were detected most often in the HIV-infected individuals with severe immunodeficiency, at the CD4 level of < 200 cells/ μ l. High detection frequency of such microflora requires some modifications of antimicrobial therapy in HIV-infected subjects affected by the community-acquired pneumonia.

Keywords: pneumonia, HIV-infected, CD4 lymphocytes, microflora, antibiotic resistance, MRSA, molecular genetic features

Введение

В Российской Федерации наблюдается рост заболеваемости ВИЧ-инфекцией. Несмотря на предпринимаемые меры профилактики, в том числе массовое скрининговое обследование на ВИЧ, увеличение охвата антиретровирусной терапией широкого круга ВИЧ-инфицированных, эпидемия ВИЧ не снижается [10].

По данным СПИД-центра, в 2018 году эпидемическая ситуация по ВИЧ-инфекции в Красноярском крае продолжает оставаться напряженной. По состоянию на 1 декабря 2018 года кумулятивное количество впервые зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции за весь период наблюдения в крае составило 34 042 человек, из них 3036—с впервые в жизни установленным диагнозом. Показатель заболеваемости в Красноярском крае составил 105,5 на 100 тыс. населения, что аналогично уровню прошлого года.

Отмечается переход ВИЧ-инфекции из маргинальных и социально уязвимых групп населения в общую популяцию.

С увеличением общего числа ВИЧ-инфицированных в популяции возрастает количество ВИЧ-инфицированных пациентов в учреждениях здравоохранения, в том числе в отделениях стационара скорой медицинской помощи. Одна из причин госпитализации ВИЧ-инфицированных — поражение органов дыхания [13]. Риск развития пневмонии у ВИЧ-инфицированных выше в 8 раз по сравнению с ВИЧ-отрицательными пациентами. В структуре летальных исходов от ВИЧ-инфекции 25% занимает пневмония, вызванная грамположительными кокками [3, 5].

Состояние иммунного дефицита способствует колонизации таких пациентов наиболее агрессивными микроорганизмами с выраженной устойчивостью к противомикробным/антифунгеальным препаратам, что требует коррекции антимикробной терапии [6]. Установлено, что MRSA выделяется от ВИЧ-инфицированных чаще, чем от здоровых лиц [8].

Кроме этого, иммунокомпрометированные пациенты наиболее подвержены внутрибольничным инфекциям, что утяжеляет течение болезни. К традиционным внутрибольничным патогенам, таким как *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, можно причислить дрожжевые грибы рода *Candida*, которые представляют известную опасность для данной категории пациентов из-за глубокого угнетения клеточного звена иммунитета [9]. При снижении количества CD4-клеток и при выявлении грибов рода *Candida* в двух и более локусах увеличивается вероятность развития инвазивного кандидоза [2]. Кандидоз выявляется у 70% умерших от ВИЧ-инфекции. При этом характерно увеличение

доли нон-альбикантных видов, более устойчивых к антифунгеальной терапии [1].

Цель — определить спектр возбудителей внебольничной пневмонии и профиль их резистентности, их зависимость от уровня CD4-лимфоцитов, а также выявить роль метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* и их молекулярно-генетических особенностей у ВИЧ-инфицированных пациентов г. Красноярска.

Материалы и методы

В период 2012–2016 гг. на клинической базе КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» г. Красноярска было обследовано 152 ВИЧ-инфицированных пациента пульмонологического отделения с клиническим диагнозом «внебольничная пневмония». В 2012–2014 гг. было обследовано 30 ВИЧ-инфицированных пациентов. В 2015–2016 гг. было обследовано 122 пациента. От больных в первые 48 часов после госпитализации и далее по мере необходимости забирались мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, плевральная жидкость, промывные воды, гной из плевры, а также мазок из носа и зева на выявление микрофлоры. У больных с тяжелым течением внебольничной пневмонии (27 человек) была забрана кровь на стерильность, от каждого больного забирали как минимум 2 пробы и до 6 проб крови (в среднем от каждого пациента 3,3 пробы), исследовано 88 проб крови. Кровь забирали из периферической вены при соблюдении правил асептики в соответствии с рекомендациями. 90 пациентов обследовались однократно, 32 пациента — в динамике заболевания. У определенной доли пациентов наблюдались лихорадка неясного генеза или симптомы сепсиса (2%). У всех обследованных был выраженный иммунодефицит с уровнем CD4 200–349 клеток/мкл или тяжелый иммунодефицит с уровнем CD4 < 15 %. Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, диагноз «внебольничная пневмония», ВИЧ-инфекция. Критерии исключения: туберкулез, сахарный диабет, беременность. Всего было исследовано 118 клинических образцов в 2012–2014 гг. и 187 образцов — в 2015–2016 гг. Изоляты, выделенные от одного пациента и имеющие одинаковый профиль резистентности, из исследования исключались.

Для оценки качества взятия материала мокроту микроскопировали, далее гомогенизировали с бусами 1 мл мокроты и 9 мл мясопептонного бульона в течение 20 мин, готовили последовательные десятикратные разведения и засевали по 0,1 мл из исходного разведения 1:10 на колумбийский агар с добавлением 5% крови (Хай-Медиа, Индия), желточно-солевой агар, среды Эндо и Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, пгт Оболенск); из разведений мокроты 10⁻⁴ и 10⁻⁶ засевали на чашки с колумбийским агаром с добавлением 5% крови (Хай-Медиа, Индия). Бронхоальвео-

лярное содержимое засеивали методом секторных посевов (по Gould) калибровочной петлей. Идентификацию исследуемых культур проводили на основании морфо-тинкториальных, культуральных и биохимических свойств, используя, помимо рутинных методов, тест-системы Remel (США), Bio Merieux (Франция) для идентификации микроорганизмов. Недостатком в нашей работе явилось отсутствие выявления прихотливых микроорганизмов, таких как *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *H. influenza*.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона с использованием дисков OXOID (Великобритания); чувствительность стафилококков к оксациллину (Sigma-Aldrich, США), цефокситину OXOID (Великобритания) проводили методом скрининга; чувствительность стафилококков к другим антимикробным препаратам проводили методом серийных разведений в соответствии с международными рекомендациями CLSI, EUCAST. Продукцию бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у энтеробактерий определяли фенотипически: методом «двойных дисков», при котором продукция определяется за счет синергизма цефалоспоринов (цефотаксим, цефтазидим, цефепим) с клавулановой кислотой на среде Muller–Hinton с использованием дисков с антибиотиками OXOID (Великобритания) [7, 11]. Продукцию металло-β-лактамаз (МБЛ) проводили методом инактивации карбапенемов (CIM) [15]. Для внутрилабораторного контроля определения антибиотикочувствительности и метициллино-резистентности использовали референс-штаммы из коллекции ATCC (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853).

Для генетических исследований MRSA микроорганизмы культивировали в бульоне LB (Difco, Detroit, MI) при температуре 37 °C до фазы логарифмического роста.

Исследовали гены *nuc* и *tesA* с помощью ПЦР для определения принадлежности к MRSA. Исследовали 42 гена патогенности (ПЦР): 2 лейкоцидина; 4 гемолизина; 19 генов стафилококковых энтеротоксинов (SE): *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *seu*; 3 эксфолиатина; *set*, *edin*, *ssl*; 14 генов адгезии [14]. Детекцию продуктов амплификации ПЦР проводили электрофорезом в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием. Использовали 100 bp DNA ladder (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo).

Молекулярное типирование штаммов MRSA проводили в соответствии с международными стандартами [12]. MLST типирование основано на изучении семи «генов домашнего хозяйства» и определения аллельного профиля (аллельный номер) с использованием вебсайта (<http://www.mlst.net/>). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения eBURST.

SCCmec типирование (I-V типы) – с применением ПЦР, М-ПЦР. Субтипирование SCCmec проводили в соответствии с рекомендациями (<http://www.staphylococcus.net/>).

Обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы WHONET (ВОЗ). Качественные признаки представлялись в виде долей (%) и абсолютных чисел. В сравнительном анализе использовался двусторонний критерий Фишера. Уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты

В 2012–2014 гг. при посеве мокроты был получен рост микроорганизмов от 23 пациентов из 30 (73,3%) (рис. 1). Всего было выделено 24 штамма – от 22 пациентов получены монокультуры (95,5% случаев), от 1 пациента была выделена ассоциация микроорганизмов (4,5% случаев). Среди монокультур доминировали дрожжеподобные грибы рода *Candida* (30,4% случаев) и бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (30,4%), представленные в основном *K. pneumoniae* (17,4%). На втором месте по частоте встречаемости у ВИЧ-инфицированных пациентов – грамположительные микроорганизмы, которые были выделены в 26,1% случаев, при этом *S. aureus* выделен в 8,7% случаев (2 из 23 штаммов), *S. epidermidis* – также в 8,7% случаев (2 штамма). На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 13,1% (рис. 2).

Из крови ВИЧ-инфицированных пациентов при тяжелом течении пневмонии выделялся преимущественно *S. aureus* (3 штамма из 4), при этом один из штаммов являлся MRSA. 1 штамм, выделенный из крови, был представлен *E. coli*. У 2 пациентов при дальнейших исследованиях из крови были выделены MRSA и *C. albicans*.

В 2015–2016 гг. при посеве клинического материала от ВИЧ-инфицированных пациентов рост был получен в 72,2% случаев (135 образцов из 187), при этом монокультуры были выделены из 86 образцов (63,7%), ассоциации – из 49 образцов (36,3%). Значительную долю среди микроорганизмов, выделяемых из мокроты ВИЧ-инфицированных в монокультуре, составили дрожжевые грибы рода *Candida* – 35,6% случаев (48 штаммов) (рис. 3). На втором месте – неферментирующие грамотрицательные бактерии (12,9% – 16 штаммов), за ними следовали грамположительные микроорганизмы – стафилококки (8,9% – 12 штаммов) – и представители семейства *Enterobacteriaceae* (4,4% – 6 штаммов). По 1,5% приходилось на энтерококки и бета-гемолитический стрептококк группы А (по 2 штамма соответственно). Частота выделения *C. albicans* среди всех дрожжевых грибов рода *Candida* составила 97,9%, non-albicans видов – 2,1%. Среди неферментирующих грамотрицательных бактерий основную долю составила

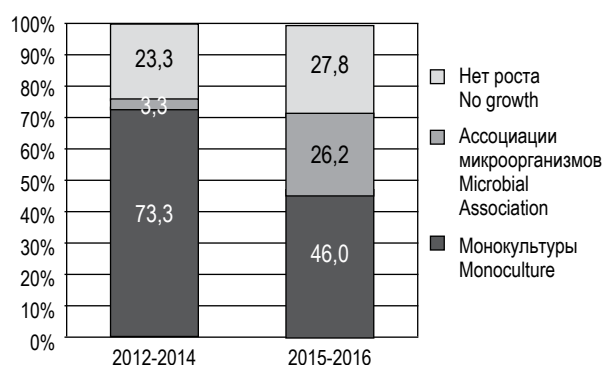


Рисунок 1. Структура микроорганизмов, выделенных от ВИЧ-инфицированных больных в 2012-2016 гг. (%)

Figure 1. The structure of microorganisms, isolated from HIV-infected in 2012-2016 (%)

P. aeruginosa. Синегнойная палочка представляла 75,0% (12 штаммов) всех НГОБ, выделенных в монокультуре. Значительна роль и *A. baumannii* — 25,0% (4 штамма). На третьем месте по частоте выделения в монокультуре — бактерии рода *Staphylococcus* (8,9%). Преимущественно от ВИЧ-инфицированных пациентов выделялся *S. aureus* (73,0%). На долю *S. epidermidis* приходилось 23,0%. Семейство *Enterobacteriaceae* было представлено *K. pneumoniae* — 83,3% и *P. mirabilis* — 16,7% (5 и 1 штамм соответственно). *E. coli* встречалась только в ассоциациях.

Характерна в 2015-2016 гг. для ВИЧ-инфицированных большая доля выделяемых ассоциаций (26,2% от общего числа исследуемых образцов, 36,3% от числа выделенных микроорганизмов). Были выделены двух-, трех- и четырехкомпонентные ассоциации. Наиболее часто в ассоциациях участвовали грибы рода *Candida* (17% от общего количества образцов), энтеробактерии (16%) и стафилококки (15%). Наименее активные ассоцианты — НГОБы (6%) и энтерокки (2%) (рис. 4).

Грибы рода *Candida* преимущественно выделялись в ассоциациях с энтеробактериями (10% от общего числа образцов) и стафилококками (6%). 3% от общего числа образцов приходилось на ассоциации НГОБ и энтеробактерий, 2% — ассоциации энтеробактерий и стафилококков. Трех- и четырехкомпонентные ассоциации составляли разнообразные сочетания микроорганизмов при обязательном присутствии грибов рода *Candida*.

При исследовании микрофлоры ВИЧ-инфицированных в динамике заболевания отмечалась смена возбудителя на более устойчивые виды и формирование ассоциаций. Так, отмечалась замена *C. albicans* на нон-альбикантные виды, более устойчивые к противогрибковым

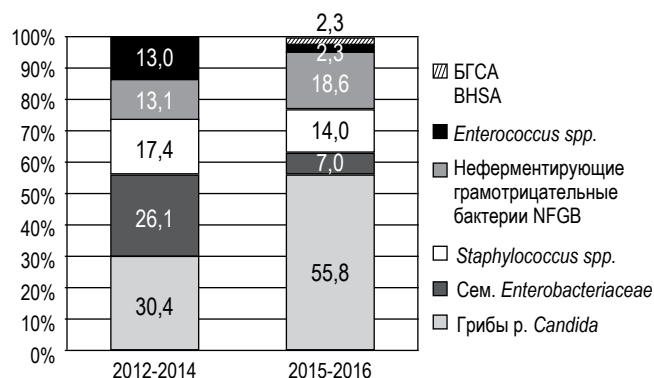


Рисунок 2. Структура микроорганизмов, выделенных в монокультуре от ВИЧ-инфицированных в 2012-2014 гг. (%)

Figure 2. The structure of microorganisms, isolated in monoculture from HIV-infected in 2012-2014 (%)

препаратам — *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, которые наиболее часто встречались в ассоциациях микроорганизмов.

В 2012-2014 гг. представители семейства *Enterobacteriaceae*, выделенные от ВИЧ-инфицированных пациентов, проявляли резистентность к цефтазидиму и ампициллину/сульбактаму в 100% случаев; к цефоперазону/сульбактаму и амикацину — в 14,3% случаев; устойчивость к ципрофлоксацину была выявлена у 57,1% штаммов; все выделенные штаммы обладали чувствительностью к карбапенемам.

Штаммы *A. baumannii*, изолированные от ВИЧ-инфицированных в 2012-2014 гг., демонстрировали 100% резистентность к изученным антибактериальным препаратам, в том числе карбапенемам.

Доля MRSA варьировала в зависимости от типа клинического материала (50% MRSA были выделены из мокроты, 33% — из крови). Доля MRSE среди всех *S. epidermidis*, выделенных из мокроты, составила 50% (1 штамм).

В 2015-2016 гг. штаммы *A. baumannii*, выделенные от ВИЧ-инфицированных пациентов, характеризовались резистентностью к амикацину в 77,5% случаев (7 штаммов из 9), к ципрофлоксацину — в 88,9% случаев (8 штаммов из 9), к ампициллину/сульбактаму — в 25% случаев (2 штамма из 9), к имипенему и меропенему — в 55,6 и 62,7% случаев (5 и 6 штаммов из 9 соответственно). Выделенные штаммы обладали 100% чувствительностью к цефоперазону/сульбактаму (рис. 5).

Штаммы *P. aeruginosa* проявили резистентность к амикацину в 84,6% случаев, ципрофлоксацину — в 92,3% (12 штаммов из 13). Такое же количество штаммов были резистентны к имипенему и меропенему. 38,5% штаммов обладали резистентностью к цефоперазону/суль-

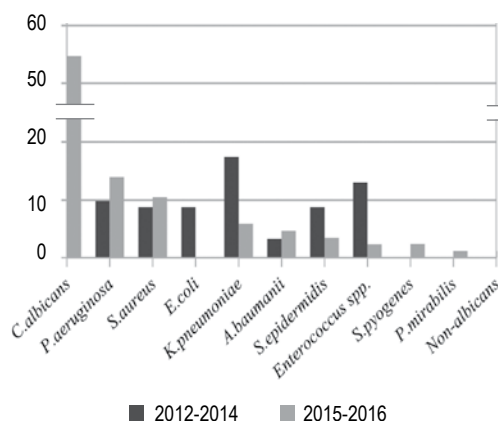


Рисунок 3. Видовой состав микрофлоры, выделенной в монокультуре от ВИЧ-инфицированных (%)

Figure 3. The microflora, isolated in monoculture from HIV-infected (%)

бактерию. Металлобеталактамазы продуцировали 23,1% выделенных штаммов *P. aeruginosa* (3 штамма).

Штаммы *K. pneumoniae* обладали резистентностью к амикацину в 22,2% случаев, цефтазидиму — 63,0%, ципрофлоксацину — 80,8%, ампициллину/сульбактаму — 65,4% случаев. 77,8% штаммов *K. pneumoniae* являлись продуцентами БЛРС, при этом 100% штаммов оказались чувствительными к цефоперазону/сульбактаму. Резистентность к имипенему и меропенему проявил один штамм, что составило 3,7% (рис. 6).

Штаммы *E. coli* были резистентны к ципрофлоксацину в 60% случаев, резистентны к ампициллину/сульбактаму и амикацину в 40% случаев, к меропенему и цефтазидиму — в 20% случаев. Все штаммы были чувствительными к имипенему и цефоперазону/сульбактаму. 60% выделенных штаммов являлись продуцентами БЛРС.

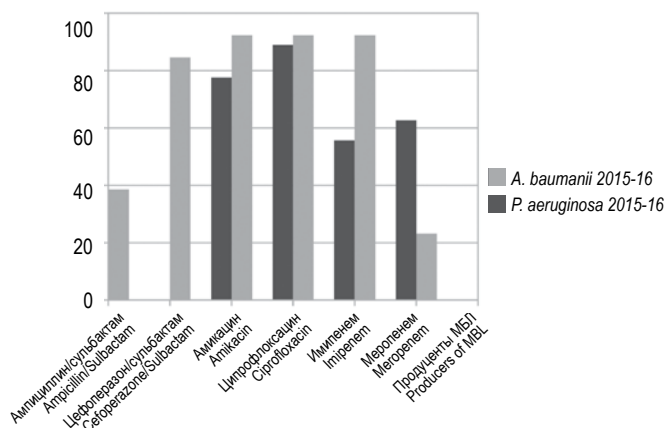


Рисунок 5. Резистентность неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в 2015-2016 гг. (%)

Figure 5. The antibiotics resistance of non-fermentative gram-negative bacteria, isolated from HIV-infected in 2015-2016 (%)

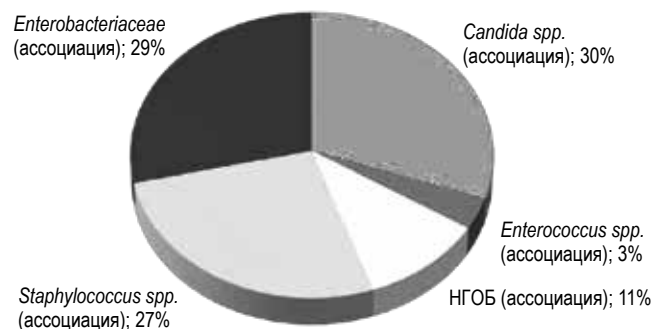


Рисунок 4. Участие микроорганизмов в формировании ассоциаций (%)

Figure 4. Participation of microorganisms in the formation of associations (%)

P. mirabilis в 50% случаев был резистентен к ципрофлоксацину и ампициллину/сульбактаму. Штаммов, устойчивых к амикацину, цефтазидиму, имипенему, меропенему, не обнаружено. Все штаммы являлись БЛРС-отрицательными.

Частота встречаемости метициллинрезистентных штаммов стафилококка составила 25% для MRSA (2 штамма) и 67% для MRSE (2 штамма).

У обследованных ВИЧ-инфицированных была также изучена микрофлора верхних дыхательных путей — зева и носа. Установили в 50% случаев идентичный видовой состав микроорганизмов в мазках из зева, носа и из мокроты, как в ассоциациях, так и в виде моноинфекции. Из мазков зева и носа выделяли такие микроорганизмы, как *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa* и др. Различный видовой спектр микроорганизмов как грибковой, так и бактериальной этио-

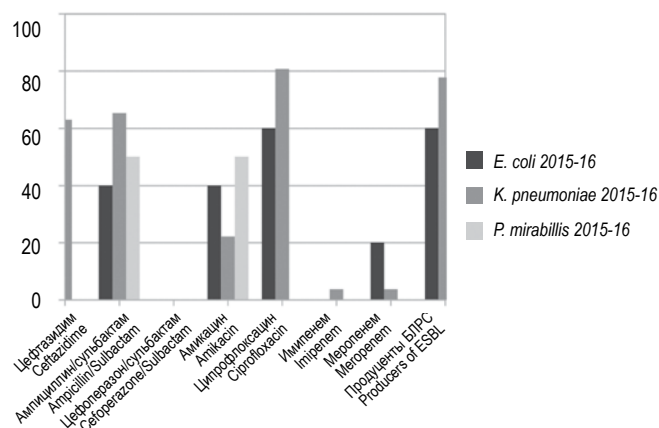


Рисунок 6. Резистентность представителей семейства Enterobacteriaceae, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в 2015-2016 гг. (%)

Figure 6. The antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae*, isolated from HIV-infected in 2015-2016 (%)

логии в указанных материалах выявлялся в 50% случаев.

Проведено генотипирование 4 штаммов MRSA, в том числе 1 штамма из воздушно-носных путей, 1 штамма из крови (были выделены в 2012-2014 гг.) и 2 штаммов из воздушно-носных путей (выделены в 2015-2016 гг.). Все выделенные штаммы MRSA были PVL-негативными, отнесены к генотипу ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(III A)/coaIV (ST239_{Kras}), характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизина, токсина синдрома токсического шока TSST-1 (*tst*), энтеротоксинов SEK (*sek*), SEQ (*seq*), адгезинов (за исключением *bbp*) (табл. 1). Характеризовались антибиотикорезистентностью к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, хлорамфениколу, рифампицину (МПК > 128 мкг/мл), сульфаметоксазол/триметоприму и чувствительностью к гликопептидам (ванкомицин, МПК = 0,5 мкг/мл), линезолиду, мупироцину, фузидиевой кислоте. В 2015-2016 гг. установлено, что штаммы MRSA относились к hVISA, так как уровень МПК для ванкомицина уже составил 2 мкг/мл. При этом все выделенные штаммы данного генотипа, вероятно, относились к госпитальным, так как были выделены от пациентов позднее 48 часов пребывания в стационаре.

Обсуждение

На протяжении всего периода исследования от ВИЧ-инфицированных пациентов неизменно выделялись дрожжеподобные грибы рода *Candida* (30,4 и 35,6%). Данные микроорганизмы выделялись в монокультуре в этиологически значимом количестве от каждого третьего ВИЧ-инфицированного пациента. При этом они являлись активными ассоциантами, наиболее часто образуя ассоциации с представителями семейства *Enterobacteriaceae*. При этом установили, что наиболее часто грибы рода *Candida* в нижних отделах дыхательных путей выявлялись у ВИЧ-инфицированных с тяжелым иммунодефицитом с уровнем CD4 < 200 клеток/мкл. Ранее было показано, что *C. albicans* потенцирует рост *K. pneumoniae*. В 2015-2016 гг. *K. pneumoniae* выделялся чаще в ассоциации с *C. albicans*, чем в монокультуре. При этом у таких пациентов не было выделено *S. pneumoniae*. Таким образом, у ВИЧ-инфицированных с внебольничной пневмонией грибы рода *Candida* в 2015 г. были выявлены у 63% пациентов, в 2016 г. — у 64%. Отмечен высокий уровень встречаемости грибов рода *Candida* в верхних отделах дыхательных путей у ВИЧ-инфицированных в 2015-2016 гг. (68,75%). Различный видовой спектр грибов рода *Candida* в верхних и нижних отделах дыхательных путей установлен в 18,75% случаев. Идентичный видовой спектр грибов рода *Candida* в верхних и нижних отделах дыхательных путей установлен лишь

ТАБЛИЦА 1. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ MRSA, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ В 2012-2016 гг.

TABLE 1. THE MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF MRSA, ISOLATED FROM HIV-INFECTED WITH COMMUNITY PNEUMONIA IN 2012-2016

Определяемые характеристики Characteristics	Результаты типирования штаммов MRSA Results of typing of MRSA n = 4
CC	239
ST	239
spa	3 (t037)
SCCmec	III.1.1.2 (III A)
agr	1
coa	IV
Токсины: Toxins:	
Лейкоцидины Leucocidins	
lukPVSF	-
lukE-lukD	+
lukM	-
Гемолизины Hemolysins	
hla, hlg, hlg-v	+
hly (split)	(+)
Пептидные цитоллизины Peptide cytotoxins	
psma, hld	+
Энтеротоксины Enterotoxins	
sea	-
tst	+
sec, sep, seb, sed, see, seh, set, sel	-
Sap15 (sek, seq)	+
sej, seu, egc*	-
Эксфолиатины Exfoliatins	
eta, etb, etd	-
Адгезины Adhesins	
c12ag'	+
cna	+
bbp	-

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Определяемые характеристики Characteristics	Результаты типирования штаммов MRSA Results of typing of MRSA n = 4
Другие Others	
ACME (<i>arcA</i>)	-
<i>ssl</i>	+
<i>edin</i>	-
Антибиотикорезистентность Resistance to antibiotics	
Имипенем (МПК, мкг/мл) Imipenem (MIC, mcg/ml)	32-64
Оксациллин (МПК, мкг/мл) Oxacillin (MIC, mcg/ml)	> 128
Ампициллин (МПК, мкг/мл) Ampicillin (MIC, mcg/ml)	32-64
Аминогликозиды Aminoglycosides	100%
Тетрациклины Tetracyclines	100%
Макролиды Macrolides	100%
Линкозамиды Lincosamides	100%
Фторхинолоны Fluoroquinolones	100%
Рифампицин (МПК, мкг/мл) Rifampin (MIC, mcg/ml)	100% > 128
Хлорамфеникол Chloramphenicol	100%
Сульфаметоксазол/Тримето- прим Sulfamethoxazole/Trimetoprim	100%
Гликопептиды Glycopeptides	0%
Ванкомицин (МПК, мкг/мл) Vancomycin (MIC, mcg/ml)	0,5-2
Оксазолидиноны Oxazolidinones	0%
Мупироцин Mupirocin	0%

Примечание. *egc** – кластер генов *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, кодирующих синтез энтеротоксинов, *c12ag'* – кластер генов *icaA*, *icaD*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *clfA*, *clfB*, *fib*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, кодирующих синтез адгезинов.

Note. *egc**, the cluster of genes, encoded of enterotoxins *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*; *c12ag'*, the cluster of genes, encoded of adhesins *icaA*, *icaD*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *clfA*, *clfB*, *fib*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*.

в 12,5% случаев. Такая высокая доля грибов рода *Candida* в этиологической структуре внебольничной пневмонии у ВИЧ-инфицированных может быть связана с тяжелым иммунодефицитом. В 12,5% случаев не исключена контаминация материала, забираемого из нижних отделов дыхательных путей грибами рода *Candida*, штаммами микроорганизмов, обитающих в ротовой полости, хотя качество забранной мокроты соответствовало стандарту. Несмотря на контроль качества забираемого материала из нижних отделов дыхательных путей, полностью предотвратить попадание грибов рода *Candida* из содержимого ротовой полости в мокроту не представляется возможным. С другой стороны, совпадение микробного пейзажа в верхних и нижних отделах дыхательных путей может говорить об эндогенном происхождении инфекции. В период 2015-2016 гг. возросло количество ассоциаций. Преимущественно ассоциации выявлялись при повторных обследованиях в динамике заболевания.

Резистентность микроорганизмов, выделенных от ВИЧ-положительных пациентов, выше по сравнению с результатами многоцентровых исследований, представленных на платформе AMRmap [4]. Такой высокий уровень резистентности к антимикробным препаратам среди штаммов, выделенных от ВИЧ-инфицированных, можно объяснить неоднократными госпитализациями такого рода пациентов. При лечении внебольничной пневмонии ВИЧ-инфицированных пациентов включают несколько антибактериальных препаратов, в том числе ко-тримоксазол, вследствие высокого риска развития пневмоцистной пневмонии. ВИЧ-инфицированным пациентам, поступившим с диагнозом «внебольничная пневмония», помимо антибактериальных препаратов, в комплексное лечение обязательно включают противогрибковый препарат флуконазол. Также высокий уровень резистентности штаммов, выделенных позднее 48 часов пребывания в стационаре, возможно, связан с госпитализацией больных в пульмонологическое отделение, где одновременно находятся на стационарном лечении пациенты, ранее госпитализированные в отделение реанимации и интенсивной терапии, и существует риск циркуляции госпитальной флоры.

Установлено, что на протяжении 2012-2016 гг. среди ВИЧ-инфицированных с внебольничной пневмонией циркулировали представители одного генетического варианта MRSA ST239_{Kras}, который широко распространен на территории г. Красноярск, Красноярского края и циркулирует в условиях различных стационаров. При этом представители данного генетического варианта MRSA характеризовались устойчивостью к одинаковому спектру антимикробных препаратов. Наличие у данных штаммов MRSA набора генов, кодирующих токсинообразование, в част-

ности гена *tst*, определяет тяжесть течения инфекционного процесса.

Таким образом, установлено, что в развитии внебольничной пневмонии у ВИЧ-инфицированных пациентов играют роль полирезистентные микроорганизмы, в том числе грибы рода *Candida*, грамотрицательные микроорганизмы, MRSA, зачастую в составе микроб-

ных ассоциаций. Наиболее часто грибы рода *Candida* выявлялись у ВИЧ-инфицированных с тяжелым иммунодефицитом с уровнем CD4 < 200 клеток/мкл. Высокая частота выделения таких штаммов требует коррекции анти-микробной терапии внебольничной пневмонии у ВИЧ-инфицированных.

Список литературы / References

1. Буркина Е.С., Шахова Т.С., Михайлова Н.Р. Структура летальных исходов и частота встречаемости оппортунистических заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией г. Оренбурга // Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области, 2017. Т. 4, № 19. С. 18-20. [Burkina E.S., Shakhova T.S., Mikhaylova N.R. The structure of deaths and the incidence of opportunistic diseases in patients with hiv infection in the city of Orenburg. *Vestnik soveta molodykh uchionykh i spetsialistov Chelyabinskoy oblasti* = *Bulletin of the Council of Young Scientists and Specialists of the Chelyabinsk Region*, 2017, Vol. 4, no. 19, pp. 18-20. (In Russ.)]
2. Гяургиева О.Х. Кандидоз кожи при ВИЧ-инфекции // Успехи современной науки и образования, 2016. Т. 3, № 1. С. 20-22. [Gyaurgieva O.Kh. Candidiasis of skin with hiv infection. *Uspekhi sovremennoy nauki i obrazovaniya* = *Modern Science Success*, 2016, Vol. 3, no. 1, pp. 20-22. (In Russ.)]
3. Долгова О.Б., Соколова С.Л., Корешников А.В. Вторичные инфекционные заболевания при ВИЧ-инфекции в стадии СПИД // MEDICUS, 2016. Т. 6, № 12. С. 86-89. [Dolgova O.B., Sokolova S.L., Koreshnikov A.V. Postprimary contagious diseases at hiv infection of aids stage. *MEDICUS*, 2016, Vol. 6, no. 12, pp. 86-89. (In Russ.)]
4. Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2017. Т. 19, № 2. С. 84-90. [Kuzmenkov A.Yu., Trushin I.V., Avramenko A.A., Eidelstein M.V., Dekhnich A.V., Kozlov R.S. AMRmap: an online platform for monitoring antibiotic resistance. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 84-90. (In Russ.)]
5. Николенько В.В., Воробьева Н.Н., Николенько А.В., Окишев М.А. Клинические особенности течения внебольничных пневмоний, вызванных *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, у ВИЧ-инфицированных пациентов // Пермский медицинский журнал, 2016. Т. 33, № 5. С. 9-14. [Nikolenko V.V., Vorobyova N.N., Nikolenko A.V., Okishev M.A. Clinical peculiarities of community-acquired pneumonia course induced by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patients. *Permskiy meditsinskiy zhurnal* = *Perm Medical Journal*, 2016, Vol. 33, no. 5, pp. 9-14. (In Russ.)]
6. Солонин С.А., Шахова О.Б., Белова М.В., Годков М.А. Нозологическая и возрастно-половая структура ВИЧ-инфицированных пациентов, поступающих в стационар скорой медицинской помощи // Архивъ внутренней медицины, 2018. Т. 8, № 3. С. 194-203. [Solonin S.A., Shakhova O.B., Belova M.V., Godkov M.A. Medical conditions, age and sex structure of patients infected with HIV at emergency hospital. *Arkhiv vnutrenney meditsiny* = *Russian Archives of Internal Medicine*, 2018, Vol. 8, no. 3, pp. 194-203. (In Russ.)]
7. Фенотипическое определение *Enterobacter* – продуцентов β-лактамаз расширенного спектра: обзор и руководство по проведению испытаний. Европейское общество клинической микробиологии и инфекционных болезней // Клиническая микробиология и инфекционные заболевания, 2008. Т. 14. С. 90-103. [Phenotypic determination of *Enterobacter* – producers of extended-spectrum β-lactamases: a review and a test guide. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i infeksionnyye zabolovaniya* = *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2008, Vol. 14, pp. 90-103. (In Russ.)]
8. Хохлова О.Е., Акушева Д.Н., Перьянова О.В., Корецкая Н.М., Абарникова О.В., Королькова Е.К., Белоусова Ю.Н., Саламатина О.В., Безручкина Т.Н., Князева К.М., Шогжал И.С., Поткина Н.К., Элярт В.Ф., Ямамото Т. Молекулярно-генетические особенности метициллинрезистентных *S. aureus*, выделенных от лиц пенитенциарной системы, инфицированных ВИЧ // Сибирское медицинское обозрение, 2018. № 2. С. 13-18. [Khokhlova O.E., Akusheva D.N., Peryanova O.V., Koretskaya N.M., Abarnikova O.V., Korolkova E.K., Belousova Yu.N., Salamatina O.V., Bezruchkina T.N., Knyazeva K.M., Shogzhal I.S., Potkina N.K., Elyarte V.F., Yamamoto T. Molecular-genetic features of methicillin-resistant *S. aureus*, have got from the persons of the penitentiary system, infected with HIV. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie* = *Siberian Medical Review*, 2018, no. 2, pp. 13-18. (In Russ.)]
9. Чарушина И.П., Фельдблюм И.В., Баландина С.Ю., Александрова Г.А., Смирнова Л.Н., Маркович Н.И. Сравнительная оценка обсемененности грибами *Candida albicans* пациентов и объектов больницы среды стационара для ВИЧ-инфицированных при регистрации случаев инвазивного кандидоза и в благополучный период // Профилактическая и клиническая медицина, 2017. Т. 1, № 62. С. 5-11. [Charushina I.P., Feldbljum I.V., Balandina S.Ju., Aleksandrova G.A., Smirnova L.N., Markovich N.I. Comparison of micromycetes *Candida albicans* contamination in patients and medical items in the hospital for hiv-infected patients with invasive candidiasis and in a welfare period. *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina* = *Preventive and Clinical Medicine*, 2017, Vol. 1, no. 62, pp. 5-11. (In Russ.)]
10. Шабунцова А.А., Калачикова О.Н., Короленко А.В. Обзор мировых и региональных тенденций заболеваемости ВИЧ-инфекцией и обусловленной ей смертности // Социальные аспекты здоровья населения, 2017. Т. 54, № 2. С. 9-13. [Shabunova A.A., Kalachikova O.N., Korolenko A.V. Review of global and regional trends

in HIV morbidity and mortality. *Sotsialnye aspekty zdorovya naseleniya = Social Aspects of Public Health*, 2017, Vol. 54, no. 2, pp. 9-15. (In Russ.)]

11. Drieux L., Brossier F., Sougakoff W., et al. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, Vol. 14, pp. 90-103.

12. International working group on the classification of staphylococcal cassette chromosome elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Agents Chemother.*, 2009, Vol. 53, pp. 4961-4967.

13. Mkoko P., Raine R.I. HIV-positive patients in the intensive care unit: A retrospective audit. *S. Afr. Med. J.*, 2017, Vol. 107, no. 10, pp. 877-771.

14. Takano T., Hung W.C., Shibuya M., Higuchi W., Iwao Y., Nishiyama A., Reva I., Khokhlova O.E., Yabe S., Ozaki K., Takano M., Yamamoto T. A new local variant (ST764) of the globally disseminated ST5 lineage of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the virulence determinants of community-associated MRSA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, Vol. 57, no. 4, pp. 1589-1595.

15. van der Zwaluw K., de Haan A., Pluister G.N., Bootsma H.J., de Neeling A.J., Schouls L.M. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 3, pp. 1-12.

Авторы:

Акушева Д.Н. — преподаватель кафедры микробиологии им. доцента Б.М. Зельмановича ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия

Хохлова О.Е. — к.б.н., доцент, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия

Камшилова В.В. — к.б.н., КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

Мотова А.И. — врач, КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

Перьянова О.В. — к.б.н., заведующая кафедрой, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия

Упирова А.А. — заведующая отделением КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

Поткина Н.К. — научный сотрудник ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия

Ямамото Татсуо — к.м.н., профессор, директор, Международный медицинский образовательно-исследовательский центр (IMERC) Ниигата, Япония

Authors:

Akusheva D.N., Lecturer, B.M. Zelmanovich Department of Microbiology, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University; Russian-Japanese Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk, Russian Federation

Khokhlova O.E., PhD (Biology), Associate Professor, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University; Russian-Japanese Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kamshilova V.V., PhD (Biology), Krasnoyarsk State N.S. Karpovich Emergency Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

Motova A.I., Doctor, Krasnoyarsk State N.S. Karpovich Emergency Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

Perianova O.V., PhD (Biology), Head of the Department, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University; Russian-Japanese Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk, Russian Federation

Upirova A.A., Head of the Department. Krasnoyarsk State N.S. Karpovich Emergency Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

Potkina N.K., Research Associate, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University; Russian-Japanese Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk, Russian Federation

Yamamoto Tatsuo, PhD (Medicine), Professor, Director, International Medical Education and Research Center, Niigata, Japan

Поступила 31.12.2018

Отправлена на доработку 04.01.2019

Принята к печати 04.03.2019

Received 31.12.2018

Revision received 04.01.2019

Accepted 04.03.2019

ЭКСПРЕССИЯ CD39 РЕГУЛЯТОРНЫМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ И ОСТРОМ САРКОИДОЗЕ

Кудрявцев И.В.^{1,2}, Лазарева Н.М.¹, Баранова О.П.¹, Головкин А.С.³,
Исаков Д.В.^{1,2}, Серебрякова М.К.², Сесь Т.П.¹, Илькович М.М.¹,
Тотолян Арег А.^{1,4}

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

⁴ ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Саркоидоз — заболевание неустановленной этиологии, характеризующееся развитием эпителиоидно-клеточных гранул без некроза в различных органах. В настоящее время выделяют два основных клинических варианта дебюта саркоидоза: вариант острого/подострого течения саркоидоза (ОС, или синдром Лёфгрена) с более благоприятным прогнозом, а также хроническая форма течения саркоидоза (ХС, или «не Лёфгрена-синдром») с высоким (около 20%) риском развития фиброза легких. Целью данного исследования было изучение фенотипических характеристик регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) периферической крови больных с острым (n = 11) и хроническим (n = 46) дебютом саркоидоза, контролем служили образцы периферической крови, полученные от 26 условно здоровых добровольцев. С использованием многоцветной проточной цитометрии было показано, что при ОС уровень Т-клеток снижается относительно группы контроля, а при ХС уменьшается уровень CD3⁺CD4⁺ клеток при сравнении с контролем. Более того, при ХС как относительное, так абсолютное содержание Treg в периферической крови достоверно ниже значений контрольной группы (2,83% (2,47; 3,36) против 3,33% (2,79; 3,84) при p = 0,021 и 37 кл/мкл (29; 52) против 50 кл/мкл (42; 65) при p = 0,004 соответственно). Относительное содержание CD39-позитивных клеток в рамках общей популяции Treg возрастает с 39,52% (11,55; 46,34) как при хроническом (до 51,02% (38,20; 61,62), p < 0,001), так и при остром (до 48,64% (41,46; 63,72), p = 0,007) дебюте саркоидоза. Анализ экспрессии CD39 и CD73 основными субпопуляциями Treg не выявил достоверных различий по относительному содержанию позитивных клеток между всеми группами в рамках «наивных» CD45R0⁺CD62L⁺ клеток. Вместе с тем уровень CD39⁺ клеток среди CD45R0⁺CD62L⁺Treg у больных как ОС, так и ХС достоверно (p < 0,001 и p = 0,004 соответственно) превышал контрольные значения (69,66% (61,92; 79,34) и 67,62% (61,92; 79,34), соответственно, против 47,55% (15,74; 65,32)). В случае CD45R0⁺CD62L⁺Treg, способных покидать кровотоки и мигрировать в очаги воспаления, увеличение относительного содержания CD39-позитивных Treg было отмечено лишь при сравнении ХС и группы контроля (61,79% (55,12; 73,09) и 57,27% (16,03; 66,98) соответственно, при p = 0,006). Получен-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Кудрявцев, Н.М. Лазарева, О.П. Баранова,
А.С. Головкин, Д.В. Исаков, М.К. Серебрякова,
Т.П. Сесь, М.М. Илькович, Арег А. Тотолян
«Экспрессия CD39 регуляторными Т-лимфоцитами
при хроническом и остром саркоидозе» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 467-478.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-467-478
© Кудрявцев И.В. и соавт., 2019

For citation:

I.V. Kudryavtsev, N.M. Lazareva, O.P. Baranova,
A.S. Golovkin, D.V. Isakov, M.K. Serebriakova, T.P. Ses',
M.M. Ilkovich, Areg A. Totolian "CD39⁺ expression by
regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis and Lofgren's
syndrome", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 467-478.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-467-478
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-467-478

ные нами результаты указывают, что при саркоидозе в циркуляции увеличивается уровень CD39⁺Treg, способных эффективно подавлять иммунные реакции за счет утилизации провоспалительного АТФ и инициации каскада реакций, приводящих к формированию противоспалительного аденозина.

Ключевые слова: саркоидоз, регуляторные Т-лимфоциты, экспрессия CD39, проточная цитометрия, многоцветный анализ

CD39⁺ EXPRESSION BY REGULATORY T CELLS IN PULMONARY SARCOIDOSIS AND LOFGREN'S SYNDROME

Kudryavtsev I.V.^{a, b}, Lazareva N.M.^a, Baranova O.P.^a, Golovkin A.S.^c, Isakov D.V.^{a, b}, Serebriakova M.K.^b, Ses' T.P.^a, Ilkovich M.M.^a, Totolian Areg A.^{a, d}

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

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

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

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

Abstract. Sarcoidosis is a disorder of unknown etiology characterized by development of necrosis-free epithelioid cell granulomas in various tissues. There are two main phenotypes of pulmonary sarcoidosis (PS): Lofgren's syndrome (LS) is an acute form with favorable outcome, while non-Lofgren's syndrome (nLS) is a chronic type of disease that can lead to pulmonary fibrosis in 20% of cases.

Our study was aimed at investigating changes in the main cell-surface differentiation antigens on peripheral blood regulatory T cells (Tregs) from the patients with first diagnosed PS without treatment (LS, n = 11) and nLS (n = 46) compared to healthy volunteers (HC, n = 26).

These indexes might be used as immunological markers for predicting severity of this disorder. Flow cytometry analysis of peripheral blood cell samples demonstrated that the nLS patients had decreased relative numbers of CD3⁺ cells vs healthy controls, as well as diminished CD3⁺CD4⁺ cells vs HC and LS patients. Furthermore, the relative and absolute Treg numbers were also decreased in nLS group vs HC (2.83% (2.47; 3.36) vs 3.33% (2.79; 3.84), p = 0.021), and 37 (29; 52) cells vs 50 (42; 65), p = 0.004, respectively) per one microliter of peripheral blood. Relative number of CD39-positive Tregs in chronic vs acute sarcoidosis patients was associated with 51.02% (38.20; 61.62) vs 48.64% (41.46; 63.72) that was significantly (p < 0.001 and p = 0.007, respectively) higher than in HC (39.52% (11.55; 46.34). We have found that "naïve" (CD45R0⁻CD62L⁺) Tregs did not significantly differ in percentage of CD39- and CD73-positive cells in all the groups tested. Moreover, CD45R0⁺CD62L⁺ Tregs in LS and nLS patients contained significantly more CD39-positive cells (69.66% (61.92; 79.34) and 67.62% (61.92; 79.34), respectively, compared to 47.55% (15.74; 65.32) in HC (p < 0.001 and p = 0.004, respectively). In case of CD45R0⁺CD62L⁻ Tregs able to exit from the circulation and migrate to the site of inflammation, an increased percentage of CD39-positive subset was noted only in patients with chronic sarcoidosis and HC (61.79% (55.12; 73.09) and 57.27% (16.03; 66.98), p = 0.006). Enhanced CD39 expression on Tregs seems to be related to chronic immune response, so that antigen elimination becomes impossible due to Treg overactivation, as shown in patients with sarcoidosis and some other chronic autoimmune and infectious disorders.

Keywords: sarcoidosis, regulatory T cells, CD39 expression, flow cytometry, multi-color immunophenotyping

Introduction

Sarcoidosis is a disorder of unknown etiology characterized by development of necrosis-free epithelioid cell granulomas in various tissues [14; 32]. Numerous studies point at cell-mediated immune reactions mediated by type 1 (Th1) and type 17 (Th17) T helper cells playing an important role in formation of sarcoid granuloma (for more detail see [16] and [22]). Th1 cells producing interferon-gamma

(IFN γ) display CCR4-CCR6-CXCR3⁺ phenotype, whereas Th17 cells mainly produce IL-17A and express CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻ markers on the surface [26]. More recently, "non-classical" Th17 cell subset called "Th1/Th17" or "Th17.1" exhibiting features of both Th1 and Th17 cells was described in human, which also expresses nuclear transcription factors TBX21 and RORC able to produce IFN γ and IL-17A [30]. Perhaps, a major role in pathogenesis of sarcoidosis is played solely by these cells able to

activate simultaneously tissue macrophages as well as polymorphonuclear leukocytes migrating from peripheral blood to the site of inflammation [34].

In addition, still it remains unclear what T cell subset migrating to target organs as well as genetic predisposition factors are particularly responsible for beneficial or unfavorable course of sarcoidosis. Some investigators noted that development of spontaneous remission in sarcoidosis occurs in 7-20% (or even more) cases [1, 2, 7]. Moreover, a more favorable prognosis was associated with Lofgren's syndrome or acute or subacute onset of sarcoidosis [7, 13]. Perhaps, various forms of sarcoidosis may develop due to distinct immunoregulatory mechanisms either contributing to regression or resulting in chronic course and fibrogenesis.

Activation of FoxP3⁺ regulatory T cells (Tregs) represents one of the key mechanisms restraining overactive immunological reactions. A timely Treg activation allows to prevent development of a whole set of immune-mediated pathological processes [8]. Moreover, it is currently believed that a sole balance between anti-inflammatory Tregs and pro-inflammatory Th17 cells plays a crucial role in restraining inflammatory reactions occurring within the site of inflammation [28]. Antagonistic interactions between these two helper T cell subsets in the circulation, secondary lymphoid organs and peripheral tissues mainly underlies an efficacy of immune response and the onset of regenerative processes under various pathological settings.

Currently, a whole body of evidence have been gained about origin, phenotypic features, intracellular signal transduction and suppression mechanisms related to Tregs. Owing to this, they are considered as targets for new therapeutic strategies in autoimmune and allergic disorders as well as in oncology diseases. Importantly, a number of various subsets may be distinguished within Treg population, by describing at least two major subsets differing by their origin [15]. Firstly, thymus-derived or natural Tregs are differentiated in the thymus during antigen-independent stage of T cell maturation, which express markers of naïve peripheral blood CD45R0-CD62L⁺T cells. On the other hand, peripheral or inducible Tregs are generated during antigen-dependent differentiation in various peripheral lymphoid tissues. In addition, some investigators [25] refer CD45R0⁺Tregs to resting or non-activated regulatory T cell subset, whereas activated Tregs are defined by expressing CD45R0 surface marker.

Innate (tissue macrophages, antigen-presenting cells, NK cells) and adaptive (effector cytotoxic T cells, helper T cells, B cells) immune cells are the main targets for Tregs. Various mechanisms are involved in mediating functions of Tregs including cell contact-dependent effects via interaction between

Treg receptors and surface proteins on target cells, as well as cell contact-free effects mediated by soluble molecules released by regulatory T cells [33]. Surface CTLA-4 (CD152), neuropilin-1 and LAG-3 (CD223) on Tregs are able to downregulate expression of co-stimulatory molecules and major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells that result in controlling magnitude of cell clonal expansion [19].

It was shown that interaction between galectin-9 on the surface of Treg and TIM-3 (CD366) protein on effector lymphocyte subset results in induction of apoptosis in the latter cell type. In addition, apoptosis of effector T cells may also be mediated via cell contact-free mechanisms by perforins and granzymes secreted by Tregs acting on target cells [19]. Tregs produce anti-inflammatory cytokines such as IL-10, IL-35, and TGF- β , which mainly target effector immune cells subsequently resulting in decreased proliferative potential as well as their differentiation towards effector subsets, down-modulated production and secretion of various cytokines. While acting on antigen-presenting cells, anti-inflammatory cytokines decrease density of the expressed costimulatory proteins, efficacy of antigen presentation and cytokine production necessary for T cell maturation [19].

On the other hand, degradation of pro-inflammatory extracellular ATP to adenosine that acts on a broad range of innate and adaptive immune cells represents another important immunosuppressive mechanism mediated by Tregs both in lymphoid tissues and within the site of inflammation [19]. In particular, two major ectonucleosides CD39 (E-NTPDase1, or ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1) and CD73 (Ecto-5'NTase, or ecto-5'-nucleotidase) cleave ATP to ADP, pyrophosphate and AMP, as well as to adenosine and phosphate, respectively [4, 37].

Clinical and immunological comparisons performed in patients with various course of sarcoidosis prior to the onset of immunosuppressive therapy, analysis of chemokine receptor profile on peripheral blood lymphocyte subsets including regulatory T cells allow to obtain new data about a potential role of these cell types played in pathogenesis of sarcoidosis. Therefore, our study was aimed at investigating changes in the key surface differentiation markers on Tregs in peripheral blood from patients with sarcoidosis prior to immunosuppressive therapy, which might be used as immunological markers for predicting severity of this disorder.

Materials and methods

Peripheral blood samples were collected into vacuum test tubes added with K₃EDTA. All patients provided an informed consent. Manipulations and assays were performed in accordance with Helsinki Declaration of the World Medical Association on

the Ethical Principles of Scientific Medical Research with Human Participation (1964, with subsequent additions, including the 2000 version) as well as the Order No. 266 On Approval of Rules of Good Clinical Practice in the Russian Federation (dated of June 19, 2003, registered by the Ministry Health of the Russian Federation).

All laboratory experiments were conducted at the day collecting blood samples. There were enrolled 11 and 46 patients with acute (Lofgren's syndrome) and chronic (non-Lofgren's syndrome) sarcoidosis, respectively. A comparison group consisted of 26 age- and sex-matched healthy volunteers. Peripheral blood samples were prepared for flow cytometry assay according to recommendations published before [12]. A panel of monoclonal antibodies conjugated to various fluorochromes was used to identify main T cell subsets and to examine their CD39 and CD73 surface expression [3]: CD39-FITC (clone A1, cat. #328206, BioLegend, Inc., USA), CD25-PE (clone B1.49.9, cat. #A07774, Beckman Coulter, USA), CD62L-ECD (clone DREG56, cat. #IM2713U, Beckman Coulter, USA), CD45R0-PC5.5 (clone UCHL1, cat. #IM2712U, Beckman Coulter, USA), CD4-PC7 (clone SFC112T4D11 (T4), cat. #737660, Beckman Coulter, USA), CD8-APC (clone B9.11, cat. #IM2469, Beckman Coulter, USA), CD3-APC-Alexa Fluor 750 (clone UCHT1, cat. #A94680, Beckman Coulter, USA), CD73-Pacific Blue (clone AD2, cat. #344012, BioLegend, Inc., USA), and CD45-Krome Orange (clone J33, cat. #A96416, Beckman Coulter, USA). Flow-Count Fluorospheres (cat. #7547053, Beckman Coulter, USA) were used to measure absolute counts of the examined T cell subsets, by recalculating relative percentage into absolute numbers presented as cell count per 1 μ L peripheral blood. Distribution of antibodies in different fluorescence channels was performed in accordance with the principles for creating multi-color flow cytometry panels [11, 23], which were used to stain 100 μ L peripheral blood sample, according to the manufacturer's recommendations. Red blood cells were removed by adding *ex tempore* prepared 975 μ L lysis buffer VersaLyse (cat. #A09777) followed by adding 25 μ L IOTest 3 Fixative Solution (cat. #A07800). After red blood cells were lysed, samples were washed out once with excess saline at 330g for 7 minutes followed by decanting supernatant. Then, cell pellet was resuspended in saline (pH 7.2-7.4) containing 2% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, USA). Finally, blood samples were analyzed by using a flow cytometer Navios™ (Beckman Coulter, USA) equipped with 405, 488, and 638 nm diode lasers.

To identify major subsets among peripheral blood T cells, an algorithm earlier described by [29] was applied. In brief, at least CD45-positive 40,000 singlet events were analyzed in each sample. After that,

regulatory T cells were identified as CD4⁺CD25^{bright} T cells. Our preliminary data and those published by others [18] allowed to conclude that a relative percentage of T cells expressing a transcription factor FoxP3 within this population was as high as 90-92%, therefore allowing to apply this approach for identifying Tregs without permeabilization and subsequent co-staining for nuclear FoxP3 transcription factor. In addition, Tregs were further evaluated for surface expression of CD45R0 and CD62L markers as published before [9, 10]. In particular, naïve Tregs were defined as CD45R0⁻CD62L⁺, central memory (CM) subset – as CD45R0⁺CD62L⁺, effector memory (EM) – as CD45R0⁺, whereas CD45RA-positive terminally differentiated effector T cells (TEMRA) – as CD45R0⁻CD62L⁻ cells. Finally, these Treg subsets were analyzed for surface expression of CD39 and CD73 markers [29].

Flow cytometry data were processed by using software Navios Software v.1.2 and Kaluza™ v. 1.2 (Beckman Coulter, USA). Statistical analysis was performed by applying software Statistica 8.0 (StatSoft, USA) as well as GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., USA). A normality of a distribution was checked by using Pearson's Chi-square test. The data in the main text and in Figure notes on percentage of marker-positive cells out of T cell subset as well as absolute number per 1 μ L of peripheral blood, by showing results as median and inter-quartile range (25%; 75%). Paired quantitative comparisons were analyzed by applying a non-parametric Mann–Whitney U-test.

Results

Flow cytometry analysis of peripheral blood samples demonstrated that patients with primary chronic sarcoidosis vs control group had decreased both relative (70.83% (63.93; 77.26) vs (77.06% (75.33; 78.52), respectively, $p < 0.001$) and absolute numbers (931 (717; 1086) vs 1218 (964; 1758) cells per 1 μ L of peripheral blood, respectively, $p = 0.010$) of total CD3⁺T cells. No significant differences between these parameters were found in patients with acute sarcoidosis vs control group as well as comparing with chronic sarcoidosis ($p = 0.984$ and $p = 0.075$, as well as $p = 0.335$ and $p = 0.283$, respectively).

A percentage of total CD3⁺CD4⁺T (Th) cells was significantly lower in patients with chronic sarcoidosis (41.66% (34.05; 45.94) out of total lymphocyte population) compared to both control (48.40 (43.66; 50.77), $p < 0.001$) group and patients with acute-onset sarcoidosis (53.57% (43.30; 55.84), $p = 0.004$). Moreover, a number of Th cells in patients with chronic sarcoidosis was decreased from 737 (501; 1198) down to 529 (423; 702) cells per 1 μ L ($p = 0.006$), whereas in patients with acute sarcoidosis it was (656 (541;

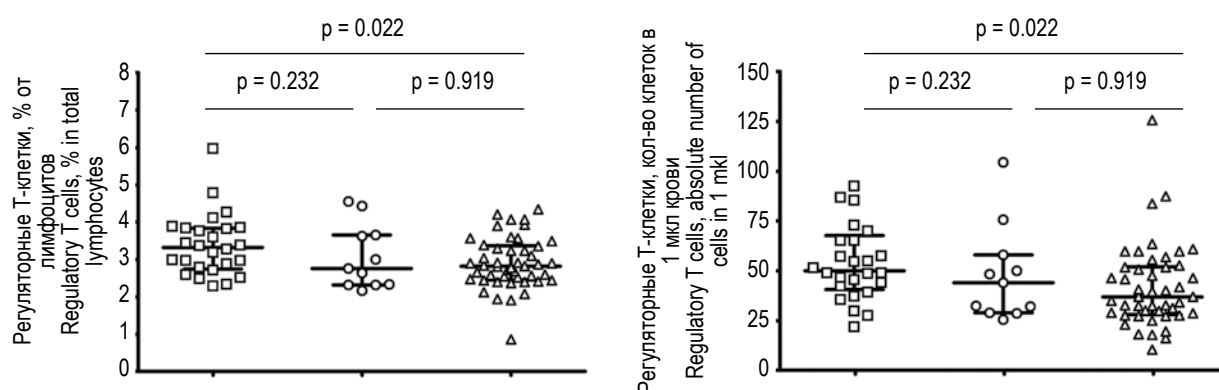


Рисунок 1. Относительное (слева) и абсолютное (справа) содержание регуляторных Т-клеток в периферической крови больных с острым и хроническим саркоидозом

Примечание. Здесь и далее на рисунках 2-4: квадраты – группа условно здоровых доноров ($n = 26$); круги – больные с острой формой саркоидоза ($n = 11$); треугольники – больные с хронической формой саркоидоза ($n = 46$). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$). Различия между сравниваемыми группами указаны согласно непараметрическому критерию Манна–Уитни.

Figure 1. Relative (left) and the absolute (right) number of regulatory T cells in peripheral blood from patients with acute (Lofgren's Syndromes) and chronic (non-Lofgren's Syndromes) sarcoidosis

Note. Hereinafter, symbols in Figure 1-4 denote the following groups: squares, healthy control group ($n = 26$); circles, patients with acute sarcoidosis (Lofgren's Syndromes, $n = 11$); triangles, patients with chronic sarcoidosis (non-Lofgren's Syndromes, $n = 46$). The data are presented as median with interquartile range ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$). Differences between the groups calculated by nonparametric Mann–Whitney U-tests are shown. Left: % Tregs out of total lymphocyte count. Right: Abs. number Tregs.

864) cells/ μ L); however, no significant differences in both comparison groups were found.

Analysis of the relative and absolute $CD3^+CD4^+CD25^{bright}$ Treg cell counts in peripheral blood is shown in Figure 1. In particular, patients with chronic sarcoidosis were noted to have lowered Treg percentage in the total lymphocyte population from 3.33% (2.79; 3.84) to 2.83% (2.47; 3.36, $p = 0.021$), which was even more pronounced for absolute counts: 50 (42; 65) vs 37 (29; 52) cells per 1 μ L, respectively ($p = 0.004$).

Assessing expression of ectonucleotidases CD39 and CD73 playing a crucial role in cleaving pro-inflammatory ATP to anti-inflammatory adenosine [4] on the surface of circulatory Tregs revealed marked differences between the groups examined (Figure 2). A relative percentage of CD39-positive Treg subset was remarkably higher in patients with sarcoidosis vs control group. In particular, chronic vs acute sarcoidosis was associated with 51.02% (38.20; 61.62) vs 48.64% (41.46; 63.72) that was significantly ($p < 0.001$ and $p = 0.007$, respectively) higher than in control group (39.52% (11.55; 46.34). further examination demonstrated that relative percentage of CD73-positive Tregs was decreased only in patients with chronic sarcoidosis compared to control group (3.55% (2.11; 4.78) and 4.78% (3.67; 5.91), respectively, $p = 0.011$).

Next, experiments were performed by analyzing surface expression of CD45R0 and CD62L on Tregs

allowing to subdivide them as follows: naïve Tregs bear $CD45R0^+CD62L^+$, whereas central memory (CM) and effector memory (EM) Treg subsets had phenotype $CD45R0^+CD62L^+$ and $CD45R0^+CD62L^-$, respectively. Frequency and absolute numbers of these Treg subsets are shown in Figure 3. In particular, it was found that patients with chronic sarcoidosis vs control group were characterized by increased percentage of EM Tregs (13.48% (10.69; 17.97) vs 11.21% (8.07; 13.96), $p = 0.026$). Upon that, absolute number of naïve and CM Tregs was decreased in patients with chronic sarcoidosis vs controls (9 (6; 17) vs 15 (11; 24) cells/ μ L and 21 (17; 26) vs 29 (21; 37) cells/ μ L, $p = 0.007$ and $p = 0.002$, respectively). However, these parameters did not significantly differ in patients with acute sarcoidosis vs comparison groups.

Multi-color flow cytometry allowed to assess surface expression of membrane-bound ectonucleotidases CD39 and CD73 on various Treg subsets (Figure 4). It was found that naïve Tregs did not significantly differ in percentage of CD39- and CD73-positive cells in all examined groups. $CD45R0^+CD62L^+$ Tregs patrolling peripheral lymphoid organs in patients with acute and chronic sarcoidosis contained significantly more CD39-positive cells (69.66% (61.92; 79.34) and 67.62% (61.92; 79.34), respectively, compared to 47.55% (15.74; 65.32) in control group ($p < 0.001$ and $p = 0.004$, respectively). Moreover, the level of CD73 expression was markedly lower on CM Tregs in patients with chronic sarcoidosis (as low as 3.07%

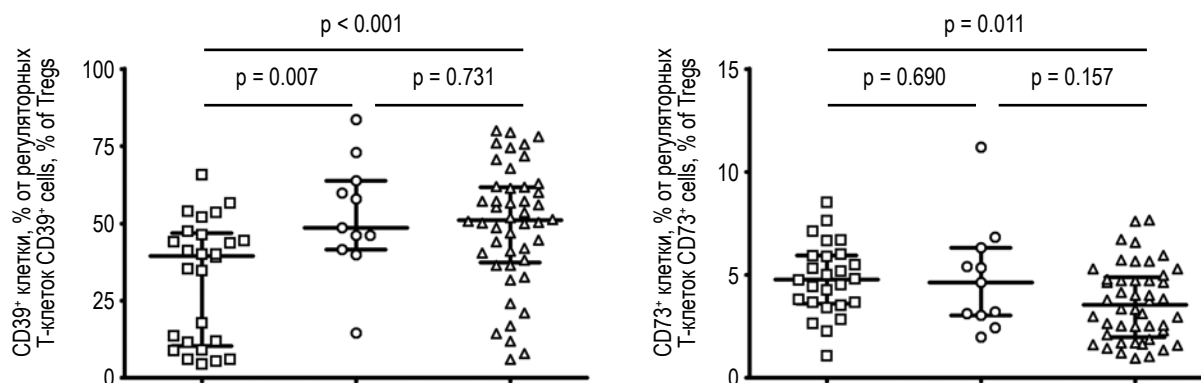


Рисунок 2. Экспрессия нуклеотидаз CD39 (слева) и CD73 (справа) регуляторными Т-клетками периферической крови больных с острым и хроническим саркоидозом

Figure 2. Expression of CD39 (left) and CD73 (right) on peripheral blood regulatory T cells from the patients with acute (Lofgren's Syndromes) and chronic (non-Lofgren's Syndromes) sarcoidosis. Left: %CD39⁺Treg cells. Right: %CD73⁺Treg cells

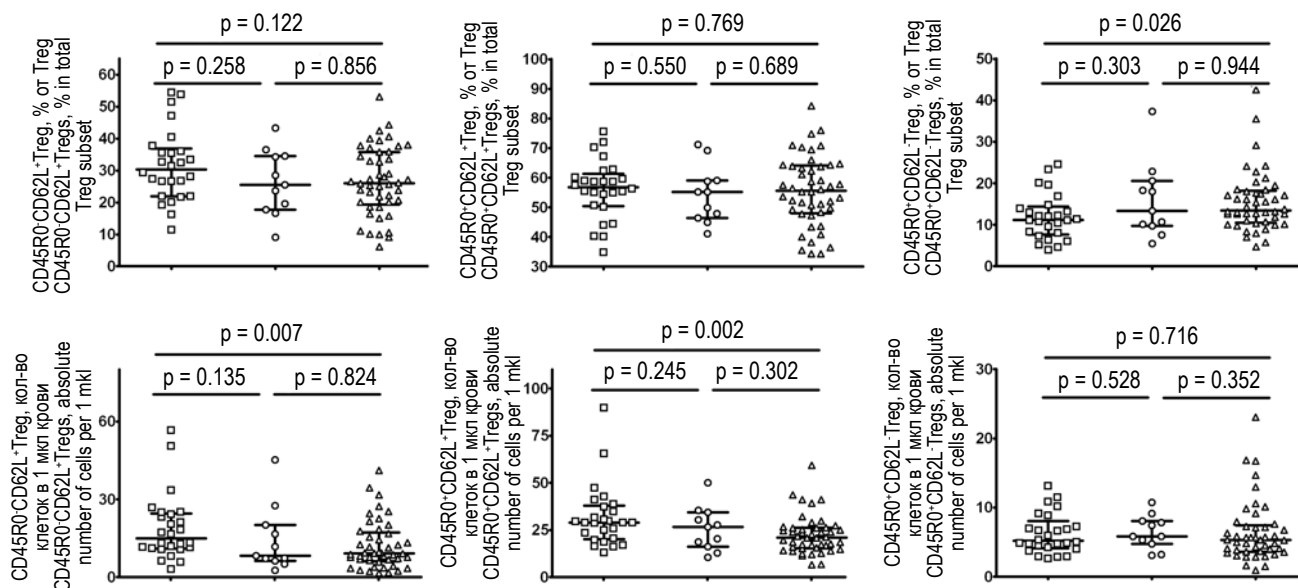


Рисунок 3. Относительное (сверху) и абсолютное (снизу) содержание регуляторных Т-клеток периферической крови больных с острым и хроническим саркоидозом, находящихся на различных стадиях созревания

Примечание. Верхний ряд гистограмм – относительное содержание регуляторных Т-клеток с фенотипами CD45RO⁺CD62L⁺, CD45RO⁺CD62L⁻ и CD45RO⁻CD62L⁻ соответственно, в рамках общей популяции Treg. Нижний ряд гистограмм – абсолютное (кол-во клеток в 1 мл периферической крови) содержание Т-клеток с фенотипами CD45RO⁺CD62L⁺, CD45RO⁺CD62L⁻ и CD45RO⁻CD62L⁻ соответственно.

Figure 3. Relative and the absolute number of regulatory T cell subsets in peripheral blood from patients with acute (Lofgren's Syndromes) and chronic (non-Lofgren's Syndromes) sarcoidosis

Note. Upper panel: %CD45RO⁺CD62L⁺Treg cells, %CD45RO⁺CD62L⁻Treg cells and %CD45RO⁻CD62L⁻Treg cells, respectively. Lower panel: Abs. number CD45RO⁺CD62L⁺Treg cells, Abs. number CD45RO⁺CD62L⁻Treg cells and Abs. number CD45RO⁻CD62L⁻Treg cells, respectively.

(1.78; 4.88), whereas in acute sarcoidosis and control group it was 4.44% (3.13; 6.08) and 4.77% (3.26; 6.28) ($p = 0.026$ and $p = 0.011$, respectively). In case of CD45RO⁺CD62L⁻Tregs able to exit from the circulation and migrate to the site of inflammation,

an increased percentage of CD39-positive subset was noted only in patients with chronic sarcoidosis and control group (61.79% (55.12; 73.09) and 57.27% (16.03; 66.98), $p = 0.006$). Finally, a percentage of CD73-positive EM Tregs was decreased about by

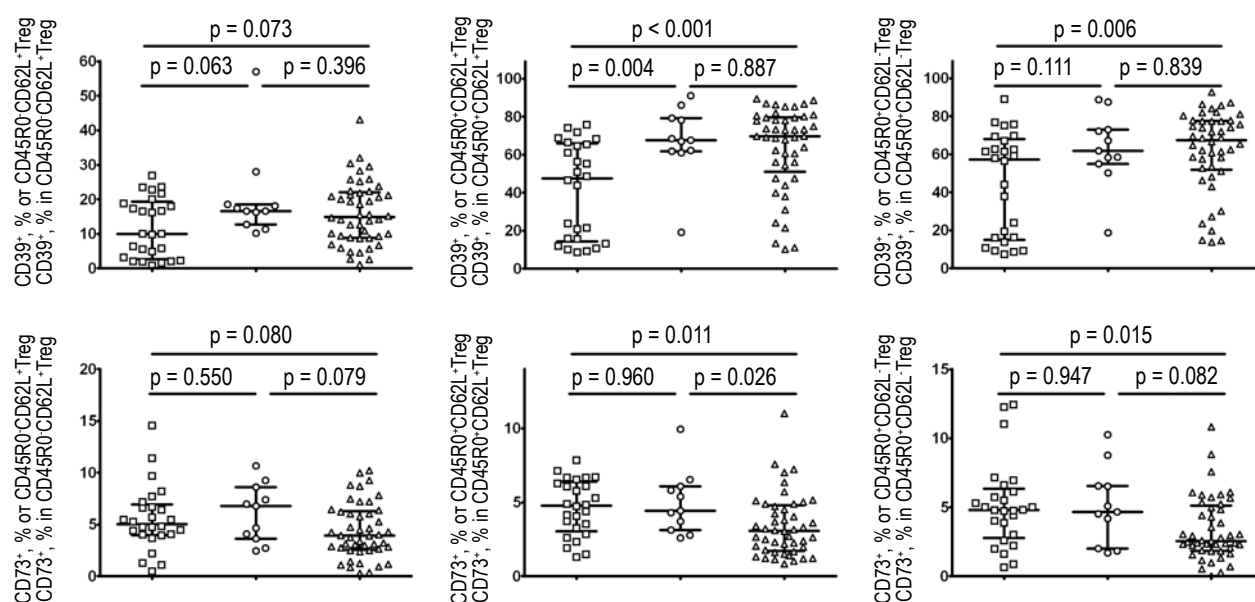


Рисунок 4. Экспрессия нуклеотидаз CD39 (сверху) и CD73 (снизу) основными субпопуляциями регуляторных Т-клеток периферической крови больных с острым и хроническим саркоидозом

Примечание. Верхний ряд гистограмм – относительное содержание CD39⁺ клеток среди Трег с фенотипами CD45RO⁺CD62L⁺, CD45RO⁺CD62L⁺ и CD45RO⁺CD62L⁺ соответственно. Нижний ряд гистограмм – относительное содержание CD73⁺ клеток среди Трег с фенотипами CD45RO⁺CD62L⁺, CD45RO⁺CD62L⁺ и CD45RO⁺CD62L⁺ соответственно.

Figure 4. Expression of CD39 and CD73 on various subsets of peripheral blood regulatory T cells from the patients with acute (Lofgren's Syndromes) and chronic (non-Lofgren's Syndromes) sarcoidosis

Note. Upper panel: %CD39⁺ out of CD45RO⁺CD62L⁺Treg cells, %CD39⁺ out of CD45RO⁺CD62L⁺Treg cells and %CD39⁺ out of CD45RO⁺CD62L⁺Treg cells, respectively. Lower panel: %CD73⁺ out of CD45RO⁺CD62L⁺Treg cells, %CD73⁺ out of CD45RO⁺CD62L⁺Treg cells and %CD73⁺ out of CD45RO⁺CD62L⁺Treg cells, respectively.

2-fold in patients with chronic sarcoidosis vs control group comprising 2.57% (1.86; 4.98) and 4.80% (3.01; 6.12, p = 0.015), respectively.

Discussion

Here, we present the data on investigating immunological parameters by profiling Tregs subsets in peripheral blood of patients with newly diagnosed sarcoidosis prior to applying immunosuppressive therapy. It allowed to examine signs of naturally developed immunopathogenesis of sarcoidosis upon manifestation of acute and primary chronic forms. Based on aligning immunological parameters with clinical signs of acute and primary chronic sarcoidosis, certain patterns were found, which contribute to better understanding a role of immune cells played in its pathogenesis. It was shown that the number of peripheral blood total T cells, helper T cells as well as Tregs was significantly decreased in patients with primary chronic sarcoidosis compared to control group, which is in agreement with the concept of compartmentalized immune responses and redistribution of effector immune cells exiting peripheral circulation and entering site of inflammation [16, 34].

However, such patterns were not detected upon acute onset sarcoidosis showing no significant differences in the number of total T cells, Th and Treg cell subsets as compared with control group. Importantly, the data published in various studies assessing number of Treg cells in peripheral blood of patients with sarcoidosis are highly controversial. For instance, Huang et al. observed that percentage of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺T cells was decreased about by 3-fold in newly diagnosed sarcoidosis compared to healthy volunteers [20]. On the other hand, it was also found that the number of circulating Tregs was increased in patients with relapsing sarcoidosis (clinical manifestations or chest X-ray verified relapse after corticosteroid withdrawal) compared to patients with stable remission after corticosteroid withdrawal [21]. On the contrary, percentage of CD4⁺CD25^{bright}Tregs was decreased by 5-fold in patients with overt sarcoidosis compared to control group and patients with clinically inactive form [24]. We can speculate that the more pronounced activation and migration of T cells from peripheral circulation to the lungs typical to primary chronic vs acute sarcoidosis most probably might determine severity of clinical manifestations. On the other hand, perhaps a more profound lung inflammation during primary

chronic sarcoidosis elicits a more augmented negative feedback reaction mediated by regulatory T cells. Indeed, the data obtained by us evidence that number of peripheral blood Treg cells was markedly decreased in patients with chronic sarcoidosis compared to control group that might point at a crucial role played by Tregs within the site of inflammation on restraining hypersensitivity immune reactions given that no such relationship was found in acute-onset sarcoidosis.

Redistribution of naïve, central memory (CM) and effector memory (EM) regulatory T cells represents important immunosuppressive mechanism controlling hypersensitivity immune reactions. It is known that lung-resident EM regulatory T cells lose ability to express high amount of CD62L and display CD45R0⁺CD62L⁻ phenotype [36]. In turn, CM CCR7⁺CD62L⁺Tregs may migrate to the lungs followed by down-modulating expression of CCR7 and CD62L markers subsequently resulting in their transition into EM T cells. We found that number of naïve and CM Treg subsets was much lower in peripheral blood in patients with chronic sarcoidosis, whereas the number of EM Tregs was significantly higher as compared with control group. Moreover, no such changes were detected in patients with acute-onset sarcoidosis. Previously, it was found [36] that effector memory vs naïve and central memory T cells display lower antigen-specific activation threshold, do not depend on high expression of co-stimulation molecules on antigen-presenting cells, may be rapidly activated to a level higher than in naïve Tregs. Perhaps, a more extensive redistribution of Treg subsets from peripheral circulation to effector immune sites may be noted in primary chronic sarcoidosis, which, in turn, underlies lower severity of organismal pathological processes.

Adenosine exerting marked suppressive effects on a broad range of innate and adaptive immune cells is another important and poorly investigated soluble factor released by Tregs along with anti-inflammatory cytokines TGF- β and IL-10 [19]. Comparing CD39 expression level on peripheral blood regulatory T cells showed that percentage of CD39⁺Tregs was elevated both in patients with acute-onset and primary chronic sarcoidosis. Moreover, such changes were also found both in total and CD45R0⁺CD62L⁺Treg subset that in chronic course was further extended to CD45R0⁺CD62L⁻Tregs patrolling peripheral lymphoid tissues and migrating to the site of inflammation, respectively. High CD39 expression level seems to be related to transition to chronic immune response, so that antigen elimination becomes impossible due to Treg cell over activation, as shown in some chronic disorders.

Phenotypic analysis comparing CD39⁺ and CD39⁻Tregs in adult donors showed that CD39⁺Tregs expressed higher levels of intracellular FoxP3 and

CTLA4 than CD39⁻Tregs [31]. Analysis of chemokine receptor expression revealed that a higher percentage of CD39⁺Tregs expressed CCR4, CXCR3 and CCR6, which are involved in the migration of T cells to sites of inflammation, while CCR5 was solely expressed by CD39⁺Tregs. Upon *in vitro* activation, TGF- β anchoring proteins GARP and LAP were expressed at higher level on CD39⁺Tregs. These data indicate that CD39⁺Tregs exhibit superior suppressive potential compared to CD39⁻Tregs.

Furthermore, unregulated CD39⁺ expression on circulatory Tregs was noted in chronic hepatitis B virus infection [35], but the increased viral load inversely correlated with the level of serum alanine aminotransferase. Another clinical study comparing HIV-infected patients vs control group demonstrated that both percentage of CD39⁺Tregs as well as density of CD39 expression were substantially higher [27]. Furthermore, an increase of these parameters paralleled elevated viral load and decreased percentage of peripheral blood CD4⁺T cells. A marked increase of circulatory CD39⁺Tregs was also noted in developing anti-cancer immune response [5]. In particular, colorectal cancer patients were shown to have elevated number of peripheral blood CD39⁺Tregs and showed a direct relationship between CD39 expressed on Tregs and increased mRNA level for adenosine receptor A2AR in peripheral blood leukocytes isolated from patients.

It is also worth noting that no significant differences in the number of thymus-derived CD39⁺CD45R0⁺CD62L⁺Tregs in peripheral blood were found. An impaired differentiation of antigen-specific Tregs in peripheral lymphoid tissues seems to occur in sarcoidosis. Moreover, both upregulated CD39 expression on CD45R0⁺CD62L⁻Tregs able to exit circulation and enter sarcoid granuloma as well as significantly decreased percentage of CD73⁺Tregs able to produce immunosuppressive adenosine were found in chronic sarcoidosis. Apparently, it may point at impaired mechanisms underlying emergence of effector functions in this Treg cell subset. In addition, it is remarkable that percentage of CD45R0⁺CD62L⁻Tregs in chronic sarcoidosis vs control group (together with decreased total Treg count and significantly decreased CD45R0⁺CD62L⁺ and CD45R0⁺CD62L⁻Treg subsets) were elevated, and their absolute numbers were increased up to normal level. Published data point that CD39⁺Tregs are able to infiltrate sarcoid granulomas diffusely located throughout pathological tissues [17]. Production of anti-inflammatory adenosine involved in suppression of hypersensitivity immune reactions seems to be among the key most common immunosuppressive mechanisms involved both in acute and chronic sarcoidosis.

Our data also confirm the previous results [37] evidencing about increased number of CD45R0⁺CD62L⁺Tregs able to exit peripheral circulation and migrate to the site of inflammation as well as an increased percentage of CD39⁺T cells in patients with chronic sarcoidosis compared to control group.

Thus, the our data contribute to better understanding a whole set of immunoregulation mechanisms during sarcoidosis. Further dynamic clinical and immunological examinations as well as a comparative analysis of the number and functional properties of the major T cell subsets in peripheral blood and bronchoalveolar fluid and/or lung biopsy is necessary to unveil intimate and universal immunopathogenetic mechanisms in sarcoidosis. Thus, it may be concluded that along with potential factors of genetic predisposition, or, probably, owing to genetic factors determining magnitude of immune response, based on a thorough investigation of regulatory T cell types and subsets differences in mechanisms of immune regulation were found depending on a form of sarcoidosis.

Conclusions

Based upon a concept about compartmentalized immune response and redistribution of immune cells

from peripheral circulation to the site of inflammation (here, lung tissues), the following conclusions may be drawn:

1. An important role played by Tregs in the processes regulating immune response to yet unidentified antigen(s) in sarcoidosis was uncovered.

2. The majority of peripheral blood Treg markers of patients with chronic (non-Lofgren's Syndromes) sarcoidosis vs control subjects was down-modulated that may be associated with their redistribution to the site of inflammation, thereby contributing to restraining immune-mediated processes in the lungs and subsequent development of chronic-onset sarcoidosis.

3. Mechanisms of immunosuppression mediated by Tregs via cleaving pro-inflammatory extracellular ATP to anti-inflammatory adenosine acting on a broad range of innate and adaptive immune cells represent high importance adaptation mechanisms in chronic sarcoidosis.

4. Acute-onset sarcoidosis might not be coupled to a marked activation of the mechanisms restricting immune-mediated inflammatory responses in the lung tissue, as the majority of surface markers on peripheral blood Treg cells did not significantly differ from those in control subjects.

Список литературы / References

1. Визель И.Ю. Sarcoidosis: возможность спонтанной ремиссии // Вестник современной клинической медицины, 2012. Т. 5, № 2. С. 54-60. [Vizel I.Yu. Sarcoidosis: the possibility of spontaneous remission. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*, 2012, Vol. 5, no. 2, pp. 54-60. (In Russ.)]
2. Визель И.Ю., Шмелев Е.И., Баранова О.П., Барламов П.Н., Бородин Г.Л., Денисова О.А., Добин В.Л., Кулбаисов А.М., Купаев В.И., Листопадова М.В., Овсянников Н.В., Оськин Д.Н., Петров Д.В., Соловьев К.И., Шульженко Л.В., Визель А.А. Состояние больных sarcoidosisом исходно и 10 лет спустя при различной тактике их ведения (мультицентровой анализ) // Пульмонология, 2012. № 4. С. 29-33. [Vizel I.Yu., Shmelev E.I., Baranova O.P., Barlamov P.N., Borodina G.L., Denisova O.A., Dobin V.L., Kulbaisov A.M., Kupaev V.I., Listopadova M.V., Ovsyannikov N.V., Oskin D.N., Petrov D.V., Solovyov K.I., Shulzhenko L.V., Vizel A.A. Health status of sarcoidosis patients in baseline and in 10 years under different treatment strategies (multicenter analysis). *Pulmonology = Russian Pulmonology*, 2012, Vol. 4, pp. 29-33. (In Russ.)]
3. Головкин А.С., Серебрякова М.К., Жидулева Е.В., Муртазалиева П.М., Титов В.А., Иртюга О.Б., Моисеева О.М., Кробинец И.И., Кудрявцев И.В. Экспрессия рецепторов пуринергического сигналинга на Т-лимфоцитах периферической крови здоровых доноров // Трансляционная медицина, 2017. Т. 4, № 5. С. 46-60. [Golovkin A.S., Serebryakova M.K., Zhiduleva E.V., Murtazaliev P.M., Titov V.A., Irtyuga O.B., Moiseeva O.M., Krobinec I.I., Kudryavtsev I.V. Purinergic signaling receptors expression on peripheral T-lymphocytes of healthy donors. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*, 2017, Vol. 4, no. 5, pp. 46-60. (In Russ.)]
4. Головкин А.С., Асадуллина И.А., Кудрявцев И.В. Пуринергическая регуляция основных физиологических и патологических процессов // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 463-476. [Golovkin A.S., Asadullina I.A., Kudryavtsev I.V. Purinergic regulation of basic physiological and pathological processes. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 463-476. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-463-476.
5. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Чуров А.В., Романов А.А., Кравченко (Семакова) П.Н., Олейник В.М. Роль Тreg-клеток в аденозин-опосредованной иммунной супрессии при колоректальном раке // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 89-94. [Zhulai G.A., Oleinik E.K., Churov A.V., Romanov A.A., Kravchenko (Semakova) P.N., Oleinik V.M. Significance of Treg cells for adenosine-mediated immune suppression in colorectal cancer. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 89-94. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-89-94.

6. Илькович М.М. Диссеминированные заболевания легких. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 480 с. [Ilkovich M.M. Disseminated lung diseases]. Moscow: GEOTAR-Media, 2011. 480 p.
7. Илькович М.М., Кокосова А.Н. Интерстициальные заболевания легких: руководство для врачей. СПб.: Нордмедиздат, 2005. 560 с. [Ilkovich M.M., Kokosova A.N. Interstitial lung diseases: a guide for physicians]. St. Petersburg: Nordmedizdat, 2005. 560 p.
8. Козлов В.А. Клетки-супрессоры – основа иммунопатогенеза аутоиммунных заболеваний // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 7-14. [Kozlov V.A. Suppressor cells – the basis of immunopathogenesis autoimmune diseases. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 1, pp. 7-14. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2016-1-7-14.
9. Кудрявцев И.В., Елезов Д.С. Анализ основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови на основании уровня экспрессии CD27, CD28, CD45R0 и CD62L // Российский иммунологический журнал, 2013. Т. 7 (16), № 2-3 (1). С. 57-61. [Kudryavtsev I.V., Elezov D.S. Analysis of the main populations of cytotoxic T lymphocytes of peripheral blood on the basis level or the expression of CD27, CD28, CD45R0 and CD62L. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal* = *Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (16), no. 2-3 (1), pp. 57-61. (In Russ.)]
10. Кудрявцев И.В., Савицкий В.П. Многоцветный анализ основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии // Российский иммунологический журнал, 2012. Т. 6, № 3 (1) (14). С. 94-97. [Kudryavtsev I.V., Savitsky V.P. Multicolor flow cytometric analysis of the main subpopulations of T-helpers and cytotoxic T cells from peripheral blood. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal* = *Russian Journal of Immunology*, 2012, Vol. 6, no. 3 (1) (14), pp. 94-99. (In Russ.)]
11. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
12. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (Проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology “Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers” (Draft). *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.
13. Чучалин А.Г., Визель А.А., Илькович М.М., Авдеев С.Н., Амиров Н.Б., Баранова О.П., Борисов С.Е., Визель И.Ю., Ловачева О.В., Овсянников Н.В., Петров Д.В., Романов В.В., Самсонова М.В., Соловьева И.П., Степанян И.Э., Тюрин И.Е., Черняев А.Л., Шмелев Е.И., Шмелева Н.М. Диагностика и лечение саркоидоза: резюме федеральных согласительных клинических рекомендаций (Часть II. Диагностика, лечение, прогноз) // Вестник современной клинической медицины, 2014. Т. 7, вып. 5. С. 73-81. [Chuchalin A.G., Vizel A.A., Ilkovich M.M., Avdeev S.N., Amirov N.B., Baranova O.P., Borisov S.E., Vizel I.Yu., Lovacheva O.V., Ovsyannikov N.V., Petrov D.V., Romanov V.V., Samsonova M.V., Solovyova I.P., Stepanian I.E., Tyurin I.E., Cherniayev A.L., Shmelev E.I., Shmeleva N.M. Diagnosis and treatment of sarcoidosis: Summary of federal conciliative clinical recommendations (Part II. diagnosis, treatment, prognosis). *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny* = *Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*, 2014, Vol. 7, no. 5, pp. 73-81. (In Russ.)]
14. Broos C.E., van Nimwegen M., Hoogsteden H.C., Hendriks R.W., Kool M., van den Blink B. Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 10, no. 4, p. 437.
15. Caramalho I., Nunes-Cabaço H., Foxall R.B., Sousa A.E. Regulatory T-cell development in the human thymus. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, p. 395.
16. Facco M., Cabrelle A., Teramo A., Olivieri V., Gnoato M., Teolato S., Ave E., Gattazzo C., Fadini G.P., Calabrese F., Semenzato G., Agostini C. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax*, 2011, Vol. 66, no. 2, pp. 144-150.
17. Fujimura T., Kambayashi Y., Aiba S. Expression of CD39/Entpd1 on granuloma-composing cells and induction of Foxp3-positive regulatory T cells in sarcoidosis. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2013, Vol. 38, no. 8, pp. 883-889.
18. Garcia Santana C.A., Tung J.W., Gulnik S. Human Treg cells are characterized by low/negative CD6 expression. *Cytometry A*, 2014, Vol. 85, no. 10, pp. 901-908.
19. Grant C.R., Liberal R., Mieli-Vergani G., Vergani D., Longhi M.S. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and yet unanswered questions. *Autoimmun. Rev.*, 2015, Vol. 14, no. 2, pp. 105-116.
20. Huang H., Lu Z., Jiang C., Liu J., Wang Y., Xu Z. Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in sarcoidosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, Vol. 14, no. 11, pp. 21463-21473.
21. Liu Y., Qiu L., Wang Y., Aimurola H., Zhao Y., Li S., Xu Z. The circulating Treg/Th17 cell ratio is correlated with relapse and treatment response in pulmonary sarcoidosis patients after corticosteroid withdrawal. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 2, e0148207. doi: 10.1371/journal.pone.0148207.
22. Loke W.S., Herbert C., Thomas P.S. Sarcoidosis: immunopathogenesis and immunological markers. *Int. J. Chronic Dis.*, 2013, Vol. 2013, 928601. doi: 10.1155/2013/928601.

23. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.*, 2007, Vol. 27, no. 2, pp. 469-485.
24. Miyara M., Amoura Z., Parizot C., Badoual C., Dorgham K., Trad S., Kambouchner M., Valeyre D., Chapelon-Abrieu C., Debré P., Piette J.C., Gorochoff G. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, no. 2, pp. 359-370.
25. Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A., Parizot C., Taflin C., Heike T., Valeyre D., Mathian A., Nakahata T., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., Amoura Z., Gorochoff G., Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T-cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 2009, Vol. 30, pp. 899-911.
26. Mortaz E., Rezayat F., Amani D., Kiani A., Garssen J., Adcock I.M., Velayati A. The roles of T helper 1, T helper 17 and regulatory T cells in the pathogenesis of sarcoidosis. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2016, Vol. 15, no. 4, pp. 334-339.
27. Nikolova M., Carriere M., Jenabian M.A., Limou S., Younas M., Kök A., Huë S., Seddiki N., Hulin A., Delaneau O., Schuitemaker H., Herbeck J.T., Mullins J.L., Muhtarova M., Bensussan A., Zagury J.F., Lelievre J.D., Lévy Y. CD39/adenosine pathway is involved in AIDS progression. *PLoS Pathog.*, 2011, Vol. 7, no. 7, e1002110. doi:10.1371/journal.ppat.1002110.
28. Noack M., Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.*, 2014, Vol. 13, no. 6, pp. 668-677.
29. Nurkhametova D., Kudryavtsev I., Khayrutdinova O., Serebryakova M., Altunbaev R., Malm T., Giniatullin R. Purinergic profiling of regulatory T-cells in patients with episodic migraine. *Front. Cell. Neurosci.*, 2018, Vol. 12, p. 326.
30. Paulissen S.M., van Hamburg J.P., Dankers W., Lubberts E. The role and modulation of CCR6⁺ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2015, Vol. 74, no. 1, pp. 43-53.
31. Rissiek A., Baumann I., Cuapio A., Mautner A., Kolster M., Arck P.C., Dodge-Khatami A., Mittrucker H.W., Koch-Nolte F., Haag F., Tolosa E. The expression of CD39 on regulatory T cells is genetically driven and further upregulated at sites of inflammation. *J. Autoimmun.*, 2015, Vol. 58, pp. 12-20.
32. Saidha S., Sotirchos E.S., Eckstein C. Etiology of sarcoidosis: does infection play a role? *Yale J. Biol. Med.*, 2012, Vol. 85, no. 1, pp. 133-141.
33. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C.M., Hafler D.A. FoxP3⁺ regulatory T-cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, pp. 490-500.
34. Sakthivel P., Bruder D. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2017, Vol. 24, no. 1, pp. 59-65.
35. Tang Y., Jiang L., Zheng Y., Ni B., Wu Y. Expression of CD39 on FoxP3⁺ T regulatory cells correlates with progression of HBV infection. *BMC Immunol.*, 2012, Vol. 13, p. 17.
36. Williams A.E. Immunology mucosal and body surface defences. A.E. Williams. – A. John Wiley and Sons, Ltd., Publication, 2015. 380 p.
37. Yegutkin G.G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2014, Vol. 49, no. 6, pp. 473-497.

Авторы:

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лазарева Н.М. — старший лаборант, научный сотрудник кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Баранова О.П. — к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких доцент кафедры пульмонологии факультета последипломного образования ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Assistant Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lazareva N.M., Senior Laboratory Assistant, Research Associate, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Baranova O.P., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Interstitial and Orphan Diseases, Assistant Professor, Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Головкин А.С. — д.м.н., руководитель группы, Институт молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

Исаков Д.В. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Серебрякова М.К. — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Сесь Т.П. — д.б.н., профессор, профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Илькович М.М. — д.м.н., профессор, директор научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких, заведующий кафедрой пульмонологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

Golovkin A.S., PhD, MD (Medicine), Head of a Research Group, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Medical V.A. Almazov Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Isakov D.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Serebriakova M.K., Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ses' T.P., PhD (Biology), Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Ilkovich M.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Interstitial and Orphan Diseases, Head, Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

Поступила 07.12.2018
Принята к печати 25.12.2018

Received 07.12.2018
Accepted 25.12.2018

АУТОИММУННАЯ ПРИРОДА САРКОИДОЗА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Зинченко Ю.С.^{1,3}, Старшинова А.А.^{1,3}, Филатов М.В.^{1,2},
Денисова Н.В.¹, Ланда С.Б.², Бурдаков В.С.^{1,2}, Яблонский П.К.^{1,3}

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

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

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

Резюме. Этиология саркоидоза достоверно неизвестна. В настоящее время существует гипотеза о связи саркоидоза с комплексом патологических аутоиммунных реакций, которые возникают под влиянием триггерных факторов. В настоящем исследовании проведено определение специфических иммунных комплексов в плазме крови пациентов, что может косвенно определять природу возникновения заболевания.

В исследование было включено 33 пациента с саркоидозом легких (I группа), группу контроля составили 24 здоровых донора (II группа). Пациентам был выполнен стандартный комплекс обследования и установлен диагноз. Плазма крови исследовалась методом динамического светорассеяния с добавлением *in vitro* туберкулезных антигенов (ESAT-6/SFP-10) и «экстракта здоровой легочной ткани». Статистическая обработка проводилась с помощью программы Statistica 7.0. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Согласно полученным данным, у больных саркоидозом не определялось иммунных комплексов (ИК) после их стимуляции антигенами аллергена туберкулезного рекомбинантного (ESAT-6/SFP-10). Достоверно часто определялись ИК после стимуляции антигенами «экстракта легочной ткани» у всех больных саркоидозом. В группе контроля при стимуляции двумя видами антигенов ($p < 0,01$) иммунные комплексы не определялись ни у одного донора.

Полученные данные могут быть косвенным свидетельством возникновения аутоиммунной реакции на собственную легочную ткань у больных саркоидозом под влиянием каких-либо факторов. Отсутствие формирования ИК при добавлении туберкулезных антигенов (ESAT-6/SFP-10) исключает влияние микобактерий туберкулеза на развитие саркоидоза.

Ключевые слова: саркоидоз, аутоиммунитет, специфические иммунные комплексы, метод динамического светорассеяния

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Ю.С. Зинченко, А.А. Старшинова, М.В. Филатов,
Н.В. Денисова, С.Б. Ланда, В.С. Бурдаков,
П.К. Яблонский «Аутоиммунная природа
саркоидоза: определение специфических иммунных
комплексов у больных саркоидозом органов дыхания»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3.
С. 479-486. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-479-486
© Зинченко Ю.С. и соавт., 2019

For citation:

Yu.S. Zinchenko, A.A. Starshinova, M.V. Filatov,
N.V. Denisova, S.B. Landa, V.S. Burdakov, P.K. Yablonskiy
“Autoimmune origin of sarcoidosis: determination of specific
immune complexes in patients with respiratory sarcoidosis”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 3, pp. 479-486.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-479-486
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-479-486

AUTOIMMUNE ORIGIN OF SARCOIDOSIS: DETERMINATION OF SPECIFIC IMMUNE COMPLEXES IN PATIENTS WITH RESPIRATORY SARCOIDOSIS

Zinchenko Yu.S.^{a,c}, Starshinova A.A.^{a,c}, Filatov M.V.^{a,b}, Denisova N.V.^a, Landa S.B.^b, Burdakov V.S.^{a,b}, Yablonskiy P.K.^{a,c}

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

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

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

Abstract. The etiology of sarcoidosis is not completely understood. A hypothesis exists about the relationship between sarcoidosis and a complex of pathological autoimmune reactions that occur under the influence of triggering factors. In this study, specific immune complexes in the blood plasma of patients have been determined, which can indirectly reveal the causes of the disease.

The study included 33 patients with lung sarcoidosis (I group), compared to 24 healthy donors who served as a control group (II group). The patients underwent standard examination. Their blood plasma was investigated by the dynamic light scattering method with addition of tuberculosis antigens (ESAT-6/SFP-10) and "lung healthy tissue extract". Statistical analysis was performed using the Statistica 7.0 program. Test results were considered significant at $p < 0.05$.

According to the data obtained, addition of ESAT-6/SFP-10 to patient's blood plasma almost did not lead to the formation of immune complexes in most samples. Meanwhile, development of such complexes after addition of "lung tissue extract" was revealed in all the patients. The immune complexes were not detected in any donor from control group after stimulation with both kinds of antigens ($p < 0.01$).

The data on distinct formation of immune complexes with the addition of "lung healthy tissue extract" in patients with lung sarcoidosis may be considered an indirect evidence for occurrence of autoimmune reaction under the influence of some pathogenic factors. Absence of de novo immune complex formation after addition of tuberculosis antigens (ESAT-6/SFP-10) makes it unlikely any direct effects of tuberculosis bacteria upon development of sarcoidosis.

Keywords: sarcoidosis, autoimmunity, specific immune complexes, dynamic light scattering method

Работа поддержана грантом Правительства РФ (договор № 14.W03.31.0009 от 13.02. 2017 г.) о выделении гранта для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых.

Введение

Саркоидоз (СЗ) — полисистемное заболевание, характеризующееся образованием эпителиоидных гранул в легких и других пораженных органах [2, 3, 4, 5]. На сегодняшний день не существует единой теории, достоверно объясняющей природу саркоидоза [1, 6, 9]. Некоторые современные исследователи связывают развитие заболевания с комплексом патологических аутоиммунных реакций на фоне экзогенного или эндогенного адьювантного воздействия этиологических агентов саркоидоза и развития аутоиммунного воспалительного синдрома, индуцированного адьювантами (Autoimmune Inflammatory Syndrome Induced by Adjuvants (ASIA) [10, 11, 20].

Недавние исследования показали ведущую роль иммунологических нарушений в развитии

саркоидоза [12, 14, 15, 16]. Роль сывороточных иммуноглобулинов в формировании гранулемы до конца не ясна, возможно, их участие заключается в формировании гранул путем присоединения к иммунным комплексам. Уровень циркулирующих иммунных комплексов коррелирует с активностью заболевания и степенью аккумуляции их в пораженных тканях, однако диагностическая и прогностическая их роль требует дальнейшего изучения, так как в ряде случаев они могут стать источником патологических реакций [13, 17, 18, 19]. Знание изотипического состава циркулирующих иммунных комплексов может косвенно позволить определить природу развития заболевания. Информация о компонентах иммунных комплексов может оказаться более значимой, чем информация о свободных антигенах и антителах, а идентификация антигенов и специфических изотипов иммуноглобулинов в их составе — актуальная проблема, решение которой в дальнейшем будет способствовать развитию диагностических подходов и выработке стратегий терапии.

На сегодняшний день основными методами изучения состава иммунных комплексов являются двумерный электрофорез и иммунологическое детектирование (Вестерн-блоттинг). Для решения этих задач также с успехом применяются комбинированные подходы, основанные на использовании двумерного электрофореза или жидкостной хроматографии высокого разрешения с последующим масс-спектрометрическим анализом [8]. К сожалению, все существующие методы анализа иммунных комплексов сопряжены с их выделением из плазмы крови и других биологических жидкостей. Это приводит к тому, что анализ распределения популяции иммунных комплексов по размерам и входящим в них компонентам становится невозможным. Между тем такого рода информация могла бы быть полезна как в диагностическом, так и в прогностическом плане.

Методом, позволяющим определить входящие в состав иммунного комплекса компоненты без выделения комплексов из плазмы, является метод динамического светорассеяния (ДСР). В основе метода лежит анализ релеевского уширения, рассеянного на определенный угол лазерного луча на «свободно» диффундирующих в растворе рассеивателях. Достоинством способа ДСР является то, что это точный диффузиометрический метод, позволяющий определить иммунные комплексы больших размеров — от единиц нанометров до десятков микрон, что позволяет без внесения внешних возмущающих воздействий получать информацию о распределении иммунных комплексов по размерам в биологических жидкостях [8, 12, 17]. Уникальность метода динамического светорассеяния заключается в возможности регистрации образования макромолекулярных комплексов в сложных биологических системах, не прибегая к фракционированию или каким-либо другим процедурам, нарушающим нативные условия, в которых происходит комплексообразование, что позволяет получать более детальную информацию [7]. Радикальное увеличение динамического светорассеяния с увеличением линейных размеров макромолекулярных образований в сочетании с возможностью оценивать их реальные размеры позволяет регистрировать и идентифицировать образование комплексов различными компонентами биологических жидкостей, даже когда их количество очень невелико.

В данном исследовании был применен метод динамического светорассеяния для идентификации в плазме периферической крови иммунных комплексов, образующихся при саркоидозе органов дыхания.

Цель исследования — изучить образование иммунных комплексов у больных саркоидозом легких после их стимуляции антигенами «экстракта здоровой легочной ткани» и аллергена туберкулезного рекомбинантного (ESAT-6/SFP-10).

Материалы и методы

Проспективное исследование проведено за период с декабря 2016 года по июль 2017 года с набором пациентов на базе ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава РФ и СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2». Исследование одобрено независимым этическим комитетом ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России (выписка из протокола № 34.2 от 19.01.2017), все участники исследования подписали информированное согласие.

В исследование было включено 33 пациента в возрасте от 18 до 65 лет (16 (48,0%) мужчин и 17 (52,0%) женщин), средний возраст $38,4 \pm 12,9$ лет) с доказанным диагнозом «саркоидоз легких» (I группа — основная группа), у которых определялись изменения по данным рентгенологического исследования грудной клетки (увеличение внутригрудных лимфатических узлов; инфильтративные и/или очаговые изменения в легочной ткани) давностью не более 2 лет.

При отборе критериями исключения из исследования являлись анамнестические данные о применении иммуносупрессивной терапии, лечении противотуберкулезными препаратами, о проведении курса плазмафереза сроком менее 2 месяцев с момента включения, наличие ВИЧ-инфекции, сифилиса, опухолевых заболеваний, сахарного диабета в стадии декомпенсации, а также выявление других гранулематозных заболеваний легких.

Группу контроля составили 24 здоровых донора (11 (46,0%) мужчин, 13 (54,0%) женщин, средний возраст $44,3 \pm 9,5$ лет) (II группа — группа сравнения) без хронических инфекций, опухолевых и аутоиммунных заболеваний, перенесенного туберкулеза в анамнезе, не имевшие контакт с больными туберкулезом, с отрицательными результатами пробы Манту с 2 ТЕ, без изменений на рентгенограмме грудной клетки на момент включения в исследование.

Все пациенты прошли стандартный комплекс обследования, включающий клиническую оценку заболевания, мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) органов грудной клетки, лабораторные исследования крови, включая исследование активности ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), обследование на туберкулез (проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным — Диаскинтест®, (ГЕНЕРИУМ, Россия), ELISPOT (Оксфорд, Великобритания), ПЦР, микроскопию и посев мокроты или промывных вод на *M. tuberculosis*), гистологическую верификацию изменений (с применением чрезбронхиальной и видеоторакоскопической биопсии легочной ткани и внутригрудных лимфатических узлов).

Диагноз «саркоидоз легких» был установлен на основании характерных рентгенологических изменений (лимфаденопатия средостения, оча-

говых и инфильтративных изменений в легочной ткани по данным МСКТ грудной клетки); результатов гистологического исследования легочной ткани с выявлением эпителиоидно-клеточных гранул без казеозного некроза и кислотоустойчивых микобактерий.

Плазма всех включенных в исследование пациентов, а также здоровых доноров была исследована в ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» с определением образующихся *in vitro* иммунных комплексов (ИК) методом динамического светорассеяния по предложенной методике (заявка на патент № 2015149694; дата публикации 24 мая 2017 г., Филатов М.В., Ланда С.Б.) [7].

Полученная от пациентов плазма крови разбавляется в 4 раза фосфатным буфером, содержащим концентрацию этилендиамин-тетрауксусной кислоты, подвергается центрифугированию в течение 15 минут при 15 тысячах оборотов в минуту и фильтрации через фильтр с размерами пор 100 нм для удаления всех частиц и белковых агрегатов, превышающих данный размер. Измерение динамического светорассеяния (ДСР) полученного препарата должно показывать отсутствие каких-либо образований, превышающих по размеру 100 нм. Измерения проводятся на лазерном корреляционном спектрометре (сертификат RU.С. 39.003. А № 5381) ЛКС-03 (ИНТОКС-МЕД, Россия).

В качестве антигенного материала у всех исследуемых пациентов использовался «экстракт здоровой легочной ткани», а также антигены аллергена туберкулезного рекомбинантного (ESAT-6/SFP-10).

«Экстракт здоровой легочной ткани» был получен в результате специальной обработки здоровой легочной ткани, полученной после проведения экстренных хирургических вмешательств, послуживших причиной резекции легкого. Согласие пациентов было получено.

Непосредственно перед использованием легочная ткань смешивается с фосфатным буфером, содержащим 10 мМ этилендиамин-тетрауксусной кислоты в отношении 1:10, центрифугируется в течение 15 минут при 15 тысяч оборотов в минуту. Полученная жидкая фракция, для исключения присутствия крупных светорассеивающих частиц, пропускается через фильтр с размером пор 0,05 мкм и добавляется в исследуемые образцы плазмы крови.

После добавления *in vitro* указанных антигенов регистрировалось образование иммунных комплексов через 20 минут после подготовки образцов. В случае отсутствия в плазме антител, связывающих компоненты добавленного антигенного материала, распределение частиц плазмы по размерам не изменяется. При наличии антител образуются новые пики на гистограмме, представляющей собой распределение по размерам основных светорассеивателей.

При добавлении антигенного материала новые пики на гистограммах действительно соответствуют образующимся иммунным комплексам, в измеряемую пробу добавляются сефарозные шарики, несущие на своей поверхности стафилококковый белок А, связывающий иммуноглобулины или мышинные антитела, связывающие человеческие иммуноглобулины. Последующее удаление добавленных шариков с помощью центрифугирования сопровождается исчезновением на гистограммах пиков, образовавшихся при добавлении антигенного материала. Это позволяет сделать однозначный вывод о том, что регистрируемые образования действительно содержат иммуноглобулины человека, то есть являются иммунными комплексами.

Статистическая обработка материала, при которой применялись методы вариационной статистики, проводилась с выполнением анализа абсолютных и относительных величин. Количественные данные рассчитывались в виде $M \pm SD$, где M — среднее арифметическое, а SD — стандартное отклонение. Степени ассоциаций между пропорциями оценивались с помощью доверительных интервалов, а также критерия χ^2 с коррекцией Йейтса. Различия или показатели связи считались значимыми при уровне $p < 0,05$.

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВПО «СПбГУ» (выписка из протокола № 02-126 от 30.06.2017, дополнения одобрены 20.06.2018) и Независимым этическим комитетом ФГБУ «СПбНИИФ» Минздрава России (выписка из протокола № 34.2 от 19.01.2017). Все пациенты, включенные в исследование, дали согласие на участие в исследовании.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты комплексного обследования пациентов представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, при стандартном сборе жалоб 21 (63%) пациент сообщил о наличии кашля, 11 (33%) человек беспокоила одышка, кроме того, часть пациентов предъявляла жалобы общего характера, такие как жалобы на потливость — 9 (27%), снижение массы тела — 5 (15%), слабость — 24 (72%). Рентгенологические изменения были представлены очаговыми — 30 (90%) и инфильтративными изменениями — 20 (60%).

Был проведен анализ результатов исследования плазмы крови методом динамического светорассеяния, что представлено в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, после добавления в плазму крови антигенов аллергена туберкулезного рекомбинантного (ESAT-6/SFP-10), регистрировалось образование специфических иммунных комплексов у больных саркоидозом легких в единичных случаях с низким уровнем образования. У здоровых лиц иммунные комплексы не определялись.

При добавлении *in vitro* в плазму крови «экстракта здоровой легочной ткани» достоверно

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ С САРКОИДОЗОМ ЛЕГКИХ
TABLE 1. FEATURES OF PATIENTS WITH LUNG SARCOIDOSIS

Характеристика Features (n = 33)		Число пациентов Number of patients (n/%)
Жалобы Complaints	Кашель Cough	21 (63,6)
	Одышка Dyspnea	11 (33,3)
	Потливость Sweating	9 (27,3)
	Слабость Weakness,	24 (72,7)
	Снижение массы тела Weight loss	5 (15,2)
Положительные результаты иммунологических тестов Positive results of Immunological tests	T-SPOT	0/18 (100,0)
	Кожный тест с аллергеном туберкулезным рекомбинантным Skin test with allergen tuberculosis recombinant	31/16 (93,9)
Изменения на МСКТ грудной клетки Changes in the MSCT of the chest	Увеличение внутригрудных лимфатических узлов Enlargement intrathoracic lymph nodes	28 (84,4)
	Очаговые изменения Focal changes	30 (90,0)
	Инфильтративные изменения Infiltrative changes	20 (60,0)

чаще было зарегистрировано образование иммунных комплексов у пациентов с саркоидозом легких в сравнении с контрольной группой (100% против 4,0%, $p < 0,01$), как видно из таблицы 3.

При анализе полученных данных уровень иммунных комплексов был достоверно выше у пациентов I группы, чем в группе контроля ($p < 0,01$). Чаще всего у пациентов с саркоидозом легких регистрировались иммуноглобулины IgG1 + IgE ($5,69 \pm 1,3$).

Полученная достоверная разница при определении иммунных комплексов после стимуляции антигенами «экстракта здоровой легочной ткани» у пациентов I группы может косвенно являться проявлением аутоиммунного механизма развития саркоидоза легких, реализующегося в виде формирования иммунных комплексов на легочную ткань, вероятно, под воздействием каких-либо факторов. Этот феномен, по-видимому, является существенной частью протекающего патологического процесса, но непосредственная молекулярная причина, запускающая эту патологию, пока остается не ясной. Учитывая доказанную иммуногенетическую предрасположенность к развитию саркоидоза (HLA-DRB1*0301 при остром саркоидозе, HLA-DQB1*0201, DRB1*0301 при рецидивирующем течении заболевания HLA-

DQB1*0602, DRB1*150101 при хроническом активном саркоидозе, HLA-DRB1*11, HLA-DR3 при внелегочных формах) [18], данная реакция может быть генетически обусловлена.

Образование иммунных комплексов на добавление в плазму больных саркоидозом туберкулезных антигенов (ESAT-6/SFP-10) в единичных случаях, может свидетельствовать о возможной роли *M. tuberculosis* как триггерного фактора в развитии саркоидоза, что согласуется с данными, полученными в других исследованиях [11, 13, 20].

Заключение

Формирование *in vitro* иммунных комплексов на «экстракт здоровой легочной ткани» у пациентов с саркоидозом может косвенно свидетельствовать о развитии аутоиммунного процесса под воздействием каких-либо факторов, запускающего развитие саркоидной реакции. Отсутствие формирования *in vitro* специфических иммунных комплексов на специфический антигенный материал больных саркоидозом легких подтверждает отсутствие влияния *M. tuberculosis* как возможной причины развития заболевания, но не исключает наличия латентной туберкулезной инфекции

ТАБЛИЦА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ В ГРУППАХ СРАВНЕНИЯ ПОСЛЕ ИХ СТИМУЛЯЦИИ АНТИГЕНАМИ АЛЛЕРГЕНА ТУБЕРКУЛЕЗНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО (ESAT-6/SFP-10)

TABLE 2. SPECIFIC IMMUNE COMPLEXES IN GROUP OF PATIENTS AFTER STIMULATION WITH ANTIGENS OF THE SPECIFIC ANTIGENS (ESAT-6/SFP-10)

Показатели Features	Группы Groups M±SD/n (%)	
	Больные с саркоидозом легких (I группа) Patients with Lung Sarcoidosis (I group) (n = 33)	Здоровые лица (II группа) Healthy donors (II group) (n = 24)
Иммунные комплексы Immune complexes	0,24±0,83 3 (9)*	0
IgG1	0,16±0,60 2 (6)*	0
IgG3	0*	0
IgE	0,057±0,200 2 (6)*	0
IgG1 + IgG3	0*	0
IgG1 + IgE	0,12±0,70* 2 (6)	0
IgG3 + IgE	0*	0

Примечание. * – отличия значимы ($p > 0,05$ для всех показателей) по сравнению с контрольной группой.

Note. *, differences significant ($p > 0.05$ for all indicators) compared with the control group.

ТАБЛИЦА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ В ГРУППАХ ПОСЛЕ СТИМУЛЯЦИИ АНТИГЕНАМИ «ЭКСТРАКТА ЗДОРОВОЙ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ»

TABLE 3. IMMUNE COMPLEXES IN GROUP OF PATIENTS AFTER THE ADDITION OF "EXTRACT OF HEALTHY LUNG TISSUE"

Показатели Features	Группы Groups M±SD/n (%)	
	Больные с саркоидозом легких (I группа) Patients with Lung Sarcoidosis (I group) (n = 33)	Здоровые лица (II группа) Healthy donors (II group) (n = 24)
Иммунные комплексы Immune complexes	4,84±0,84 33 (100)*	0
IgG1	3,72±1,00 33 (100)*	0
IgG3	2,9±1,0 33 (100)*	0
IgE	1,99±0,60 33 (100)*	0
IgG1 + IgG3	3,46±0,90 33 (100)*	0
IgG1 + IgE	5,69±1,30 23 (70)*	0
IgG3 + IgE	5,05±1,20 23 (70)*	0

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

Note. *, differences are significant ($p < 0.001$ for all indicators) compared with the control group.

у данной когорты больных, которые живут в условиях региона с высоким уровнем распространения данного инфекционного заболевания.

Полученные данные могут служить основой для дальнейших исследований, направленных на понимание природы развития саркоидоза.

Список литературы / References

1. Белокуров М.А., Чернохаева И.В., Цинзерлинг В.А., Двораковская И.В., Новицкая Т.А., Мазитова Ф.М., Карев В.Е., Павлова М.В., Арчакова Л.И., Козак А.Р. Случай дифференциальной диагностики туберкулеза с другими заболеваниями легких // Медицинский альянс, СПб., 2015. № 4. С. 99-109. [Belokurov M.A., Chernokhayeva I.V., Zinserling V.A., Dvorakovskaya I.V., Novitskaya T.A., Mazitova F.M., Karev V.E., Pavlova M.V., Archakova L.I., Kozak A.R. The case of differential diagnosis of tuberculosis with other lung diseases. *Meditsinskiy alyans = Medical Alliance, SPb., 2015, no. 4, pp. 99-109.* (In Russ.)]
2. Визель А.А., Визель И.Ю. Саркоидоз в выступлениях и публикациях ежегодной конференции Американского торакального общества (ATS 2016) // Российский медицинский журнал, 2017. № 3. С. 206-210. [Vizel A.A., Vizel I.Yu. Sarcoidosis in oral presentations and publications of annual conference of American thoracic society (ATS 2016). *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation, 2017, no. 3, pp. 206-210.* (In Russ.)]
3. Визель А.А., Визель И.Ю. Саркоидоз на пути к пониманию // Медицинский альянс, 2013, № 3, С. 73-78. [Vizel I.Yu., Vizel A.A. Sarcoidosis on the road to understanding. *Medical Alliance, 2013, no. 3, pp. 73-78.* (In Russ.)]
4. Визель И.Ю., Визель А.А. Динамика клинических, лучевых и функциональных показателей в процессе лечения больных саркоидозом // Клиническая медицина, 2017, Т. 95, № 1. С. 60-65. [Vizel I.Yu., Vizel A.A. Dynamics of clinical, radiation and functional parameters in the treatment of patients with sarcoidosis. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine (Russian Journal), 2017, Vol. 95, no. 1, pp. 60-65.* (In Russ.)]
5. Диссеминированные заболевания легких / под ред. М.М. Ильковича. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 480 с. [Disseminated lung diseases. Ed. by M.M. Il'kovich]. Moscow: GEOTAR-Media, 2011. 480 p.
6. Ершов Г.А., Чурилов Л.П. О возможности аутоиммунной природы саркоидоза: какие аутоантигены вовлечены и почему? // Клиническая патофизиология, 2017. № 3. С. 77-82. [Ershov G.A., Churilov L.P. About the possibility of autoimmune nature of sarcoidosis: what autoantigens are involved and why? *Klinicheskaya patofiziologiya = Clinical Pathophysiology, 2017, no. 3, pp. 77-82.* (In Russ.)]
7. Кораблев П.В., Ланда С.Б., Семенова Е.В., Филатов М.В. Динамическое светорассеяние – простой и чувствительный метод, позволяющий определять появление иммунных комплексов в биологических жидкостях // Биопрепараты, 2015, № 54. С. 53-58. [Korablev P.V., Landa S.B., Semenova E.V., Filatov M.V. Dynamic light scattering – a simple and sensitive method to determine the occurrence of immune complexes in biological fluids. *Biopreparaty = Biopreparation, 2015, no. 54, pp. 53-58.* (In Russ.)]
8. Ланда С.Б., Филатов М.В., Арутюнян А.В., Варфоломеева Е.В. Исследование образования мегамолекулярных комплексов в плазме крови методом лазерной корреляционной спектроскопии // Клиническая лабораторная диагностика, 2008. № 4. С. 37-41. [Landa S.B., Filatov M.V., Arutyunyan A.V., Varfolomeeva E.V. Study of plasma megamolecular complexation by laser correlation spectroscopy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics, 2008, no. 4, pp. 37-41.* (In Russ.)]
9. Цинзерлинг В.А., Старшинова А.А., Карев В.Е., Новицкая Т.А., Мазитова Ф.М., Белокуров М.А., Васильев И.В., Павлова М.В., Козак А.Р. Гранулематозное воспаление при микоплазменной и хламидийной инфекциях // Журнал инфектологии, 2015. Т. 7, № 4. С. 5-9. [Zinserling V.A., Starshinova A.A., Karev V.E., Novitskaya T.A., Mazitova F.M., Belokurov M.A., Vasiliev I.V., Pavlova M.V., Kozak A.R. Granulomatous inflammation of Mycoplasma and Chlamydia etiology. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology, 2015, Vol. 7, no. 4, pp. 5-9.* (In Russ.)]
10. Bindoli S., Dagan A., Torres-Ruiz J.J., Perricone C., Bizjak M., Doria A., Shoenfeld Y. Sarcoidosis and autoimmunity: from genetic background to environmental factors. *Isr. Med. Assoc. J., 2016, Vol. 18, no. 3-4, pp. 197-202.*
11. Dubaniewicz A. Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins and autoimmunity in sarcoidosis. *Autoimmun. Rev., 2010, Vol. 9, no. 6, pp. 419-424.*
12. Ferrara G., Valentini D., Rao M., Wahlstrom J., Grunewald J., Larsson L.-O., Brighenti S., Dodoo E., Zumla A., Maeurer M. Humoral immune profiling of mycobacterial antigen recognition in sarcoidosis and Lofgren's syndrome using high-content peptide microarrays. *Int. J. Infect. Dis., Vol. 56, pp. 167-175.*
13. Goyal B., Sheikh J.A., Agarwal R., Verma I. Levels of circulating immune complexes containing Mycobacterium Tuberculosis-specific antigens in pulmonary tuberculosis and sarcoidosis patients. *Indian J. Med. Microbiol., 2017, Vol. 35, pp. 290-292.*
14. Gupta D., Agarwal R., Aggarwal A.N., Verma I. Immune responses to mycobacterial antigens in sarcoidosis: a systematic review. *Indian J. Chest. Dis. Allied. Sci., 2011, Vol. 53, no. 1, pp. 41-49.*
15. Gupta D., Agarwal R., Aggarwal A.N., Jindal S.K. Sarcoidosis and tuberculosis: the same disease with different manifestations or similar manifestations of different disorders. *Curr. Opin. Pulm. Med., 2012, Vol. 18, no. 5, pp. 506-516.*
16. Jamilloux Y., Valeyre D., Lortholary O., Bernard C., Kerever S., Lelievre L., Neel A., Broussolle C., Seve P. The spectrum of opportunistic diseases complicating sarcoidosis. *Autoimmun. Rev., 2015, Vol. 14, no. 1, pp. 64-74.*
17. Lebedev A.D., Ivanova M.A., Lomakin A.V., Noskin V.A. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl. Opt., 1997, Vol. 36, no. 30, pp. 7518-7522.*
18. Ohshima K., Kuroda N. Proteomic approaches to profiling the humoral immune response and identifying disease-associated antigens. *Biol. Pharm. Bull., 2012, Vol. 35, no. 9, pp. 1409-1412.*

19. Ohyama K., Ueki Y., Kawakami A., Kishikawa N., Tamai M., Osaki M., Kamihira S., Nakashima K., Kuroda N. Immune complexome analysis of serum and its application in screening for immune complex antigens in rheumatoid arthritis. *Clin Chem.*, 2011, Vol. 57, no. 6, pp. 905-909.

20. Shoenfeld Y., Agmon-Levin N. "ASIA" – autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J. Autoimmun.*, 2011, Vol. 36, no. 1, pp. 4-8.

Авторы:

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

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

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

Денисова Н.В. — врач функциональной диагностики, младший научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

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

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

Authors:

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

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

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

Denisova N.V., Doctor of Functional Diagnostic, Junior Research Associate, St. Petersburg State Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Burdakov V.S., Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Cell Biology, Research Associate, St. Petersburg State Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg; St. Petersburg B. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, National Research Center "Kurchatov Institute", Gatchina, Leningrad Region

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

Поступила 09.03.2018

Отправлена на доработку 22.03.2018

Принята к печати 19.09.2018

Received 09.03.2018

Revision received 22.03.2018

Accepted 19.09.2018

ОЦЕНКА РОЛИ ЦИТОКИН-ОПОСРЕДОВАННЫХ МЕХАНИЗМОВ В РАЗВИТИИ ДИСФУНКЦИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Калинина Е.П.¹, Гельцер Б.И.¹, Курпатов И.В.¹, Горборукова Т.В.¹,
Гвозденко Т.А.²

¹ ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ,
г. Владивосток, Россия

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

Резюме. Исследованы силовые индикаторы дыхательных мышц (ДМ) у 85 мужчин в возрасте 39–78 лет, находившихся на стационарном лечении по поводу обострения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) различной степени тяжести. На аппарате MicroRPM (CareFusion, Великобритания) определяли уровни максимального экспираторного (MEP) и инспираторного (MIP) давлений в ротовой полости, а также уровень интраназального давления при выполнении SNIP-теста. Измеренные величины MEP, MIP и SNIP соотносили с должными. В сыворотке крови определяли концентрацию цитокинов: IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-21, TNF α , IFN γ и TGF- β . Для обработки результатов исследования использовали методы канонического анализа и кластеризации. У больных ХОБЛ легкой степени регистрировался экспираторный тип дисфункции ДМ, при среднетяжелой и тяжелой — экспираторно-инспираторный, а при крайне тяжелой преобладала дисфункция диафрагмы. Кластерный анализ позволил выделить 3 группы больных с характерными комбинациями индикаторов силы ДМ и иммунных показателей. Цитокиновый профиль первого кластера отличался максимальной концентрацией IL-17A, IL-21, TNF α и TGF- β , а силовые индикаторы ДМ имели минимальные значения. Во втором кластере снижение силовых индикаторов на 25–40% по отношению к контролю сочеталось с резким подъемом IL-6 на фоне умеренного повышения IL-21 и TGF- β . У больных третьего кластера регистрировался максимальный уровень IL-6, IL-10 и IFN γ при относительно низких значениях IL-17A, IL-21 и TGF- β , а показатели MEP, MIP и SNIP достоверно не различались от их уровня во втором кластере. Результаты канонического и корреляционного анализа указывали на наличие взаимосвязей как отдельных цитокинов, так и их пула с показателями силы ДМ, выраженностью одышки и функциональным статусом больных ХОБЛ, что подтверждало участие цитокин-опосредованных механизмов в развитии респираторной мышечной дисфункции.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, дыхательные мышцы, цитокины

Адрес для переписки:

Калинина Елена Петровна
ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»
Министерства науки и высшего образования РФ
690066, Россия, г. Владивосток, ул. Печорская, 8.
Тел.: 8 (904) 627-07-26.
E-mail: kalinina72@yandex.ru

Address for correspondence:

Kalinina Elena P.
Far Eastern Federal University, Vladivostok,
Russian Federation
690066, Russian Federation, Vladivostok, Pechorskaya str., 8.
Phone: 7 (904) 627-07-26.
E-mail: kalinina72@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.П. Калинина, Б.И. Гельцер, И.В. Курпатов,
Т.В. Горборукова, Т.А. Гвозденко «Оценка роли
цитокин-опосредованных механизмов в развитии
дисфункции дыхательных мышц у больных хронической
обструктивной болезнью легких» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 487-494.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-487-494

© Калинина Е.П. и соавт., 2019

For citation:

E.P. Kalinina, B.I. Geltser, I.G. Kurpatov, T.V. Gorborkova,
T.A. Gvozdenko "Evaluation of cytokine-mediated mechanisms
involved in development of respiratory muscle dysfunction
in the patients with chronic obstructive pulmonary disease",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 3, pp. 487-494.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-487-494

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-487-494

EVALUATION OF CYTOKINE-MEDIATED MECHANISMS INVOLVED IN DEVELOPMENT OF RESPIRATORY MUSCLE DYSFUNCTION IN THE PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Kalinina E.P.^a, Geltser B.I.^a, Kurpatov I.G.^a, Gorborukova T.V.^a, Gvozdenko T.A.^b

^a Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^b Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology – Institute of Medical Climatology and Rehabilitation, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Respiratory muscle (RM) strength was studied in 85 men with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The strength indicators of expiratory (MEP) and inspiratory pressure (MIP, SNIP) in oral cavity were registered by means of the MicroRPM device (CareFusion, UK), as well as intranasal pressure levels by SNIP test. The measured MEP, MIP и SNIP values were compared to the proper indices. Serum concentrations of cytokines (IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-21, TNF α , IFN γ and TGF- β) were determined. The results of the study were processed by means of canonical analysis and by clustering methods. Expiratory RM dysfunction was recorded in mild COPD, expiratory-inspiratory RM dysfunction was recorded in moderate COPD and the diaphragm dysfunction was recorded in severe COPD. Three groups of patients with different combinations of RM strength indicators and immune parameters were identified by means of cluster analysis. The cytokine profile in the first cluster was characterized by maximal concentrations of IL-17A, IL-21, TNF α and TGF- β , whereas RM strength indexes showed minimal values. In the second cluster, a decrease of RM strength indicators by 25-40% against control was associated with a sharp rise of IL-6, along with moderate increase of IL-21 and TGF- β concentrations. In the third cluster, maximal levels of IL-6, IL-10 and IFN γ were registered, along with low levels of IL-17A, IL-21 and TGF- β concentrations, whereas MEP, MIP и SNIP values did not sufficiently differ from their levels in second cluster. The results of canonical and correlation analysis indicated to interconnections between either certain cytokines, or their pool with the RM strength indicators, dyspnea severity and functional state of COPD patients, thus suggesting involvement of cytokine-mediated mechanisms in pathogenesis of the respiratory muscle dysfunction.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, respiratory muscles, cytokines

Введение

Дыхательные мышцы (ДМ) являются эффекторным аппаратом респираторной системы, обеспечивающим альвеолярную вентиляцию в соответствии с текущими запросами организма. Силу ДМ относят к важнейшим индикаторам их функционального состояния, а также к независимым предикторам развития дыхательной недостаточности и кардиоваскулярных осложнений [6]. Определение силы ДМ чаще всего осуществляют путем измерения статических давлений при «закрытых» дыхательных путях во время максимального вдоха и выдоха: максимального инспираторного (MIP – Maximum Inspiratory Pressure), экспираторного (MEP – Maximum Expiratory Pressure) и интраназального (SNIP – Sniff Nasal Inspiratory Pressure) давлений. Показатель MEP является индикатором силы экспираторных ДМ, а MIP и SNIP – инспираторных. Кроме того, показатель SNIP тесно коррелирует с уровнем трансдиафрагмального давления, что позволяет относить его к маркерам функциональной активности диафрагмы [9].

Дисфункция ДМ является одним из важнейших проявлений хронической обструктивной

болезни легких (ХОБЛ), а ее развитие тесно ассоциировано с патофизиологическими последствиями ремоделирования органов дыхания и системными проявлениями данной патологии. К последним относят хроническое системное воспаление (ХСВ), оксидативный стресс, избыточный протеолиз и другие типовые патологические процессы, продукты которых изменяют структурно-функциональную организацию ДМ и ограничивают их сократительный потенциал. Взаимодействие локальных и системных факторов заболевания формирует своеобразный метаболический фон, способствующий развитию коморбидности у больных ХОБЛ, что в полной мере относится к дисфункции поперечнополосатой мускулатуры, в том числе ДМ. ХСВ рассматривают как «классическое» проявление ХОБЛ, которое характеризуется тотальной воспалительной реактивностью клеточных и плазменных факторов крови, структурных элементов сосудистой стенки и мышечной ткани, а также нарушением микроциркуляции. К основным медиаторам ХСВ относят провоспалительные цитокины (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-22), фактор некроза опухоли – α (TNF α),

матриксные протеиназы, С-реактивный белок, фибриноген, лейкотриен-В₄ и др. [16]. Доказано также, что в условиях резистивного дыхания усиленно сокращающиеся миоциты ДМ сами являются источниками продукции цитокинов. Так, у больных ХОБЛ в миоцитах диафрагмы и межреберных мышц происходит выраженное усиление экспрессии IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF α и γ -интерферона (IFN γ) [1]. Показано, что избыточная продукция этих цитокинов связана с повреждением сарколеммы, а дисфункция ДМ тесно коррелирует с экспрессией TNF α [7]. Установлено, что даже у здоровых лиц через 45 минут дыхания с добавочной инспираторной нагрузкой происходит достоверное увеличение концентрации в плазме крови IL-1 β , IL-6 и TNF α [1]. Таким образом, резистивное дыхание рассматривается как «иммунный вызов» организму, который заключается в повышении локального и системного уровня цитокинов и их участия в повреждении ДМ. Вместе с тем роль иммунного фактора в развитии дисфункции ДМ у больных ХОБЛ до конца не изучена, и многие аспекты этой проблемы нуждаются в уточнении.

Цель исследования состояла в оценке роли цитокин-опосредованных механизмов в развитии дисфункции ДМ у больных ХОБЛ.

Материалы и методы

В исследование было включено 85 мужчин с ХОБЛ в стадии обострения, находившихся на лечении в Региональном пульмонологическом центре КГБУЗ «Приморская краевая клиническая больница № 1». Возраст обследованных был в диапазоне 39-78 лет (средний возраст – 64,5 $\pm$ 2,3 года). Индекс курильщика (ИК) больных варьировал от 20 до 100 пачка/лет. Диагноз ХОБЛ устанавливали на основании критериев Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease – Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики ХОБЛ (GOLD, 2017 год). Пациенты были ранжированы на 4 группы в зависимости от степени тяжести заболевания согласно классификации GOLD: GOLD I (n = 16), GOLD II (n = 30), GOLD III (n = 24) и GOLD IV (n = 15). Контрольную группу составили 48 здоровых некурящих мужчин того же возраста. Исследование выполнялось после подписания участниками информированного согласия. Комплексная оценка функционального статуса больных проводилась с использованием шкал Медицинского исследовательского центра (modified Medical Research Council – mMRC) и CAT (COPD Assessment Test), регистрации показателей внешнего дыхания и газометрических параметров артериальной крови.

Оценку силовых характеристик ДМ (MEP, MIP и SNIP) у пациентов выполняли на аппарате MicroRPM (CareFusion, Великобритания). Их

регистрация у обследуемых проводилась в положении сидя после трехкратного выполнения дыхательных маневров. При этом фиксировалась попытка с максимальным результатом. Должные величины для MEP, MIP и SNIP вычисляли по ранее разработанным регрессионным моделям [13]. Концентрацию цитокинов в сыворотке крови (TNF α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-21, IFN γ и трансформирующего фактора роста- β – TGF- β) определяли методом проточной цитометрии на аппарате BD FACS Canto II (США) с помощью тест-системы этой компании. Данные обрабатывали с использованием программы FCAP Array 3.0.

Комплексный анализ взаимосвязей иммунных факторов и силовых индикаторов ДМ проводили методами канонического анализа (модуль Canonical Analysis в программе Statistica 6) и кластеризации К-средними [4]. Рассчитывали коэффициенты канонической (CR) и парной корреляции (r) по Пирсону.

Результаты

Результаты исследования показали, что уже при легкой форме ХОБЛ у большинства больных регистрируется достоверное снижение показателя MEP (на 21,1% по отношению к контролю), что может свидетельствовать о некотором ограничении кинетической энергии выдыхаемого воздуха, обусловленном дисфункцией экспираторных ДМ. При нарастании тяжести ХОБЛ величина MEP заметно снижалась, а ее уровень при крайне тяжелой форме заболевания был в 2 раза ниже контрольных значений. Сопоставление фактически измеренных величин MEP с должными показало, что степень их отклонения от персонифицированных нормативов зависит от тяжести заболевания. Так, при крайне тяжелом течении ХОБЛ уровень MEP составлял лишь 53,8% от должного, а при легком – 79,6%. Значение MIP при легкой форме ХОБЛ достоверно не отличалось от контроля и соответствовало должным величинам. Вместе с тем на более поздних стадиях заболевания сократительная функция инспираторных ДМ существенно ухудшалась. Так, при ХОБЛ средней тяжести уровень MIP по отношению к контролю снижался в 1,4 раза, а при крайне тяжелой – в 2,3 раза. При этом соотношение измеренных величин MIP с должными у больных с крайне тяжелой ХОБЛ составило 54,3%, а при среднетяжелой – 77,3%. На преобладание дисфункции экспираторных или инспираторных ДМ на различных стадиях заболевания указывает динамика индекса MEP/MIP. Так, при ХОБЛ легкой степени регистрировалась дисфункция только экспираторных мышц, что иллюстрировалось снижением данного индекса за счет сокращения величины MEP. Для среднетяжелой и тяжелой ХОБЛ было харак-

терным симметричное снижение МЕР и МІР, что демонстрировало ограничение функциональной активности обеих мышечных групп. При крайне тяжелом течении заболевания индекс МЕР/МІР достоверно возрастал по сравнению с контролем за счет более заметного снижения МІР. Эти изменения свидетельствовали о преобладании дисфункции инспираторных мышц. Уровень SNIP, так же как и МІР, у больных с легкой формой ХОБЛ достоверно не отличался от здоровых лиц. Однако при прогрессировании ХОБЛ отмечалось нарастающее сокращение величины данного показателя, которое достигало минимальных значений при крайне тяжелой форме заболевания. Схожая динамика фиксировалась и при сравнении измеренных величин SNIP с должными. Так, при ХОБЛ средней тяжести это соотношение составляло 75,1%, а при крайне тяжелой — 46,2%, что указывало на резкое ограничение функциональной активности диафрагмы.

Кластерный анализ позволил выделить 3 группы больных с характерными комбинациями индикаторов силы ДМ и иммунологических показателей (табл. 1). В первый кластер вошли 39 (46%) пациентов с ХОБЛ тяжелого и крайне тяжелого течения. Их цитокиновый профиль по сравнению с группой контроля отличался самыми высокими значениями TGF- β , TNF α , IL-17A и IL-21 на фоне неизменных по отношению к здоровым лицам уровней IL-4 и IL-6. При этом силовые индикаторы ДМ имели минимальные значения и были ниже, чем у здоровых лиц в 1,7–2 раза.

Второй кластер составили 23 (27%) пациентов с ХОБЛ среднетяжелого течения. Сравнительный анализ их цитокинового профиля с контролем показал умеренное повышение уровней TNF α , IL-21, TGF- β на фоне резкого подъема IL-6. Силовые индикаторы ДМ в этом кластере были ниже группы контроля в 1,4, 1,25 и 1,3 раза соответственно. В третий кластер вошли 23 (27%) пациента, 16 из которых было с легким течением ХОБЛ и 7 со среднетяжелым. Оценка их цитокинового профиля позволила установить максимальное возрастание уровней IFN γ , IL-6 и IL-10 при относительно низких значениях IL-17A, IL-21 и TGF- β по сравнению с больными первых двух кластеров. При этом показатели МЕР, МІР и SNIP достоверно не отличались от их уровня во втором кластере, но были достоверно ниже, чем в первом. Сопоставление фактически измеренных индикаторов силы ДМ с должными показал, что у больных первого кластера уровень показателей МЕР, МІР и SNIP составлял, соответственно, 62,6, 56,2 и 55,7% от ДВ, что указывало на значительное ограничение сократительной функции экспираторных и инспираторных ДМ. Абсолютные и относительные величины показателей силы ДМ во втором и третьем кластере были умеренно снижены и не отличались между собой.

Анализ парных корреляций показал, что между индикаторами силы ДМ и некоторыми цитокинами имеют место разнонаправленные взаимосвязи различной интенсивности. Так, показатель SNIP положительно коррелировал с IL-6 ($r = 0,62$; $p = 0,011$) и TGF- β ($r = 0,51$; $p = 0,016$) и отрицательно — с IL-17A ($r = -0,47$; $p = 0,021$), TNF α ($r = -0,67$; $p = 0,012$) и IL-21 ($r = -0,62$; $p = 0,017$). Уровень МЕР имел положительную взаимосвязь с TGF- β ($r = 0,49$; $p = 0,023$) и отрицательную — с IL-17A ($r = -0,44$; $p = 0,037$). Установлены также отрицательные корреляции МІР с IL-21 ($r = -0,58$; $p = 0,011$) и TNF α ($r = -0,52$; $p = 0,038$). Кроме того, положительные взаимосвязи регистрировались между IL-21 и TNF α и средними значениями баллов, характеризующих выраженность одышки в тесте mMRC и функциональный статус больных в САТ-тесте ($r_1 = 0,48$, $r_2 = 0,62$, $r_3 = 0,54$ и $r_4 = 0,42$; $p_1 = 0,013$, $p_2 = 0,027$, $p_3 = 0,032$ и $p_4 = 0,025$). Канонический анализ позволяет исследовать зависимость между двумя наборами переменных и применяется для проверки гипотез в различных областях знаний. Чем выше уровень CR, тем больший вклад вносят соответствующие переменные в результирующую взаимосвязь двух подмножеств анализируемых признаков [5]. В нашем исследовании была установлена тесная корреляция пула цитокинов с показателем SNIP (CR = +0,74; $p = 0,0025$), а также их взаимосвязи средней и слабой интенсивности с МЕР (CR = +0,6; $p = 0,048$) и МІР (CR = +0,31; $p = 0,048$), что указывает на неоднородность вклада иммунных факторов в патогенез нарушений сократительной функции отдельных групп ДМ. Полученные результаты свидетельствуют также об участии цитокин-опосредованных механизмов в ремоделировании ДМ и изменении их функционального статуса при прогрессировании ХОБЛ. С учетом однотипности процессов взаимодействия, кооперации и регуляции клеток иммунной системы можно судить о характере влияния этих факторов на сократительную функцию ДМ. Так, незначительное ее снижение развивалось на фоне максимальной концентрации в сыворотке крови IFN γ , IL-6 и IL-10, умеренное было сопряжено с высоким уровнем TGF- β , IL-6 и IL-21 и незначительным повышением IL-4, а выраженное ассоциировалось с резким подъемом TGF- β , TNF α , IL-17A и IL-21 при идентичном контролю уровне секреции IL-6.

Обсуждение

Сила ДМ является важнейшим индикатором их функционального состояния, а ее исследование получает все большее распространение в различных областях клинической медицины в качестве дополнительного инструмента для комплексной оценки респираторных функций. Снижение сократительной способности

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ СИЛЫ ДМ И КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХОБЛ В РАЗЛИЧНЫХ КЛАСТЕРАХ (M±m)

TABLE 1. INDICATORS OF RESPIRATORY MUSCLE STRENGTH AND SERUM CYTOKINE CONCENTRATIONS OF PATIENTS WITH VARIOUS CLUSTERS OF COPD (M±m)

Показатели Indicators	Группа контроля Control group (n = 48)	Кластеры Clusters			Достоверность Significance
		1 кластер 1 cluster (n = 39)	2 кластер 2 cluster (n = 23)	3 кластер 3 cluster (n = 23)	
MEP, см вод. ст. MEP, mm water column	132,7±8,4	71,6±2,2	93,8±7,9	97,4±4,1	$p_{1-2} < 0,0001$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} = 0,54$
MEP, % от ДВ MEP, % proper values	104,5±4,6	62,6±3,2	74,7±4,2	79,6±5,5	$p_{0-1} < 0,0001$ $p_{0-2} < 0,0001$ $p_{0-3} < 0,0001$
MIP, см вод. ст. MIP, mm water column	98,5±4,9	49,6±3,4	79,1±5,8	85,1±2,5	$p_{1-2} > 0,0001$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} = 0,37$
MIP, % от ДВ MIP, % proper values	103,2±7,2	56,2±4,7	78,3±6,3	91,3±7,2	$p_{0-1} < 0,0001$ $p_{0-2} = 0,0015$ $p_{0-3} = 0,034$
SNIP, см вод. ст. SNIP, mm water column	100,6±4,8	58,6±3,4	76,9±5,9	86,8±2,9	$p_{1-2} < 0,0001$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} = 0,12$
SNIP, % от ДВ SNIP, % proper values	97,7±3,4	55,7±3,1	76,8±5,5	90,3±5,3	$p_{0-1} < 0,0001$ $p_{0-2} = 0,0027$ $p_{0-3} = 0,017$
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	77,9±3,7	69,1±3,3	61,8±2,1	63,2±4,6	$p_{1-2} = 0,64$ $p_{1-3} = 0,074$ $p_{2-3} = 0,38$ $p_{0-1} = 0,062$ $p_{0-2} = 0,035$ $p_{0-3} = 0,042$
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	38,2±1,2	30,8±3,3	61,4±5,6	65,8±3,2	$p_{1-2} < 0,0001$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} = 0,15$ $p_{0-1} = 0,065$ $p_{0-2} < 0,0001$ $p_{0-3} < 0,0001$
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	32,4±1,8	47,9±2,3	50,7±2,4	55,4±3,1	$p_{1-2} < 0,0001$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} = 0,42$ $p_{0-1} = 0,0015$ $p_{0-2} < 0,0001$ $p_{0-3} < 0,0001$
TNFα, пг/мл TNF α , pg/ml	44,3±2,1	66,3±4,7	57,1±2,2	48,9±7,8	$p_{1-2} = 0,08$ $p_{1-3} = 0,074$ $p_{2-3} = 0,19$ $p_{0-1} < 0,0001$ $p_{0-2} < 0,0001$ $p_{0-3} = 0,24$
IFNγ, пг/мл IFN γ , pg/ml	103,5±4,9	124±6,3	126,4±6,2	152,9±8,1	$p_{1-2} = 0,027$ $p_{1-3} = 0,0011$ $p_{2-3} = 0,015$ $p_{0-1} = 0,0017$ $p_{0-2} = 0,021$ $p_{0-3} = 0,00026$

Показатели Indicators	Группа контроля Control group (n = 48)	Кластеры Clusters			Достоверность Significance
		1 кластер 1 cluster (n = 39)	2 кластер 2 cluster (n = 23)	3 кластер 3 cluster (n = 23)	
IL-17A, пг/мл IL-17A, pg/ml	378,4±20,2	502,3±26,4	415,3±14,9	389,8±23,2	$p_{1-2} < 0,0001$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} = 0,17$ $p_{0-1} = 0,0015$ $p_{0-2} = 0,056$ $p_{0-3} = 0,37$
IL-21, пг/мл IL-21, pg/ml	75,5±3,6	191,3±17,1	125,1±17,3	100,7±12,3	$p_{1-2} = 0,00078$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} = 0,28$ $p_{0-1} < 0,0001$ $p_{0-2} < 0,0001$ $p_{0-3} = 0,0056$
TGF-β, пг/мл TGF-β, pg/ml	150,0±6,7	237,0±12,7	184,1±9,9	168,6±8,6	$p_{1-2} = 0,0013$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} = 0,47$ $p_{0-1} = 0,0017$ $p_{0-2} = 0,037$ $p_{0-3} = 0,054$

Примечание. Достоверность различий между кластерами: p_{1-2} – первым и вторым; p_{2-3} – вторым и третьим; p_{1-3} – первым и третьим; p_{0-1} – между группой контроля и первым кластером; p_{0-2} – между группой контроля и вторым кластером; p_{0-3} – между группой контроля и третьим кластером.

Note. Significance of differences in different clusters: p_{1-2} , first and second; p_{2-3} , second and third; p_{1-3} , first and third; p_{0-1} , control group and first cluster; p_{0-2} , control group and second cluster; p_{0-3} , control group and third cluster.

ДМ, проявляющееся их утомлением или слабостью, относят к важнейшим механизмам развития или усугубления дыхательной недостаточности у больных ХОБЛ [2]. Именно поэтому точная информация о функциональном статусе моторного аппарата органов дыхания является основой для ранней диагностики его нарушений и своевременной коррекции. Результаты наших исследований показали, что индикаторы силы экспираторных и инспираторных мышц тесно связаны со стадией ХОБЛ. Было установлено, что по мере ее прогрессирования происходит снижение абсолютных значений силы ДМ и увеличение степени их отклонения от должных величин, а минимальный уровень данных показателей фиксируется при крайне тяжелой форме заболевания. У больных с легкой формой ХОБЛ снижается сила только экспираторных мышц, а на более тяжелых стадиях заболевания развивается дисфункция инспираторных ДМ, включая диафрагму. При этом степень отклонения показателя SNIP от должных величин у больных первого кластера с крайне тяжелой и тяжелой формой ХОБЛ составляла 55,7%, что демонстрировало резкое ограничение функциональных ресурсов главного инспиратора. В ряде исследований было показано, что диафрагма более устойчива к утомлению, чем лестничные и грудно-ключично-сосцевидные мышцы. Однако на фоне первично развивающейся дисфункции вспомогательных ДМ и на-

растания добавочного сопротивления дыханию происходит увеличение нагрузки на диафрагму и ее утомление [14].

В формировании дисфункции ДМ важная роль принадлежит ХСВ, эффекты которого реализуются в том числе через спектр продуцируемых цитокинов [1]. Избыточная и генерализованная продукция провоспалительных цитокинов способствует развитию системных органных дисфункций. Некоторые авторы используют термин «кахексия», имея в виду потерю белковой массы у больных ХОБЛ вследствие персистирующего воспалительного процесса, активирующегося основными провоспалительными цитокинами (TNF α , IL-17A и IL-21) [8]. IL-6 и IL-10, освобождаемые при сокращении скелетных мышц, создают системную противовоспалительную среду и оказывают эндокринное действие на метаболизм глюкозы и липидов, что оказывает энергетическую поддержку ДМ в условиях избыточной инспираторной нагрузки [11]. В нашей работе была выявлена зависимость функционального статуса ДМ от уровня секреции цитокинов, что подтверждалось результатами кластеризации, которая позволила выделить группы больных с характерными функционально-иммунологическими признаками. Так, например, у больных с крайне тяжелой и тяжелой ХОБЛ высокая концентрация TNF α , IL-17A и IL-21 и неизменный по отношению к контролю уровень секреции

IL-6 ассоциировались с более значительным ограничением силы ДМ. Результаты исследования свидетельствуют о том, что при нарастающем сопротивлении дыханию на различных этапах становления ХОБЛ у больных формируются определенные фенотипы респираторно-мышечной дисфункции, ассоциированные с различными вариантами иммунологических реакций, участвующих в процессах ограничения сократительной функции ДМ и их адаптации к хронической перегрузке респираторной системы. Наличие такой взаимосвязи подтверждалось результатами канонического и корреляционного анализа.

К ключевым цитокинам, вовлеченным в регуляцию дифференцировки Th-субпопуляций относят IFN γ и TNF α , что позволяет рассматривать их в качестве иммунорегуляторов, способных контролировать клональную экспансию и эффекторные функции Th-клеток и влиять на функциональную дифференцировку наивных CD4 T-клеток. Это главная часть адаптивного иммунного ответа, обеспечивающая активацию макрофагов и Т-киллеров [8]. Наше исследование позволило установить взаимосвязь IFN γ и TNF α с показателями силы ДМ. Основное влияние на реализацию воспалительной реакции оказывают цитокины, продуцируемые активированными моноцитами и макрофагами, в частности IL-6 и TNF α , а также локальными клетками в очаге воспаления. Представленные в последние годы исследования свидетельствуют о том, что скелетные мышцы производят различные молекулы, деноминированные «миокины», которые действуют аутокринно, паракринно и эндокринно [10]. В ряде работ было показано, что наиболее важным миокином является IL-6, а его продукция — это ответ мышечной ткани на метаболический «запрос», инициированный физической нагрузкой [15]. Внутри скелетных мышц IL-6 активирует АМФ-активируемую протеинкиназу и фосфоинозитид-3-киназу, чтобы увеличить энергетические субстраты, необходимые для мышечного сокращения. В нашем исследовании секреция IL-6 статистически значительно увеличивалась среди пациентов с незначительным снижением силы ДМ и снижалась при выраженных формах их дисфункции. Во время интенсивной работы респираторных мышц IL-6 проявляет противовоспалительные эффекты, подавляя синтез IL-1 и TNF α и стимулируя продукцию IL-10 на локальном и системном уровнях [12]. Переключение баланса цитокинов в сторону

преобладания противовоспалительных медиаторов во многом обусловлено индукцией анергии моноцитов/макрофагов. Нами была установлена закономерность нарастания концентрации противовоспалительного миокина IL-10 у больных ХОБЛ: с легкими нарушениями сократительной функции ДМ его концентрация по отношению к контролю возрастала на 71%, со среднетяжелыми — на 56%, а с тяжелыми — на 48%. Продуцируемый моноцитами/макрофагами IL-10 оказывал прямое супрессорное действие на Т-лимфоциты и маркеры активации миофибрилл, приводящих к структурно-функциональной перестройке респираторных мышц, вовлеченных в хронический воспалительный процесс при ХОБЛ.

Наше исследование позволило установить существенное возрастание уровня IL-17A среди больных с выраженной дисфункцией ДМ. Кроме того, к основным изменениям цитокинового профиля больных ХОБЛ можно было отнести увеличение TNF α и IL-10, которые могут перепрограммировать линию Т-клеток, экспрессирующих IL-17A. У больных ХОБЛ с высоким содержанием IL-17A, IL-6, TNF α фиксировался относительно невысокий подъем IFN γ . В клетках Th17 образуется несколько цитокинов, включая IL-17A, IL-6, TNF α и IL-21. IL-17A индуцирует инфильтрацию, привлечение и активацию нейтрофилов и рекрутирование макрофагов из очага поражения, вызывая системные эффекты при ХОБЛ, связанные в том числе с ремоделированием ДМ. В настоящее время считается, что иммунный ответ, развивающийся по Th17-типу является результатом длительного системного персистирующего воспаления [3].

Известно, что TGF- β является ингибитором высвобождения TNF α в систему гемокрикуляции, поэтому при увеличении синтеза TNF α закономерно активируется секреция TGF- β , что и происходит у пациентов со стойкими нарушениями функции ДМ. При этом концентрация TGF- β в системном кровотоке постепенно увеличивалась и была синхронизирована с выраженностью дисфункции ДМ. Полагают, что TGF- β является цитокином системного действия и является ключевым медиатором в процессах образования пенстых клеток, воспаления, склероза и фиброгенеза [8]. Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о важной роли цитокин-опосредованных механизмов в развитии дисфункции ДМ у больных ХОБЛ, что необходимо учитывать при разработке программ персонализированной терапии.

Список литературы / References

1. Александрова Н.П. Цитокины и резистивное дыхание // Физиология человека, 2012. Т. 38, № 2. С. 119-129. [Aleksandrova N.P. Cytokines and resistive breathing. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology*, 2012, Vol. 38, no. 2, pp. 119-129.
2. Александрова Н.П., Бреслав И.С. Дыхательные мышцы человека: три уровня управления // Физиология человека, 2009. Т. 35, № 2. С. 103-111. [Aleksandrova N.P., Breslav I.S. Human respiratory muscles: Three levels of control. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology*, 2009, Vol. 35, no. 2, pp. 103-111.

3. Болдина М.В., Постникова Л.Б., Кубышева Н.И., Соодаева С.К. Участие провоспалительных цитокинов IL-17, IL-18 и TNF- α в развитии нарушений легочной и внутрисердечной гемодинамики при хронической обструктивной болезни легких // Пульмонология, 2014. Т. 1. С. 32-37. [Boldina M.V., Postnikova L.B., Kubysheva N.I., Soodaeva S.K. A role of proinflammatory cytokines IL-17, IL-18 and TNF- α in pulmonary and intracardiac haemodynamic disorders in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonologiya = Russian Pulmonology*, 2014, Vol. 1, pp. 32-37.]
4. Бююль А., Цёфель П. SPSS: искусство обработки информации, анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей. СПб.: ООО «ДиаСофтЮП», 2002. 608 с. [Bühl A., Zöfel P. SPSS Version 10: Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows]. SBR. Addison-Wesley, 2000, p. 734.]
5. Ефимов В.М. Многомерный анализ биологических данных. 2015. [Efimov V.M. Multidimensional analysis of biological data]. 2015.
6. Barreiro E., Gea J. Respiratory and limb muscle dysfunction in COPD. *COPD*, 2014, Vol. 12, no. 4, pp. 413-426.
7. Dargelos E., Renaud V., Decossas M., Bure C., Lambert O., Poussard S. Caveolae-mediated effects of TNF- α on human skeletal muscle cells. *Exp. Cell Res.*, 2018, Vol. 370, no. 2, pp. 623-631.
8. de Troyer A., Wilson T.A. Effect of acute inflation on the mechanics of the inspiratory muscles. *J. Appl. Physiol.*, 2009, Vol. 107, no. 1, pp. 315-323.
9. Kaminska M., Noel F., Petrof B.J. Optimal method for assessment of respiratory muscle strength in neuromuscular disorders using sniff nasal inspiratory pressure (SNIP). *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 5, e0177723. doi: 10.1371/journal.pone.0177723.
10. Keller C., Steensberg A., Pilegaard H., Osada T., Saltin B., Pedersen B.K., Neufer P.D. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB J.*, 2001, Vol. 15, pp. 2748-2750.
11. Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscle as endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.*, 2008, Vol. 88, pp. 1379-1406.
12. Pratesi A., Tarantini F., di Bari M. Skeletal muscle: an endocrine organ. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.*, 2013, Vol. 10, no. 1, pp. 11-14.
13. Rodrigues A., Silva M., Berton D., Faubert D., Tang J., Zapotichny A., Crozier-Wells L., Muir C., Forkert L., O'Donnell D., Neder J.A. Maximal inspiratory pressure: does the choice of reference values matter? *Clin. Physiol. Funct. Imaging*, 2016, Vol. 152, no. 1, pp. 32-39.
14. Sieck G.C., Ferreira L.F., Reid M.B., Mantilla C.B. Mechanical properties of respiratory muscles. *Compr. Physiol.*, 2013, Vol. 3, no. 4, pp. 1533-1567.
15. Tomlinson D.J., Erskine R.M., Morse C.I., Winwood K., Onambele-Pearson G. The impact of obesity on skeletal muscle strength and structure through adolescence to old age. *Biogerontology*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 467-483.
16. Wang X.J. Lung function in patients with acute exacerbation and stable COPD and its correlation with serum proinflammatory cytokines and chemokines. *J. Hainan Med. University*, 2016, Vol. 22, no. 21, pp. 138-141.

Авторы:

Калинина Е.П. — д.м.н., департамент фундаментальной медицины Школы биомедицины ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Владивосток, Россия

Гельцер Б.И. — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор департамента клинической медицины Школы биомедицины ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Владивосток, Россия

Курпатов И.Г. — аспирант департамента клинической медицины Школы биомедицины ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Владивосток, Россия

Горбурукова Т.В. — доцент кафедры компьютерных систем Школы естественных наук ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Владивосток, Россия

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

Authors:

Kalinina E.P., PhD, MD (Medicine), Department of Fundamental Medicine, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Geltser B.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Clinical Medicine, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Kurpatov I.G., Postgraduate Student, Department of Clinical Medicine, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Gorburukova T.V., Associate Professor, Department of Computer Systems, School of Natural Sciences, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

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

Поступила 10.04.2018

Отправлена на доработку 29.10.2018

Принята к печати 25.12.2018

Received 10.04.2018

Revision received 29.10.2018

Accepted 25.12.2018

ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ КОНТРОЛИРУЕМОГО И ЧАСТИЧНО КОНТРОЛИРУЕМОГО ТЕЧЕНИЯ

Виткина Т.И.¹, Новгородцева Т.П.¹, Калинина Е.П.², Лобанова Е.Г.²,
Антонюк М.В.¹

¹ Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» —
Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения,
г. Владивосток, Россия

² ООО «Мой доктор», г. Владивосток, Россия

Резюме. Несмотря на значительный объем исследований, посвященных выявлению иммунных механизмов развития бронхиальной астмы (БА), вопросы формирования различных фенотипов при данной патологии нуждаются в дальнейшем изучении. Цель — проанализировать функциональную активность субпопуляций Th1-, Th2- и Th17-лимфоцитов и установить особенности воспалительного процесса при контролируемой и частично контролируемой БА.

Обследовано 84 пациента, разделенных на 2 группы в зависимости от контроля симптомов и течения БА. В I группу вошло 45 человек с контролируемым течением БА, во II группу — 39 человек с частично контролируемым течением БА. Субпопуляции Th1-, Th2- и Th17-лимфоцитов оценивали по уровню цитокинов в сыворотке крови (TNFα, IFNγ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A) методом точной цитометрии.

Исследование показало наличие мультитипности Т-хелперного (Th) иммунного ответа у больных БА, характер которого зависит от степени контроля заболевания. У больных БА контролируемого течения были выявлены Th2 (62%), Th1/Th2 (20%) и Th1 (18%) типы иммунного ответа. В группе больных частично контролируемой БА были установлены Th2/Th17 (49%), Th1/Th17 (13%) и Th17 (37%) типы иммунного ответа. Показано, что развитие Th1-иммунного ответа у пациентов с контролируемым течением БА индуцируется внутриклеточными инфекциями. Формирование Th1/Th2-фенотипа связано с наличием хронических очагов бактериальной инфекции и персистенцией вирусной инфекции в организме. Данный фенотип может служить индикатором утяжеления течения БА. Изучение роли преобладающего типа иммунного ответа в развитии частично контролируемой БА показало, что активация Th17-лимфоцитов способствует затяжному течению болезни. Какой бы ни был первоначальный фенотип, развитие Th17-зависимого иммунного ответа — это результат длительного системного персистирующего воспаления.

Представления о ключевой роли Th1/Th2-баланса в развитии БА сменяются пониманием того, что в этот процесс также вовлечены Th17-лимфоциты, и Th1/Th17-, Th2/Th17-фенотипы являются полярными крайностями этого заболевания. Выявление интенсивности и характера воспаления при БА позволит провести более объективную оценку применяемой терапии и выбрать дальнейшую тактику лечения.

Ключевые слова: контролируемая бронхиальная астма, частично контролируемая бронхиальная астма, тип Т-хелперного иммунного ответа, Th-клетки, цитокины, клинично-иммунологические особенности

Адрес для переписки:

Виткина Татьяна Исааковна
Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный
научный центр физиологии и патологии дыхания» —
Научно-исследовательский институт медицинской
климатологии и восстановительного лечения
690105, Россия, г. Владивосток, ул. Русская, 73г.
Тел.: 8 (423) 278-82-01, 278-82-02.
E-mail: tash30@mail.ru

Address for correspondence:

Vitkina Tatiana I.,
Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of
Respiration Physiology and Pathology, Institute of Medical
Climatology and Rehabilitative Treatment
690105, Russian Federation, Vladivostok, Russkaya str., 73g.
Phone: 7 (423) 278-82-01, 278-82-02.
E-mail: tash30@mail.ru

Образец цитирования:

Т.И. Виткина, Т.П. Новгородцева, Е.П. Калинина,
Е.Г. Лобанова, М.В. Антонюк «Иммунные механизмы
формирования бронхиальной астмы контролируемого
и частично контролируемого течения» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 495-502.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-495-502

© Виткина Т.И. и соавт., 2019

For citation:

T.I. Vitkina, T.P. Novgorodtseva, E.P. Kalinina,
E.G. Lobanova, M.V. Antonyuk "Immune mechanisms for
development of controlled and partially controlled asthma",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 3, pp. 495-502.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-495-502
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-495-502

IMMUNE MECHANISMS FOR DEVELOPMENT OF CONTROLLED AND PARTIALLY CONTROLLED ASTHMA

Vitkina T.I.^a, Novgorodtseva T.P.^a, Kalinina E.P.^b, Lobanova E.G.^b,
Antonyuk M.V.^a

^a Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiration Physiology and Pathology, Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment, Vladivostok, Russian Federation

^b Moy Doctor LLC, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Despite a significant amount of works specifying immune mechanisms of bronchial asthma (BA), different phenotypes observed in this pathology need to be studied. The aim of present study was to analyze functional activity of Th1, Th2 и Th17 lymphocytes, and to determine features of inflammation in controlled and partly controlled asthma.

We examined eighty-four BA patients that were divided into 2 groups, depending on the control of symptoms and the clinical course of BA. Group I included 45 patients with controlled BA, whereas group II included 39 patients with partially controlled asthma. The subsets of Th1, Th2, and Th17 lymphocytes were assessed by serum cytokine levels (TNF α , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A) using flow cytometry technique.

The results of this study were as follows: we have shown a combined T-helper (Th) immune response in asthma patients, with its origin depending on the degree of the disease control. Th2 (62%), Th1/Th2 (20%) and Th1 (18%) types of immune response have been detected in the patients with controlled BA. Th2/Th17 (49%), Th1/Th17 (13%) and Th17 (37%) types of immune response have been identified in the patients with partially controlled BA. It has been shown, that Th1 immune response in patients with controlled asthma is induced by intracellular infection. The formation of the Th1/Th2 phenotype is associated with a site of chronic bacterial infection revealed, and with persistence of viral infection in the body. This phenotype can be used as an indicator of asthma worsening. Further studies in the role of prevalent immune response type in the development of partially controlled BA have shown that activation of Th17 lymphocytes is associated with prolonged course of the disease. Irrespectively of initial phenotype, the development of Th17-dependent immune response seems to result from a durable systemic persistent inflammation.

The views on the key role of Th1/Th2 balance in the development of asthma are accomplished by evidence of Th17 lymphocyte involvement into the process, and Th1/Th17, Th2/Th17 phenotypes seem to be the polar features of the disease. Estimation of intensity and phenotype of inflammation in BA will permit a more objective evaluation of the therapy applied, and to choose further management strategies.

Keywords: controlled asthma, partially controlled asthma, Th cells, cytokines, type of T helper immune response, clinical and immunological features

Введение

Бронхиальная астма (БА) — мультифакториальное заболевание. Представления об иммунологических механизмах БА постоянно углубляются, открываются новые их аспекты не только на клеточном, но и на молекулярном уровне. Различные медиаторы воспаления способны вызывать развитие основных клинических проявлений БА, таких как бронхоконстрикция, гиперсекреция слизи, отек слизистой оболочки бронхов, бронхиальная гиперреактивность. Динамика иммунологических параметров в определенной мере коррелирует с активностью воспаления и клиническими симптомами. Воздействие аллергенов и разнообразных неспецифических факторов на дыхательные пути провоцирует в сенсibilизированном организме развитие острых реакций в виде бронхоспазма, отека стенки бронхов, обструкции их просвета слизью. Хроническое аллерги-

ческое воспаление со временем приводит к ремоделированию бронхов [1, 2, 5, 10, 19, 23, 30].

Несмотря на многообразие этиологических факторов и начальных этапов развития астмы, конечные его звенья реализуются через одни и те же системы лейкоцитарных, нейрогенных и эпителиальных медиаторов [3, 22]. Полагают, что БА прогрессирует за счет персистенции воспаления и/или нарушения репарационных механизмов. Важную роль в этих процессах играют клетки систем врожденного и приобретенного иммунитета. По современным представлениям, CD4⁺T-клетки играют решающую роль в патогенезе БА [23]. Они составляют преобладающее большинство лимфоцитов, инфильтрирующих дыхательные пути у больных БА. Активизируя выброс цитокинов, CD4⁺T-клетки воздействуют на другие клетки, инициируя каскад воспалительных медиаторов.

Ранее важная роль при БА отводилась дисбалансу Th1/Th2-субпопуляций с превалированием последних. Однако в последние годы стало понятно, что эта теория не объясняет всех механизмов формирования воспаления при БА. Позже были охарактеризованы субпопуляции лимфоцитов, секретирующих IL-17 (Th17). Последние исследования свидетельствуют о том, что, помимо Th2-клеток, Th1- и Th17-лимфоциты влияют на разные аспекты воспаления и бронхиальной гиперреактивности при БА [4, 6, 7]. Так, Cho и соавт. выявили слабую корреляцию гиперплазии бокаловидных клеток, важного маркера БА, с активностью Th2-лимфоцитов. Авторами показано, что основным фактором, усиливающим продукцию муцина и гиперплазию бокаловидных клеток в бронхах больных БА, является IL-17. Было установлено, что Th17-лимфоциты по сравнению с Th2-лимфоцитами являются гораздо более значимой популяцией в формировании гиперплазии бокаловидных клеток. Повышенная концентрация IL-17 обнаружена в легких, мокроте и бронхоальвеолярном лаваже больных БА, а его уровень коррелировал со степенью бронхиальной гиперреактивности [14, 15]. Показано, что IL-17 влияет на местное воспаление, вызывая выброс провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1, G-CSF, IL-6) и факторов хемотаксиса нейтрофилов (IL-8 и CXCL1), а также играет важную роль в отложении коллагена и ремоделировании дыхательных путей [14].

Учитывая вышесказанное, **цель исследования** заключалась в анализе функциональной активности субпопуляций Th1-, Th2- и Th17-лимфоцитов и установлении особенностей воспалительного процесса у больных контролируемой и частично контролируемой БА.

Материалы и методы

В исследовании на условиях добровольного информированного согласия участвовали 84 пациента с БА (35 мужчин и 49 женщин), средний возраст составил $52,5 \pm 4,6$ года. Диагноз БА устанавливался в соответствии с классификацией и критериями международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА [18]. Критерием включения являлось наличие у пациентов БА легкой степени тяжести контролируемого и частично контролируемого течения. У 46% пациентов из 84 человек был отягощен семейный наследственный анамнез, что характеризовалось наличием аллергического ринита, атопического дерматита, экземы или БА у родственников. У 51% пациентов были выявлены другие аллергические заболевания, сопровождающие течение БА (аллергический ринит, атопический дерматит, пищевая аллергия). Ведущими

триггерами обострений БА по данным анамнеза являлись: контакт с аллергеном — 48% случаев, вирусная инфекция — 22%, пищевые продукты — 9%, воздействие поллютантов и/или аэрозольных химикатов и/или табачного дыма — 21%. БА с преимущественной сенсibilизацией к домашней пыли и аллергенам *Dermatophagoides* была выявлена у 47% пациентов, БА с преимущественной сенсibilизацией к грибам рода *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* была выявлена у 19% пациентов, БА с преимущественной сенсibilизацией к пыльце растений — у 24% обследованных, БА с изолированной сенсibilизацией к пищевым аллергенам не встречалась и диагностировалась в комбинации с бытовой или пыльцевой сенсibilизацией в 15% случаев. У 10% пациентов с БА сенсibilизации выявлено не было.

Все пациенты были разделены на 2 анализируемые группы в зависимости от контроля симптомов и течения БА. В I группу вошло 45 человек (19 мужчин и 26 женщин) с контролируемым течением БА, средний возраст которых составил $50,7 \pm 3,7$ лет. Во II группу вошло 39 человек (16 мужчин и 23 женщины) с частично контролируемым течением БА, средний возраст которых составил $54,6 \pm 5,2$ лет. У пациентов в I группе наблюдения дневные симптомы наблюдались в виде приступов кашля не чаще 2 раз в неделю, купирующиеся самостоятельно, ночных пробуждений и ограничений физической активности из-за БА выявлено не было. Показатели функции внешнего дыхания (ФВД) у пациентов I группы были следующие: объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1) $\geq 80\%$ от должного, показатели пиковой скорости выдоха (ПСВ) у 100% обследуемых находились в зеленой зоне с суточным разбросом $15 \pm 4,7$ л/мин ($p \leq 0,05$). Факторы риска неблагоприятных исходов БА в I группе обследуемых были представлены следующим образом: контакт с триггерами (аллергены) — 24,4% больных, коморбидные состояния в виде аллергического ринита и/или пищевой аллергии — 55,6% больных. У пациентов II группы наблюдения дневные симптомы наблюдались чаще 2 раз в неделю, периодически беспокоили приступы кашля в ночные или утренние часы, купирующиеся коротко действующими бета2-адреномimetиками (КДБА). Данные ФВД у пациентов II группы были следующие: ОФВ1 78-65% от должного зарегистрирован у 100% пациентов, показатели ПСВ у 74,4% обследуемых находились в зеленой зоне пикфлоуметрии с суточным разбросом $27,6 \pm 4$ л/мин ($p \leq 0,05$). У 25,6% пациентов II группы наблюдения показатели ПСВ находились в желтой зоне пикфлоуметрии. Факторы риска неблагоприятных исходов БА в данной группе обследуемых были представлены

контактом с триггерами — у 38,5% больных, коморбидными состояниями в виде аллергического риносинусита, гастро-эзофагально-рефлюксной болезни (ГЭРБ) и ожирения — в 66,7% случаев, курения — у 18% обследуемых. При обследовании у 36% больных, вошедших во II группу, была выявлена плохая приверженность назначенной терапии.

В контрольную группу вошли 20 практически здоровых лиц (8 мужчин и 12 женщин), не курящих, с нормальной ФВД, средний возраст — $42,0 \pm 3,4$ года.

Субпопуляции Th1-, Th2- и Th17-лимфоцитов оценивали по уровню цитокинов в сыворотке крови (TNF α , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A) методом проточной цитометрии (тест-системы фирмы BD, США). Обработку данных проводили с использованием программы FCAP Array 3.0 BD (США). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали критерии Вилкоксона и Манна-Уитни. Различия считались значимыми при $p \leq 0,001$ и $0,05$.

Результаты

Результаты исследования показали наличие мультитипности Th-иммунного ответа у больных БА, характер которой зависит от степени контроля заболевания (рис. 1, 2).

Установлено, что в стадии ремиссии заболевания у больных БА с контролируемым течением (I группа) по сравнению с контрольной группой наблюдались выраженные изменения

в состоянии цитокинового звена иммунной системы. В результате анализа в этой группе пациентов было выявлено три Th-зависимых типа иммунного ответа — Th2, Th1/Th2 и Th1 (рис. 1). С Th1-фенотипом было выявлено 18% пациентов, с Th2 — 62% обследуемых и с Th1/Th2 — 20% больных БА.

У больных I группы с Th1-типом иммунного ответа выявлено увеличение уровня TNF α ($p \leq 0,05$), IFN γ и IL-2 ($p \leq 0,001$) и снижение содержания IL-4 и IL-6 ($p \leq 0,001$). В данной подгруппе у 100% больных подтверждена герпетическая инфекция, из них: вирусы простого герпеса-1, 2 определены у 75% больных, цитомегаловирус — у 12,5% больных, вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) — у 25% обследованных. Избыточная выработка Th1-цитокинов активирует клеточно-опосредованный цитотоксический иммунный ответ, обеспечивая защиту организма против внутриклеточных вирусов, но подавляет секрецию IL-4 и IL-6.

У пациентов I группы с Th2-зависимым иммунным ответом наблюдалось увеличение концентрации IL-4, IL-10 ($p \leq 0,001$), TNF α ($p \leq 0,001$) и снижение уровня IFN γ ($p \leq 0,001$) по сравнению с контрольной группой (рис. 1). У всех больных этой подгруппы установлено формирование гиперчувствительности к экзогенным аллергенам неинфекционного происхождения. Так, у 75% больных выявляется бытовая сенсибилизация, у 21,4% пациентов причиной приступов бронхиальной астмы являются грибковые аллергены. У 7,1% больных зафиксирована смешанная сенсибилизация.

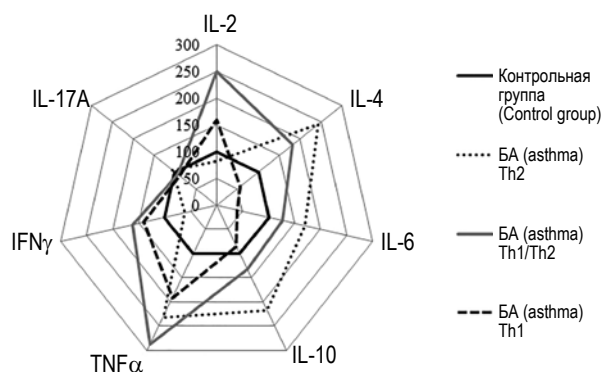


Рисунок 1. Цитокиновый статус больных БА контролируемого течения (I группа) с разным типом Th-иммунного ответа

Примечание. Данные представлены в % относительно контрольной группы (100%).

Figure 1. Cytokine status in patients with controlled asthma (group I) with different types of Th immune response
Note. The data are presented as % of values of the control group (100%).

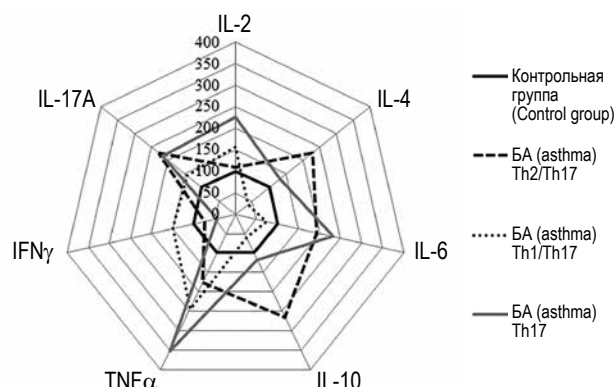


Рисунок 2. Цитокиновый статус больных БА частично контролируемого течения (II группа) с разным типом Th-иммунного ответа

Примечание. Данные представлены в % относительно контрольной группы (100%).

Figure 2. Cytokine status in patients with partially controlled asthma (group II) with different types of Th immune response
Note. The data are presented as % of values of the control group (100%).

В I группе обследуемых с Th1/Th2-типом иммунного ответа обнаружена высокая концентрация IL-2, IL-4, IFN γ и TNF α ($p \leq 0,001$) по сравнению с контрольной группой (рис. 1). В данной подгруппе 55,6% больных имели сенсibilизацию к домашней пыли и грибковую аллергию, у 33,3% больных выявлена сенсibilизация к домашней пыли, у 66,7% больных в анамнезе хронический тонзиллит, у 44,4% хронический ларинготрахеит. У 77,8% пациентов с Th1/Th2-типом иммунного ответа выявлено латентное течение ВЭБ-инфекции.

У больных частично контролируемой БА (II группа) также были выявлены три Th-зависимых типа иммунного ответа — Th2/Th17, Th1/Th17 и Th17. С Th2/Th17-фенотипом было выделено 49% пациентов, с Th1/Th17 — 13% обследуемых и с Th17 — 37% больных БА. Оценка цитокинового профиля у пациентов с частично контролируемой БА (рис. 2) позволила установить существенное возрастание уровня IL-17.

Основными изменениями цитокинового профиля больных II группы с Th2/Th17-типом иммунного ответа является увеличение TNF α ($p \leq 0,001$) и IL-4 ($p \leq 0,001$). В присутствии IL-4 Th2-клетки могут перепрограммировать линию Т-клеток, экспрессирующих IL-10 ($p \leq 0,05$), которые способны стимулировать активацию IL-17A ($p \leq 0,001$). В данной подгруппе у всех пациентов установлена смешанная сенсibilизация бытовыми, пыльцевыми и грибковыми аллергенами.

Цитокиновый профиль пациентов II группы с Th1/Th17-типом иммунного ответа характеризовался высокими значениями IFN γ ($p \leq 0,001$), TNF α ($p \leq 0,001$) и IL-17A ($p \leq 0,005$) на фоне низкого уровня IL-4 ($p \leq 0,001$). Среди больных этой подгруппы выявлено самое большое число лиц, имеющих плохую приверженность к топической глюкокортикоидной (ГКС) терапии, одной из причин которой может быть сформированная резистентность к ГКС. В эту группу вошли пациенты с курением — 40%, ожирением — 60%, у всех больных подтверждена герпетическая инфекция.

Во II группе больных с Th17-зависимым иммунным ответом отмечалось высокое содержание IL-17A ($p \leq 0,001$), IL-6 ($p \leq 0,05$), TNF α ($p \leq 0,001$), IL-2 ($p \leq 0,05$) и низкий уровень IFN γ ($p \leq 0,001$). У всех больных была смешанная сенсibilизация аллергенами, с обострениями не менее 4-6 раз в год. В данной подгруппе пациенты с курением составили 78,5%, ожирением — 71,4%, наличие хронического тонзиллита и ларинготрахеита определено у 64,3 и 35,7% больных соответственно. У 57,1% больных подтверждена герпетическая инфекция, из них вирусы просто-

го герпеса-1, 2 определены у 80%, цитомегаловирус — у 20% больных.

Обсуждение

Таким образом, исследование показало наличие мультитипности Т-хелперного иммунного ответа у больных БА, характер которого зависит от степени контроля заболевания. У больных БА контролируемого течения были выявлены Th2-, Th1/Th2- и Th1-типы иммунного ответа. В группе больных частично контролируемой БА были установлены Th2/Th17-, Th1/Th17- и Th17-типы иммунного ответа.

В течение длительного периода было принято считать, что аллергические респираторные заболевания, в том числе и БА, ассоциированы с превалированием Th2-ответа [8, 22]. Однако как наши, так и литературные данные свидетельствуют о том, что Th1- и Th2-иммунные ответы могут сосуществовать при астме [10, 21, 25, 26]. Исследование Krug N. и соавт. выявило возможность продуцирования Th1- и Th2-цитокинов при БА. Было показано, что Т-клетки, полученные у пациентов с астмой, синтезируют значительно больше IFN γ на стимуляцию без каких-либо различий в образовании IL-4 [20]. Это наблюдение привело к предположению о том, что при астме может происходить наложение Th1-зависимых иммунных реакций на Th2-аллерген-специфические ответы [27, 32].

Ключевыми цитокинами, вовлеченными в регуляцию дифференцировки Th-субпопуляций, являются IFN γ (ингибирует пролиферацию Th2-клонов, но не влияет на продукцию ими цитокинов) и IL-2 (индуцирует Т-клеточную пролиферацию, увеличивает число эффекторных клеток и требуется для оптимальной продукции IFN γ). IL-2 — это обязательный фактор для генерации Th1-клеток. Эти факты свидетельствуют, что IFN γ и IL-2 можно рассматривать в качестве иммунорегуляторов, способных вмешиваться в клональную экспансию и эффекторные функции Th2-клеток. Кроме того, при нарушении синтеза IL-4 Th1-клетками происходит активация развития Th2-клеток из Th0-клеток, что приводит к восстановлению продукции IL-4. В итоге баланс IL-4 и IL-2 обеспечивает дифференцировку Th0-клеток в Th1 и Th2 [29]. Таким образом, цитокины в ранней фазе воспаления влияют на функциональную дифференцировку наивных CD4⁺Т-клеток. Это главная часть адаптивного иммунного ответа, обеспечивающая реакцию на антиген в виде продукции антител либо активации макрофагов и Т-киллеров.

После встречи с антигеном и выполнения своей секреторной функции большинство Т-хелперов погибает. Часть из них становятся

клетками памяти, сохраняя способность отвечать на антигены в течение всей жизни хозяина, причем доминирующий ответ по Th1- или Th2-пути сохраняется. У atopических пациентов установлен феномен неравномерного апоптоза Th1- и Th2-эффекторных клеток [23], а именно преимущественное удаление циркулирующих клеток памяти и эффекторных Th1-клеток, особенно высокоэкспрессирующих IFN γ [17], и сохранение долгоживущих Th2-клеток. Поэтому большая вероятность, что через определенное время смешанный Th1- и Th2-тип перейдет в Th2-тип иммунного ответа.

Развитие у больных БА Th1/Th2-фенотипа ассоциировано с наличием хронических очагов бактериальной инфекции и персистированием вирусной инфекции в организме. Его можно расценивать как смешанный переходный фенотип, который может служить индикатором утяжеления течения БА в последующем.

Исследование показывает, что, наряду с Th1- и Th2-лимфоцитами, при БА значительную роль играют Th17-клетки. На мембране мононуклеарных клеток периферической крови людей с аллергической БА был обнаружен кластер дифференцировки Th2-клеток, продуцирующих IL-17 [31]. В других исследованиях показано, что число даблпозитивных клеток Th2/Th17 в бронхоальвеолярном лаваже коррелировало со сниженной функцией дыхательных путей и повышенной эозинофилией крови [11, 16]. Клинические и экспериментальные исследования позволяют предположить, что Th2-клетки могут приобретать Th2/Th17-фенотип. Свойство Th2-клеток приобретать Th17-подобную функцию и синергизировать с Th1-клетками способствует формированию мультитипного Th-иммунного ответа у пациентов с астмой [23].

В Th17-клетках образуется несколько цитокинов, включая IL-17, IL-6, TNF α и IL-22. IL-17 индуцирует инфильтрацию эозинофилов и рекрутирование макрофагов при БА. Предполагается, что основные функции Th17-клеток связаны с привлечением и активацией нейтрофилов, что приводит к хронизации процесса. Эти клетки способствуют развитию патологического воспаления и играют негативную роль в течении заболевания [24, 28]. Th17-клетки образуются из наивных CD4⁺T-клеток под влиянием IL-6, IL-21, IL-23 и TGF- β через STAT3-ROR γ t (signal

transducer and activator of transcription 3/related orphan receptor γ t) путь и вызывают нейтрофилию при аллергической БА [13]. Тем самым нейтрофилы и эпителиальные клетки вовлекаются в реакции адаптивного иммунитета. В настоящее время считается, что иммунный ответ, развивающийся по Th17-типу, наиболее важен на начальных этапах тканевого воспаления и для защиты слизистых. Этот фенотип был выявлен у пациентов с частично контролируемой БА. Какой бы ни был первоначальный фенотип, развитие Th17-зависимого иммунного ответа — это результат длительного системного персистирующего воспаления.

Таким образом, при изучении роли различных типов иммунного ответа у пациентов с контролируемым течением БА выявлено, что внутриклеточные инфекции индуцируют ответные реакции Th1-клеток, которые продуцируют IFN γ и IL-2 и тем самым активируют микробицидные и цитотоксические механизмы. Формирование фенотипа Th1/Th2 ассоциировано с наличием хронических очагов бактериальной инфекции и персистированием вирусной инфекции в организме. Изучение роли превалирующего типа иммунного ответа в развитии частично контролируемой БА показало, что активация Th17-лимфоцитов способствует затяжному течению болезни. Основные функции Th17-клеток при БА связаны с привлечением и активацией нейтрофилов, в случае же хронизации процесса эти клетки способствуют развитию патологического воспаления и играют негативную роль в течении заболевания.

На смену прежнему представлению о решающей роли смещения Th1/Th2-баланса приходит постепенное осознание того, что Th1/Th17- и Th2/Th17-опосредованные механизмы при БА представляют собой полярные крайности заболевания, при этом фенотипы пациентов колеблются между этими полюсами. Цитокины создают микроокружение для дифференцировки Th-клеток в том или ином направлении. Однако можно предположить, что каждому типу адаптивного иммунного ответа будет соответствовать и свой тип реагирования на уровне клеток врожденного и приобретенного иммунитета. Оценка интенсивности и характера воспаления при БА, основанная на анализе воспалительных маркеров, позволит улучшить диагностику заболевания и выбрать правильную тактику лечения.

Список литературы / References

1. Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Жукова Н.В., Антонюк М.В., Лобанова Е.Г., Калинина Е.П. Ассоциация метаболизма жирных кислот с системной воспалительной реакцией при хронических заболеваниях органов дыхания // Биомедицинская химия, 2016. Т. 62, № 3. С. 341-347. [Denisenko Yu.K., Novgorodtseva T.P., Zhukova N.V., Antonyuk M.V., Lobanova E.G., Kalinina E.P. Association of fatty acid metabolism with systemic inflammatory response in chronic respiratory diseases. *Biomeditsinskaya khimiya* = *Biomedical Chemistry*, 2016, Vol. 62, no. 3, pp. 341-347. (In Russ.)]

2. Курбачева О.М., Павлова К.С. Фенотипы и эндотипы бронхиальной астмы: от патогенеза и клинической картины к выбору терапии // Российский аллергологический журнал, 2013. № 1. С. 15-24. [Kurbacheva O.M., Pavlova K.S. Phenotypes and endotypes of bronchial asthma: from pathogenesis and clinical picture to the choice of therapy. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergology*, 2013, no. 1, pp. 15-24. (In Russ.)]
3. Лобанова Е.Г., Калинина Е.П., Денисенко Ю.К., Виткина Т.И. Особенности регуляции воспаления у пациентов с бронхиальной астмой // Аллергология и иммунология, 2016. Т. 17, № 1. С. 33. [Lobanova E.G., Kalinina E.P., Denisenko Yu.K., Vitkina T.I. The features of the regulation of inflammation in patients with bronchial asthma. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2016, Vol. 17, no. 1, p. 33. (In Russ.)]
4. Лобанова Е.Г., Калинина Е.П., Денисенко Ю.К. Особенности содержания цитокинов Th1- и Th17-лимфоцитов у лиц с хронической обструктивной болезнью легких // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 3. С. 287-290. [Lobanova E.G., Kalinina E.P., Denisenko Yu.K. Cytokine contents in Th1- and Th17-type lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 287-290. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-287-290.
5. Ненашева Н.М. Фенотипы бронхиальной астмы и выбор терапии // Практическая пульмонология, 2014. № 2. С. 2-11. [Nenasheva N.M. Phenotypes of bronchial asthma and the choice of therapy. *Prakticheskaya pulmonologiya = Practical Pulmonology*, 2014, no. 2, pp. 2-11. (In Russ.)]
6. Нурдина М.С., Купаев В.И. Взаимосвязь уровня IL-17, IL-10 со степенью контроля бронхиальной астмы // Вестник современной клинической медицины, 2017. Т. 10, № 3. С. 35-38. [Nurdina M.S., Kupaev V.I. Correlation between serum IL-17 and IL-10 level and asthma control. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*, 2017, Vol. 10, no. 3, pp. 35-38. (In Russ.)]
7. Смольникова М.В., Смирнова С.В., Ильенкова Н.А., Коноплева О.С. Иммунологические маркеры неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 453-460. [Smolnikova M.V., Smirnova S.V., Ilyenkova N.A., Konopleva O.S. Immunological markers of uncontrolled atopic bronchial asthma in children. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 453-460. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2017-4-453-460.
8. Титова Н.Д., Новикова В.И. Оценка иммунокорректирующего эффекта глюкозаминил-мурамилпептида при бронхиальной астме у детей // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2017. № 1. С. 31-36. [Titova N.D., Novikova V.I. Characteristics of the immunocorrecting effect of glucosamine-muramylpeptide in cases of bronchial asthma in children. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2017, no. 1, pp. 31-36. (In Russ.)]
9. Akbari O., Stock P., Meyer E., Kronenberg M., Sidobre S., Nakayama T., Taniguchi M., Grusby M.J., DeKruyff R.H., Umetsu D.T. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature Med.*, 2003, Vol. 9, no. 5, pp. 582-588.
10. Becerra-Díaz M., Wills-Karp M., Heller N.M. New perspectives on the regulation of type II inflammation in asthma. *F1000Res*, 2017, Vol. 6, p. 1014.
11. Cheung P.F.Y., Wong C.K., Lam C.W.K. Molecular mechanisms of cytokine and chemokine release from eosinophils activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: implication for Th17 lymphocytes-mediated allergic inflammation. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 8, pp. 5625-5635.
12. Choy D.F., Hart K.M., Borthwick L.A., Shikotra A., Nagarkar D.R., Siddiqui S., Jia G., Ohri C.M., Doran E., Vannella K.M., Butler C.A., Hargadon B., Sciruba J.C., Gieseck R.L., Thompson R.W., White S., Abbas A.R., Jackman J., Wu L.C., Egen J.G., Heaney L.G., Ramalingam T.R., Arron J.R., Wynn T.A., Bradding P. TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. *Sci. Transl. Med.*, 2015, Vol. 7, no. 301, 301ra129. doi: 10.1126/scitranslmed.aab3142.
13. Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*, 2011, Vol. 66, no. 8, pp. 989-998.
14. Gao H., Ying S., Dai Y. Pathological roles of neutrophil-mediated inflammation in asthma and its potential for therapy as a target. *J. Immunol. Res.*, 2017, Vol. 2017, 3743048. doi: 10.1155/2017/3743048.
15. Hall S.L., Baker T., Lajoie S., Richgels P.K., Yang Y., McAlees J.W., van Lier A., Wills-Karp M., Sivaprasad U., Acciani T.H., LeCras T.D., Myers J.B., Kovacic M.B., Lewkowich I.P. IL-17A enhances IL-13 activity by enhancing IL-13-induced signal transducer and activator of transcription 6 activation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 139, no. 2, pp. 462-471.
16. Irvin C., Zafar I., Good J., Rollins D., Christianson C., Gorska M.M., Martin R.J., Alam R. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 5, pp. 1175-1186.
17. Isogai S., Athviraham A., Fraser R.S., Taha R., Hamid Q., Martin J.G. Interferon-gamma-dependent inhibition of late allergic airway responses and eosinophilia by CD8⁺ gammadelta T cells. *Immunology*, 2007, Vol. 122, no. 2, pp. 230-238.
18. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2016. [Electronic resource]. Access mode: www.ginasthma.org.
19. Kalinina E., Karaman Yu., Vitkina T., Lobanova E., Novgorodtseva T., Antonyuk M., Gvozdenko T., Knyshova V., Nazarenko A. The mechanisms of the regulation of immune response in patients with

comorbidity of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Can. Respir. J.*, 2016, Vol. 2016, 4503267. doi: 10.1155/2016/4503267.

20. Krug N., Madden J., Redington A.E., Lackie P., Djukanovic R., Schauer U., Holgate S.T., Frew A.J., Howarth P.H. T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1996, Vol. 14, pp. 319-326.

21. Lee Y.C. Synergistic effect of various regulatory factors in Th1/Th2 balance; immunotherapeutic approaches in asthma. *Int. J. Biomed. Sci.*, 2008, Vol. 4, no. 1, pp. 8-13.

22. Lötvall J., Akdis C.A., Bacharier L.B., Bjermer L., Casale T.B., Custovic A., Lemanske R.F.Jr, Wardlaw A.J., Wenzel S.E., Greenberger P.A. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 127, no. 2, pp. 355-360.

23. Moldaver D.M., Larche M., Rudulier C.D. An update on lymphocyte subtypes in asthma and airway disease. *Chest*, 2017, Vol. 151, no. 5, pp. 1122-1130.

24. Newcomb D.C., Peebles R.S. Th17-mediated inflammation in asthma. *Curr. Opin. Immunol.*, 2013, Vol. 25, pp. 755-776.

25. Porter P.C., Roberts L., Fields A., Knight M., Qian Y., Delclos G., Han S., Kheradmand F., Corry D. Necessary and sufficient role for helper T cells to prevent fungal dissemination in allergic lung disease. *Infect. Immun.*, 2011, Vol. 79, no. 11, pp. 4459-4471.

26. Raundhal M., Morse C., Khare A., Oriss T.B., Milosevic J., Trudeau J., Huff R., Pilewski J., Holguin F., Kolls J., Wenzel S., Ray P., Ray A. High IFN- γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. *J. Clin. Invest.*, 2015, Vol. 125, no. 8, pp. 3037-3050.

27. Reisinger J., Triendl A., Kuchler E., Bohle B., Krauth M.T., Rauter I., Valent P., Koenige F., Valenta R., Niederberger V. IFN- γ -enhanced allergen penetration across respiratory epithelium augments allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, Vol. 115, no. 5, pp. 973-981.

28. Robinson D., Humbert M., Buhl R., Cruz A.A., Inoue H., Korom S., Hanania N.A., Nair P. Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. *Clin. Exp. Allergy*, 2017, Vol. 47, no. 2, pp. 161-175.

29. Singh A. K., Stock P., Akbari O. Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma. *Allergy*, 2011, Vol. 66, no. 2, pp. 155-162.

30. Veremchuk L.V., Yankova V.I., Vitkina T.I., Nazarenko A.V., Golokhvast K.S. Urban air pollution, climate and its impact on asthma morbidity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2016, Vol. 6, no. 1, pp. 76-79.

31. Wang Y.H., Voo K.S., Liu B., Chen C.Y., Uygungil B., Spoede W., Bernstein J.A., Huston D.P., Liu Y.J. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J. Exp. Med.*, 2010, Vol. 207, no. 11, pp. 2479-2491.

32. Yssel H., Groux H. Characterization of T cell subpopulations involved in the pathogenesis of asthma and allergic diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2000, Vol. 121, pp. 10-18.

Авторы:

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

Новгородцева Т.П. — д.б.н., профессор, заместитель директора по научно-исследовательской работе, Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

Калинина Е.П. — д.м.н., директор ООО «Мой доктор», г. Владивосток, Россия

Лобанова Е.Г. — к.м.н., врач-иммунолог ООО «Мой доктор», г. Владивосток, Россия

Антонюк М.В. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией восстановительного лечения, Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

Authors:

Vitkina T.I., PhD, MD (Biology), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Biomedical Research, Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiration Physiology and Pathology, Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment, Vladivostok, Russian Federation

Novgorodtseva T.P., PhD, MD (Biology), Professor, Deputy Director for Research, Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiration Physiology and Pathology, Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment, Vladivostok, Russian Federation

Kalinina E.P., PhD, MD (Medicine), Director, Moy Doctor LLC, Vladivostok, Russian Federation

Lobanova E.G., PhD (Medicine), Clinical Immunologist, Moy Doctor LLC, Vladivostok, Russian Federation

Antonyuk M.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Rehabilitative Treatment, Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiration Physiology and Pathology, Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 20.08.2018

Отправлена на доработку 19.09.2018

Принята к печати 19.10.2018

Received 20.08.2018

Revision received 19.09.2018

Accepted 19.10.2018

СОДЕРЖАНИЕ CD4⁺ И CD8⁺ ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК ПАМЯТИ И ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

**Барковская М.Ш., Блинова Е.А., Гришина Л.В., Леонова М.И.,
Непомнящих В.М., Демина Д.В., Козлов В.А.**

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

Резюме. Бронхиальная астма — хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в патогенезе которого ключевая роль отводится Т-лимфоцитам. Считается, что сокращение числа наивных Т-клеток и накопление Т-лимфоцитов памяти при бронхиальной астме сопровождаются функциональными изменениями Т-лимфоцитов. В данном исследовании был изучен субпопуляционный состав Т-лимфоцитов в периферической крови, в нестимулированной и РНА-стимулированной культурах, а также пролиферативная активность Т-клеточных субпопуляций у пациентов с бронхиальной астмой и здоровых доноров. В исследование было включено 10 пациентов с бронхиальной астмой (возраст 45,4±11,8 лет). Одна половина пациентов находилась в стадии ремиссии, вторая половина — в стадии обострения основного заболевания. Доноры подбирались по полу и возрасту. Методом проточной цитофлуориметрии по экспрессии маркеров CD45R0, CD62L и CD197(CCR7) CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоциты были разделены на центральные (T_{cm}) и эффекторные клетки памяти (T_{em}), наивные Т-лимфоциты (T_{naïve}) и терминально-дифференцированные эффекторы (T_{emra}). В качестве функционального показателя была исследована пролиферативная активность T_{cm}, T_{em} и T_{naïve} в ответ на РНА. В ходе исследования было установлено, что содержание CD4⁺T_{em}CD62L⁺ и CD8⁺T_{em}CD62L⁺ в периферической крови у пациентов в стадии обострения астмы было значимо снижено по сравнению с донорами. При стимуляции РНА данные различия в субпопуляционном составе между группами пациентов и доноров нивелировались. Также было обнаружено наличие положительной корреляции относительного количества CD4⁺ и CD8⁺ клеток памяти с возрастом у пациентов с бронхиальной астмой, которая отсутствовала у доноров. Анализ митоген-индуцированной пролиферации показал, что наиболее активно делились T_{cm} и T_{naïve} клетки как у пациентов, так и у доноров. При этом пролиферативная активность CD4⁺Т-лимфоцитов и субпопуляций CD8⁺T_{cm}, CD4⁺T_{cm} и CD4⁺T_{em}CD62L⁺ была выше в группе пациентов с ремиссией астмы, чем в группах пациентов, находящихся в обострении, и здоровых доноров. Выявленное увеличение относительного количества Т-клеток памяти с возрастом позволяет предполагать их участие в процессе развития бронхиальной астмы. Сопоставимая с донорскими значениями пролиферативная реакция изученных субпопуля-

Адрес для переписки:

Барковская Маргарита Шамилевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
Тел./факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: margaritabarkovskaya@gmail.com

Address for correspondence:

Barkovskaya Margarita Sh.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 227-01-35.
Phone/Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: margaritabarkovskaya@gmail.com

Образец цитирования:

М.Ш. Барковская, Е.А. Блинова, Л.В. Гришина,
М.И. Леонова, В.М. Непомнящих, Д.В. Демина,
В.А. Козлов «Содержание CD4⁺ и CD8⁺ эффекторных
клеток памяти и пролиферативная активность
Т-лимфоцитов при бронхиальной астме»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3.
С. 503–516. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-503-516
© Барковская М.Ш. и соавт., 2019

For citation:

M.Sh. Barkovskaya, E.A. Blinova, L.V. Grishina,
M.I. Leonova, V.M. Nepomniashchikch, D.V. Demina,
V.A. Kozlov "Contents of CD4⁺ and CD8⁺ effector memory
cells and proliferative activity of T lymphocytes in bronchial
asthma", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 503–516.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-503-516
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-503-516

ций говорит о сохранности функциональных свойств Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при бронхиальной астме. Усиление пролиферации отдельных супопуляций у пациентов, находящихся в ремиссии бронхиальной астмы свидетельствует об активированном статусе Т-клеток памяти. Обнаруженное снижение количества $CD4^{+}TemCD62L^{+}$ и $CD8^{+}TemCD62L^{+}$ у пациентов в обострении, на наш взгляд, может быть связано с активным воспалительным процессом в бронхиальном дереве.

Ключевые слова: иммунопатология, бронхиальная астма, Т-клетки памяти, наивные Т-клетки, РНА-стимуляция, пролиферативная активность

CONTENTS OF $CD4^{+}$ AND $CD8^{+}$ EFFECTOR MEMORY CELLS AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF T LYMPHOCYTES IN BRONCHIAL ASTHMA

Barkovskaya M.Sh., Blinova E.A., Grishina L.V., Leonova M.I.,
Nepomniashchikh V.M., Demina D.V., Kozlov V.A.

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

Abstract. Bronchial asthma is a chronic inflammatory disease of the respiratory tract. T-lymphocytes play a key role in pathogenesis of this allergic disease. The reduction in number of naïve T cells and the accumulation of memory T cells in bronchial asthma are accompanied by dysregulation of T lymphocyte function. In present study, we have investigated the contents of different T lymphocyte subpopulations in peripheral blood as well as in resting and PHA-stimulated cultures, along with their proliferative capacity in patients with bronchial asthma and healthy donors. The study included 10 patients with bronchial asthma (age 45.4 ± 11.8 years). One-half of patients was in remission state, the others having been at the stage of clinical exacerbation. The group of donors was formed by healthy individuals matched by gender and age to the patients. Based on expression of cell surface markers CD45R0, CD62L and CD197 (CCR7), the $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ T lymphocytes were divided into central (Tcm) and effector memory cells (Tem), naïve T lymphocytes (Tnaïve) and terminally differentiated effector cells (Temra) using flow cytometry technique. The proliferative activity of Tcm, Tem and Tnaïve was evaluated in response to PHA as a functional marker of T cells. We have found that the percentage of peripheral $CD4^{+}TemCD62L^{+}$ and $CD8^{+}TemCD62L^{+}$ cells in the patients with asthma exacerbation was significantly reduced, if compared to the donors. Following PHA stimulation, these differences in T cell subsets between the groups of patients and donors were not detectable. We performed a correlation analysis between the memory T cell contents and age of the subjects studied. It was shown that the relative amounts of $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ memory cells increased with age in asthmatics, but not in healthy donors. Analysis of mitogen-induced proliferation showed that Tcm and Tnaïve cells proliferated more actively than other subpopulations in both groups. Meanwhile, the proliferative activity of $CD4^{+}$ T lymphocytes and subsets of $CD8^{+}Tcm$, $CD4^{+}Tcm$ and $CD4^{+}Tem62L^{-}$ was higher in the group of asthma patients in remission state than in the patients with exacerbating disease, and healthy donors. The revealed increase in the relative number of memory T cells with age suggests that these cells participate in development of bronchial asthma. Proliferative response of the studied subpopulations, which was comparable to the donor values, suggests a functional maintenance of memory T cells and naïve T lymphocytes in bronchial asthma. The increased proliferation of some T-cell subpopulations in asthmatics in remission suggests an activated state of memory T cells. The observed decrease in the number of $CD4^{+}TemCD62L^{+}$ and $CD8^{+}TemCD62L^{+}$ in patients with asthma exacerbation may be, by our opinion, associated with an active inflammatory process in the airways.

Keywords: immunopathology, bronchial asthma, memory T cells, naïve T cells, PHA-stimulation, proliferation

Введение

Бронхиальная астма (БА) — хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в котором принимают участие различные иммунокомпетентные клетки и клеточные элементы. Астма представляет собой глобальную проблему здравоохранения, в мире насчитывается около 300 млн больных с верифицированным диагнозом БА [10]. В настоящее время сформировано мнение о существовании разных фенотипов БА в зависимости от возраста манифестации заболевания и выраженности эозинофильного воспаления [3, 18]. Считается, что клиническая неоднородность данного заболевания обусловлена участием различных видов Т-лимфоцитов в его развитии [14, 29].

Главной функцией Т-лимфоцитов является развитие иммунного ответа на антигенные стимулы с последующим формированием иммунологической памяти. Иммунологическая память реализуется Т-лимфоцитами памяти ($CD45R0^+$), среди которых выделяют центральные (T_{cm} , $CD45R0^+CD62L^+CCR7^+$) и эффекторные (T_{em} , $CD45R0^+CD62L^-CCR7^-$) Т-клетки памяти. За счет экспрессии определенных молекул хоуминга на своей поверхности T_{cm} занимают Т-зоны периферических лимфоидных органов и способны к пролиферации и дифференцировке в эффекторные клетки в ответ на повторное воздействие антигена. T_{em} , напротив, мигрируют в органы и ткани для выполнения эффекторных функций на периферии [21]. Также выделяют субпопуляцию терминально-дифференцированных $CD45RA$ -позитивных Т-клеток памяти (T_{emg}), которые преобладают среди $CD8^+$ лимфоцитов [15, 21]. Показано, что с возрастом количество клеток памяти увеличивается, тогда как численность наивных Т-лимфоцитов (T_{naive} , $CD45R0^-$) уменьшается [22]. Поддержание соотношения T_{cm} , T_{em} и T_{naive} лимфоцитов нарушается при иммунопатологии, в том числе при БА [16, 24]. Экспериментальные данные свидетельствуют, что резидентные аллерген-специфичные Т-клетки памяти накапливаются в легочной ткани в результате сенсибилизации и могут приводить к развитию БА [11]. Также у пациентов с БА обнаружено повышенное содержание $CD4^+$ Т-клеток памяти, которое сопровождается такими функциональными изменениями, как повышенная продукция $IL-5$, $IL-17$ и снижение синтеза $IFN\gamma$ [4].

Одним из функциональных показателей Т-клеток памяти является их пролиферативный потенциал, который снижен по сравнению

с наивными Т-лимфоцитами [27]. Однако при БА данные о пролиферации клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов отсутствуют. Основной целью данной работы было изучение субпопуляционного состава и пролиферативной активности Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в периферической крови и в клеточных культурах *in vitro* у пациентов с БА в сравнении со здоровыми донорами.

Материалы и методы

В исследование вошли 10 пациентов с БА (7 женщин и 3 мужчин), в возрасте от 23 до 60 лет (средний возраст $45,4 \pm 11,8$ лет). На момент забора материала 5 пациентов находились в состоянии ремиссии, 5 пациентов — в состоянии обострения основного заболевания. Группа условно здоровых доноров составила 10 человек (7 женщин и 3 мужчин), в возрасте от 24 до 60 лет (средний возраст $46,2 \pm 11,4$ года). Отбор пациентов и доноров в группы производился с их предварительного информированного письменного согласия. Диагноз БА выставлялся врачами клиники иммунопатологии НИИФКИ в соответствии с GINA-2016.

Метод получения и культивирования клеток периферической крови

Мононуклеарную фракцию выделяли из гепаринизированной периферической крови (ПК) в градиенте плотности фиколл-урографина стандартной методикой. Клетки культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах в объеме 200 мкл в концентрации 150 тыс. на 100 мкл среды RPMI 1640 с содержанием L-глутамина (0,3 мг/мл), гентамицина (50 мкг/мл), тиенама (25 мкг/мл) и 10% фетальной бычьей сыворотки (FCS HyClone, США) в течение 72 часов в CO_2 -инкубаторе при $37^\circ C$. В качестве стимулятора митоза Т-лимфоцитов добавляли фитогемагглютинин (PHA) в конечной концентрации 30 мкг/мл (PHA-P, Sigma). В качестве контроля использовали клетки, культивированные без добавления PHA. Перед культивированием клетки окрашивали витальным красителем CFSE (Molecular probe, США) с конечной концентрацией 1 мкМ в RPMI 1640 в течение 15 мин при $37^\circ C$. Избыток красителя удаляли путем добавления эквивалентного объема FCS.

Проточная цитофлуориметрия

Клетки после 72 часов культивирования снимали, отмывали забуференным физиологическим раствором и окрашивали моноклональными антителами к поверхностным маркерам центральных и эффекторных Т-клеток памяти. Для анализа Т-клеток памяти до культивирова-

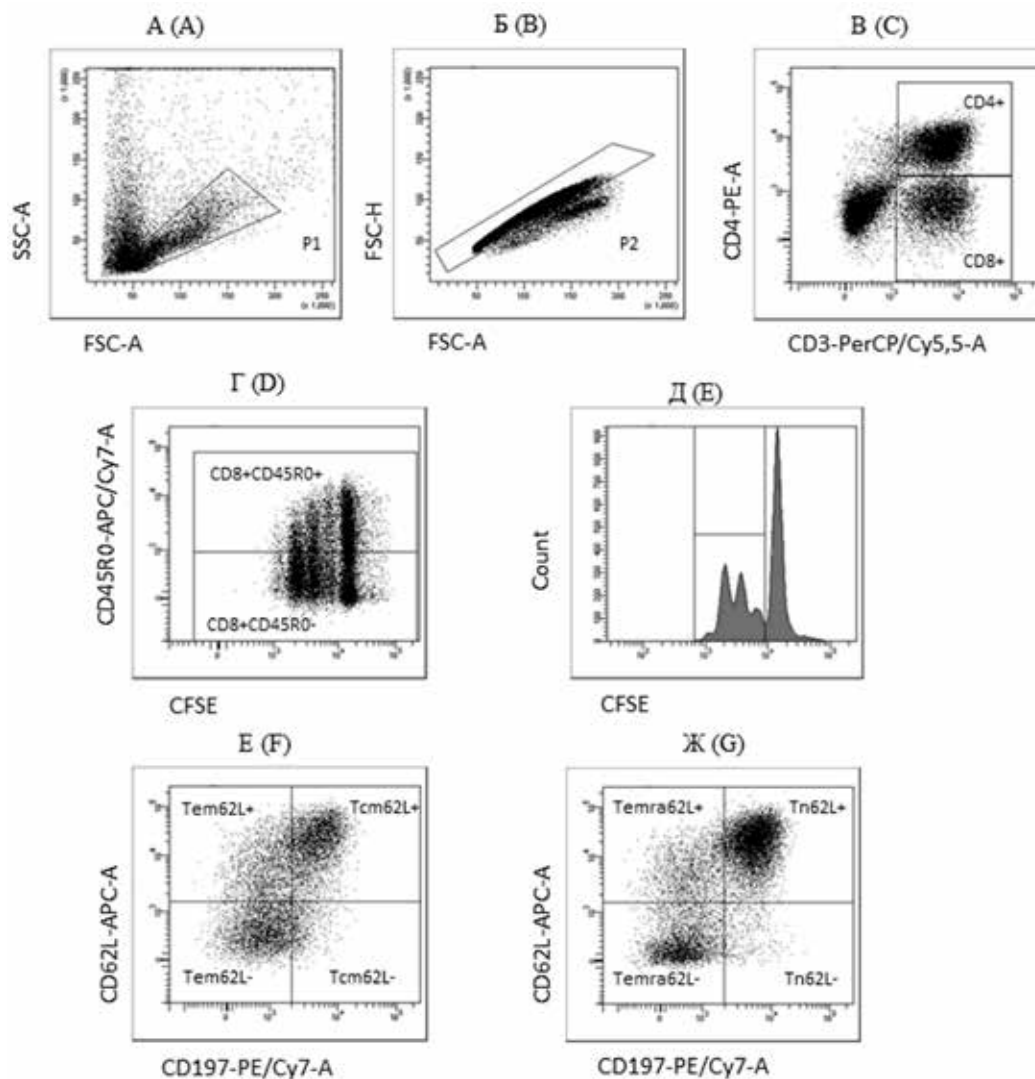


Рисунок 1. Тактика гейтирования наивных Т-лимфоцитов, центральных, эффекторных Т-клеток памяти и терминально-дифференцированных Т-лимфоцитов на примере цитотоксических Т-лимфоцитов, культивированных 72 часа в присутствии ФГА *in vitro*

Примечание. Здесь и далее, на рисунках 4-6: Tnaïve – «наивные» Т-лимфоциты с фенотипом CD45R0⁺CD62L⁺CD197(CCR7)⁺; Tcm – клетки центральной памяти с фенотипом CD45R0⁺CD62L⁺CD197(CCR7)⁺; Tem – клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45R0⁺CD62L⁺CD197(CCR7)⁺; Temra – терминально-дифференцированные Т-клетки памяти с фенотипом CD45R0⁺CD62L⁺CD197(CCR7)⁺. (А) Выделение лимфоцитов периферической крови на основании показателей прямого (FSC) и бокового светорассеяния (SSC). (Б) Удаление из лимфоцитарного гейта дуплетов и триплетов клеток на основании анализа площади и высоты прямого светорассеяния. (В) Выявление Т-лимфоцитов хелперов и киллеров на основании экспрессии маркеров CD3 и CD4. (Г) Разделение цитотоксических Т-лимфоцитов на субпопуляции наивных лимфоцитов и клеток памяти по экспрессии маркера CD45R0. (Д) Гистограмма флуоресценции цитотоксических Т-лимфоцитов, окрашенных CFSE, прошедших 4 деления *in vitro*. (Е) Разделение цитотоксических Т-клеток памяти на Tcm и Tem по экспрессии маркеров CD62L и CD197(CCR7). (Ж) Выделение субпопуляций Tnaïve и Temra по экспрессии маркеров CD62L и CD197(CCR7).

Figure 1. The gating strategy for identification of naïve T lymphocytes, central and effector memory T cells and terminal-differentiated T lymphocytes on the example of cytotoxic T lymphocytes cultivated for 72 hours in the presence of PHA *in vitro*

Note. Here and below on figures 4-6: Tnaïve, naïve CD45R0⁺CD62L⁺CD197(CCR7)⁺ T cells; Tcm, central memory CD45R0⁺CD62L⁺CD197(CCR7)⁺ T cells; Tem, effector memory CD45R0⁺CD62L⁺CD197(CCR7)⁺ T cells; Temra, terminally differentiated CD45R0⁺CD62L⁺CD197(CCR7)⁺ T cells. (A) Identification of peripheral blood lymphocytes based on forward (FSC) and side light scattering (SSC). (B) Singlet gating based on area FSC versus high FSC. (C) Th and Tcyt lymphocytes were identified based on expression of CD3 and CD4. (D) Separation of cytotoxic T-lymphocytes into a subpopulation of naïve T-lymphocytes and memory cells by the expression of the CD45R0 marker. (E) A fluorescence histogram of cytotoxic T-lymphocytes passed 4 divisions *in vitro* (CFSE-staining). (F) Total cytotoxic memory T cells subset was separated into Tcm and Tem by the expression of CD62L and CD197 markers (CCR7). (G) Identification of subpopulations of Tnaïve and Temra by the expression of CD62L and CD197 (CCR7) markers.

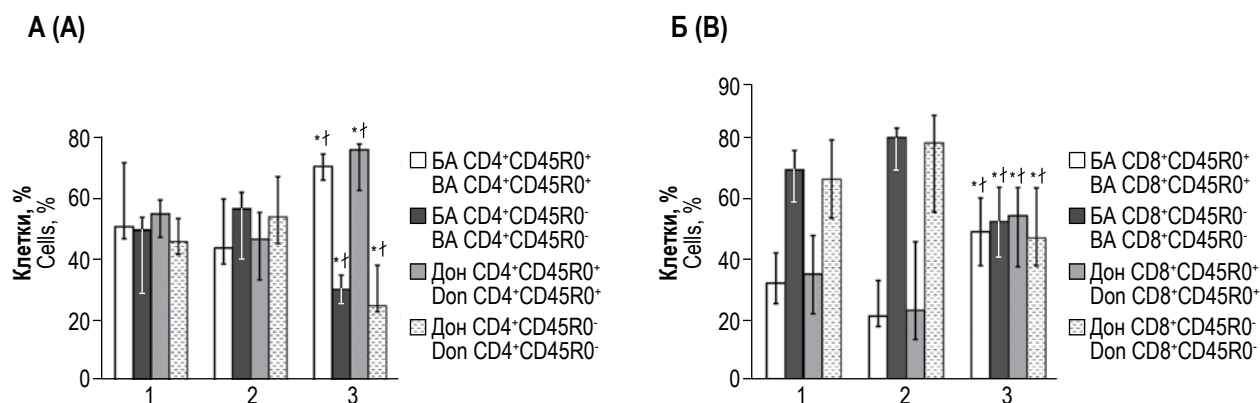


Рисунок 2. Экспрессия маркера CD45R0 на CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитах периферической крови и в культурах у пациентов с БА и здоровых доноров

Примечание. За 100 % принято число клеток в популяциях CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов соответственно. На гистограмме представлены медианы и интерквартильные размахи ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$). (А) CD4⁺Т-лимфоциты; (Б) CD8⁺Т-лимфоциты; 1 – клетки периферической крови до культивирования; 2 – нестимулированная культура; 3 – РНА-стимулированная культура; * – указаны достоверные различия с клетками до культивирования ($p < 0,05$, тест Вилкоксона); † – указаны достоверные различия с клетками нестимулированной культуры ($p < 0,05$, тест Вилкоксона).

Figure 2. CD45R0 expression at CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes of peripheral blood and in cultures in patients with BA and healthy donors

Note. The number of cells in the populations of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is taken for 100%. The histogram shows the medians and interquartile ranges ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$). (A) CD4⁺ T lymphocytes; (B) CD8⁺ T lymphocytes. 1, peripheral blood cells before cultivation; 2, unstimulated culture; 3, PHA-stimulated culture; *, significant differences with cells before cultivation are indicated ($p < 0.05$, Wilcoxon test); †, significant differences with unstimulated cells are indicated ($p < 0.05$, Wilcoxon test).

ния брали свежевыделенные клетки. Применялась следующая панель: CD4-PE (Сорбент, Россия), CD3-PerCP/Cy5.5 (BioLegend, San Diego, CA, США), CD62L-APC (BioLegend, San Diego, CA, США), CD45R0-APC/Cy7 (BioLegend, San Diego, CA, США), CD197 (CCR7)-PE-Cy7 (Beckman Coulter, США) и CD197 (CCR7)-FITC (BioLegend, San Diego, CA, США). 6×10^5 клеток окрашивали данной комбинацией антител по протоколу, рекомендованному производителем. Для анализа CD62L- и CD197-маркеров применялся FMO-контроль (fluorescence minus one), который включал всю панель, за исключением антител к указанным антигенам. Анализ фенотипа Т-клеток проводился на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) с использованием программного обеспечения FACS Diva (BD, США). Субпопуляции с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD45R0⁺CD62L⁺CD197(CCR7)⁺ оценивались как наивные Т-клетки хелперы или цитотоксические лимфоциты соответственно. Центральным клеткам памяти соответствовал фенотип CD3⁺CD4⁺CD45R0⁺CD62L⁺CD197(CCR7)⁺. Эффекторные Т-лимфоциты памяти распознавались как CD3⁺CD4⁺CD45R0⁺CD62L⁺CD197(CCR7)⁺; CD45R0⁺ эффекторные Т-клетки с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD197(CCR7)⁺ определялись как субпопуляции терминально-диф-

ференцированных эффекторных Т-лимфоцитов (Temra) с различной экспрессией CD62L. Анализ пролиферативной активности заключался в определении относительного числа пролиферирующих клеток, окрашенных CFSE, по уровню их флуоресценции, и не включал в себя пик неделящихся клеток (рис. 1Д).

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Распределение параметров в группах отличалось от нормального, поэтому применялись методы непараметрической статистики. Для оценки значимости различий между группами больных и доноров использовали критерий Манна–Уитни, для сравнения двух связанных групп применяли критерий Вилкоксона. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Ранговый корреляционный анализ Спирмена использовался для изучения связи параметров Т-клеток с возрастом в группах пациентов и доноров.

Результаты

В процессе дифференцировки Т-лимфоцитов переход от наивных форм к эффекторным и клеткам памяти сопровождается сменой CD45-маркера с изотипа CD45RA на CD45R0. В груп-

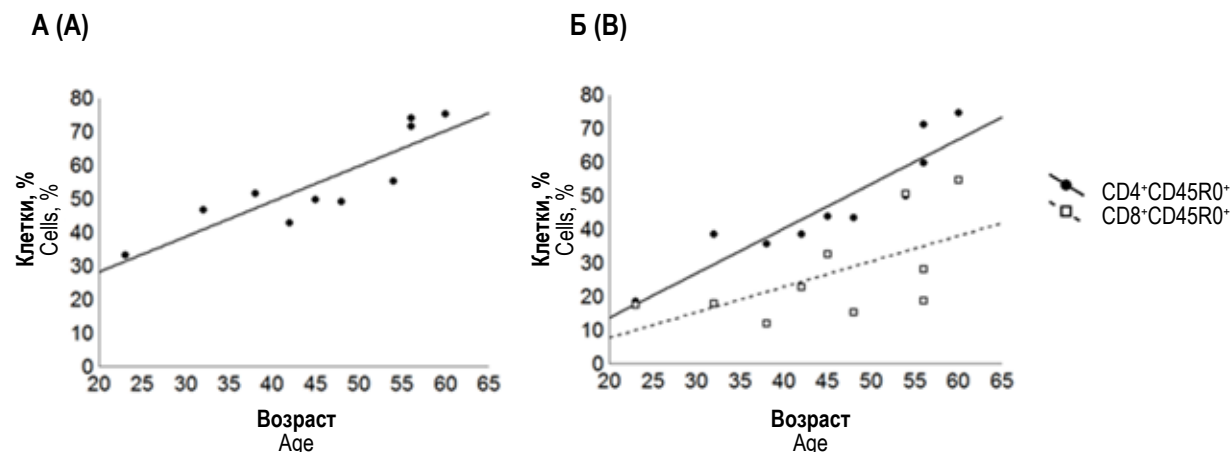


Рисунок 3. Корреляционная взаимосвязь количества $CD4^+CD45R0^+$ и $CD8^+CD45R0^+$ -лимфоцитов с возрастом у пациентов с БА

Примечание. За 100% принято число клеток в популяциях $CD4^+$ и $CD8^+$ -Т-лимфоцитов соответственно. (А) $CD4^+CD45R0^+$ клетки периферической крови до культивирования, ($R = 0,88$, $p < 0,001$); (Б) $CD4^+CD45R0^+$ клетки ($R = 0,96$, $p < 0,001$) и $CD8^+CD45R0^+$ клетки ($R = 0,63$, $p < 0,05$) в культурах без стимуляции.

Figure 3. Correlation of the percentage of $CD4^+CD45R0^+$ and $CD8^+CD45R0^+$ T lymphocytes with age in patients with BA

Note. The number of cells in the populations of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes is taken for 100%. The correlation analysis was carried out using the Spearman method. (A) $CD4^+CD45R0^+$ lymphocytes ($R = 0.88$, $p < 0.001$) from peripheral blood before culturing; (B) $CD4^+CD45R0^+$ lymphocytes ($R = 0.96$, $p < 0.001$) and $CD8^+CD45R0^+$ lymphocytes ($R = 0.63$, $p < 0.05$) from unstimulated culture.

пах пациентов и доноров среди $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов экспрессия маркера $CD45R0$ достоверно возрастала после стимуляции РНА по сравнению с клетками периферической крови (рис. 2А, Б). Экспрессия $CD45R0$ в $CD4^+$ и $CD8^+$ клетках культуры без стимуляции не отличалась от клеток периферической крови и была достоверно ниже, чем показатели РНА-стимулированных лимфоцитов. Относительное количество $CD45R0$ -негативных клеток, напротив, снижалось после стимулирования РНА (рис. 2А, Б). Интересно, что экспрессия маркера $CD45R0$ на $CD8^+$ лимфоцитах периферической крови и в культуре без стимуляции была ниже, чем на $CD4^+$ лимфоцитах.

Представлялось интересным выяснить взаимосвязь возраста с содержанием $CD45R0^+$ клеток. Было обнаружено, что относительное количество $CD4^+CD45R0^+$ клеток периферической крови положительно коррелирует с возрастом у пациентов с БА (рис. 3А). Также в группе пациентов положительная корреляция содержания $CD4^+CD45R0^+$ и $CD8^+CD45R0^+$ клеток с возрастом наблюдалась в нестимулированной культуре (рис. 3Б). В РНА-стимулированной культуре у пациентов с БА корреляции не было выявлено. В то же время содержание $Tnaïve$, которые определялись как $CD4^+CD45R0^-$ и $CD8^+CD45R0^-$ клетки, было обратно пропорционально возрасту в периферической крови и в нестимулированной культуре у пациентов с БА. У здоровых доноров

достоверные корреляции между изучаемыми параметрами отсутствовали.

Дальнейшее изучение субпопуляционного состава $CD45R0^+$ и $CD45R0^-$ клеток проводилось с одновременным использованием маркеров $CCR7$ и $CD62L$, которые являются молекулами хоуминга для Т-лимфоцитов и позволяют надежно разделить Т-клетки памяти на центральные и эффекторные [21]. Анализ субпопуляционного состава $CD4^+$ лимфоцитов показал, что у пациентов с БА в периферической крови достоверно снижено содержание $Tem62L^+$ клеток по сравнению со здоровыми донорами (рис. 4А). После стимуляции РНА это отличие отсутствовало. При этом после стимуляции митогеном у пациентов повышалось содержание $Tem62L^+$, тогда как у доноров содержание $Tem62L^+$ достоверно не изменялось относительно показателей периферической крови. Другие клеточные субпопуляции в ответ на стимуляцию РНА также изменялись по сравнению с показателями периферической крови. Относительное количество $Tcm62L^+$ клеток достоверно повышалось в группах пациентов и доноров. Тогда как содержание $Tcm62L^-$ снижалось, но достоверно только в группе пациентов с БА. Содержание $CD4^+Tem62L^-$ после стимуляции РНА повышалось по сравнению с периферической кровью и у доноров, и у пациентов. В субпопуляции $CD4^+Tnaïve$ происходило снижение числа $62L^-$ -позитивных клеток, но оно было достоверным только в группе пациентов (рис. 4Б).

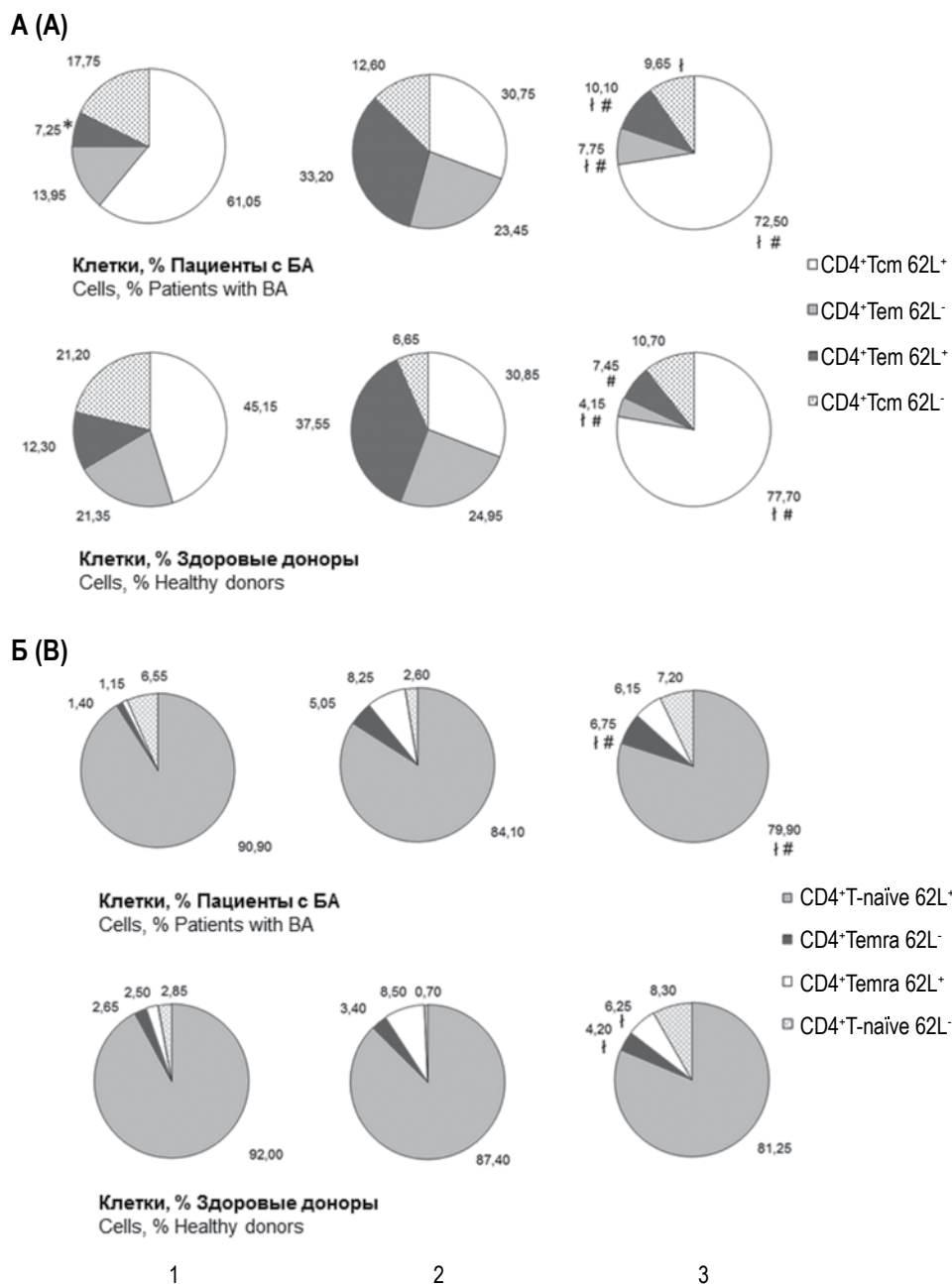


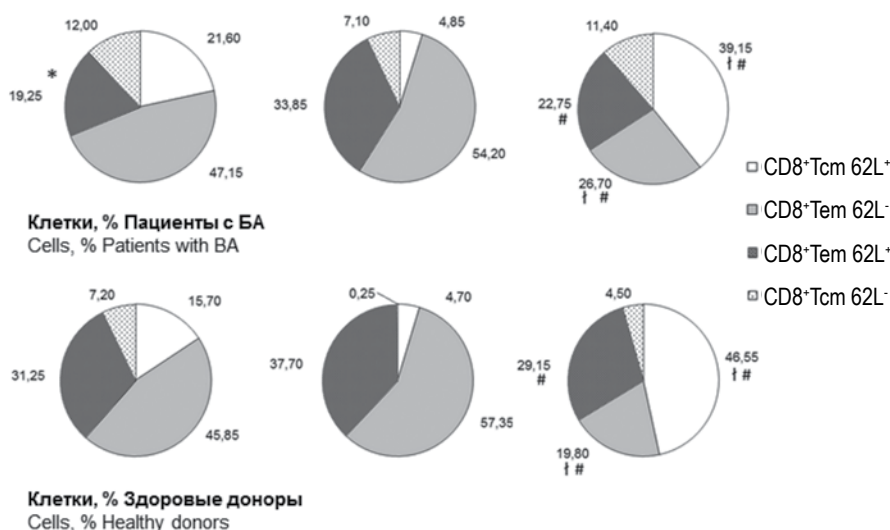
Рисунок 4. Соотношение субпопуляций наивных Т-лимфоцитов, центральных, эффекторных Т-клеток памяти и терминально-дифференцированных CD4⁺Т-лимфоцитов в периферической крови и в культурах у пациентов с БА и здоровых доноров

Примечание. За 100 % принято число клеток в популяциях CD4⁺CD45R0⁺ и CD4⁺CD45R0⁻Т-лимфоцитов. На диаграмме представлены медианы. (А) CD4⁺CD45R0⁺Т-лимфоциты; (Б) CD4⁺CD45R0⁻Т-лимфоциты; 1 – клетки периферической крови до культивирования; 2 – нестимулированная культура; 3 – РНА-стимулированная культура; † – указаны достоверные различия с клетками периферической крови до культивирования ($p < 0,05$, тест Вилкоксона); # – указаны достоверные различия с клетками нестимулированной культуры ($p < 0,05$, тест Вилкоксона); * – указаны достоверные различия между группами пациентов с БА и здоровых доноров ($p < 0,05$, Манна–Уитни U-тест).

Figure 4. The subpopulations of naïve, central and effector memory CD4⁺T cells and terminal-differentiated CD4⁺T lymphocytes in peripheral blood and in cultures in patients with BA and healthy donors

Note. The number of cells in the populations of CD4⁺CD45R0⁺ and CD4⁺CD45R0⁻T lymphocytes is taken for 100%. The diagram shows the medians. (A) CD4⁺CD45R0⁺T lymphocytes; (B) CD4⁺CD45R0⁻T lymphocytes; 1, peripheral blood cells before cultivation; 2, unstimulated culture; 3, PHA-stimulated culture; †, significant differences with cells before cultivation are indicated ($p < 0.05$, Wilcoxon test); #, significant differences with unstimulated cells are indicated ($p < 0.05$, Wilcoxon test); *, significant differences between the relevant groups ($p < 0.05$, Mann–Whitney U-test).

А (А)



Б (В)

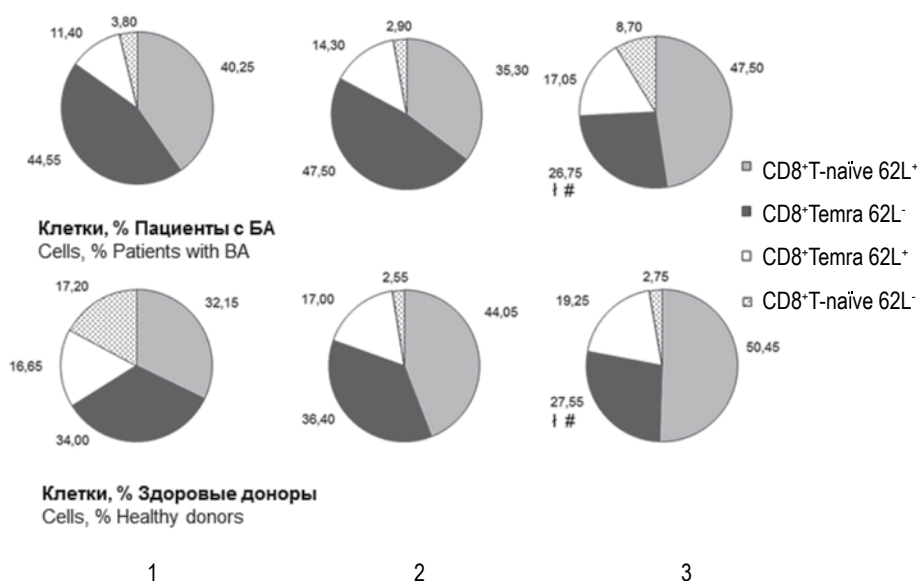


Рисунок 5. Соотношение субпопуляций наивных Т-лимфоцитов, центральных, эффекторных Т-клеток памяти и терминально-дифференцированных CD8⁺Т-лимфоцитов в периферической крови и в культурах у пациентов с БА и здоровых доноров

Примечание. За 100 % принято число клеток в популяциях CD8⁺CD45R0⁺ и CD8⁺CD45R0⁻Т-лимфоцитов. На диаграмме представлены медианы. (А) CD8⁺CD45R0⁺Т-лимфоциты; (Б) CD8⁺CD45R0⁻Т-лимфоциты; 1 – клетки периферической крови до культивирования; 2 – нестимулированная культура; 3 – PHA-стимулированная культура; † – указаны достоверные различия с клетками до культивирования ($p < 0,05$, тест Вилкоксона); # – указаны достоверные различия с нестимулированными клетками ($p < 0,05$, тест Вилкоксона); * – указаны достоверные различия между группами пациентов с БА и здоровых доноров ($p < 0,05$, Манна–Уитни U-тест).

Figure 5. The subpopulations of naïve, central and effector memory CD8⁺T cells and terminal-differentiated CD8⁺T lymphocytes in peripheral blood and in cultures in patients with BA and healthy donors

Note. The number of cells in the populations of CD8⁺CD45R0⁺ and CD8⁺CD45R0⁻T lymphocytes is taken for 100%. The diagram shows the medians. (A) CD8⁺CD45R0⁺T lymphocytes; (B) CD8⁺CD45R0⁻T lymphocytes; 1, peripheral blood cells before cultivation; 2, unstimulated culture; 3, PHA-stimulated culture; †, significant differences with cells before cultivation are indicated ($p < 0.05$, Wilcoxon test); #, significant differences with unstimulated cells are indicated ($p < 0.05$, Wilcoxon test); *, significant differences between the relevant groups ($p < 0.05$, Mann–Whitney U-test).

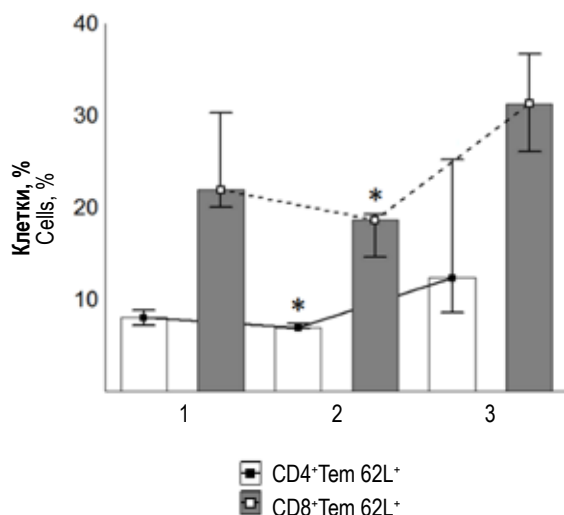


Рисунок 6. Содержание CD4⁺Tem 62L⁺ и CD8⁺Tem 62L⁺ клеток в периферической крови у пациентов с БА в стадии ремиссии, в обострении и у здоровых доноров
Примечание. За 100% принято число клеток в популяциях CD4⁺CD45R0⁺ и CD8⁺CD45R0⁺ Т-лимфоцитов соответственно. На гистограмме представлены медианы и интерквартильные размахи (Q_{0,25}–Q_{0,75}). 1 – пациенты с БА в стадии ремиссии; 2 – пациенты с БА в стадии обострения; 3 – здоровые доноры; * – указаны достоверные различия с группой доноров (p < 0,05, Манна–Уитни U-тест).

Figure 6. CD4⁺Tem62L⁺ and CD8⁺Tem62L⁺ cells in peripheral blood in patients with BA in remission, in exacerbation and in healthy donors

Note. The number of cells in the populations of CD4⁺CD45R0⁺ and CD8⁺CD45R0⁺ T lymphocytes is taken for 100%. 1, patients with BA in remission; 2, patients with BA in exacerbation; 3, healthy donors; *, significant differences with group of healthy donors are indicated (p < 0.05, Mann–Whitney U-test).

Интересно, что в отличие от периферической крови в культуре без стимуляции не было субпопуляционных различий между Т-лимфоцитами пациентов и доноров. Но содержание Tem62L⁺ клеток в культуре без стимуляции было достоверно больше, а Tcm62L⁺ достоверно меньше, чем в РНА-стимулированной культуре, как в группе пациентов, так и доноров.

Субпопуляционный состав CD8⁺ лимфоцитов во многом был сходен с CD4⁺. Во-первых, у пациентов с БА также было достоверно снижено количество CD8⁺Tem62L⁺ в периферической крови по сравнению со здоровыми донорами. Во-вторых, в стимулированных клетках и в культуре без стимуляции отличий по этой субпопуляции между пациентами и донорами не было (рис. 5А). И у доноров, и у пациентов содержание CD8⁺Tcm62L⁺ клеток было достоверно выше, а CD8⁺Tem62L⁺ и CD8⁺Temra62L⁺ – достоверно

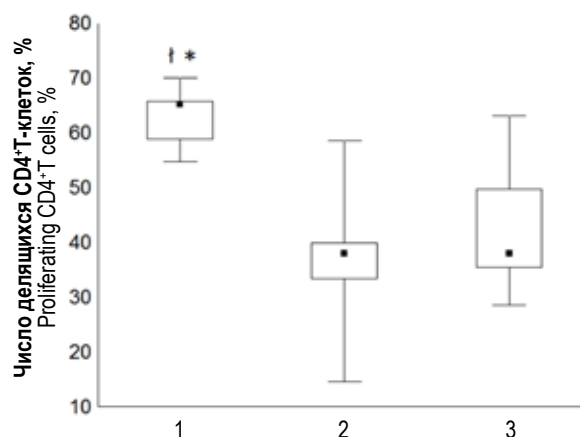


Рисунок 7. Количество пролиферирующих CD4⁺Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию РНА у пациентов с БА в стадии ремиссии, в обострении и у здоровых доноров

Примечание. За 100% принято общее количество CD4⁺Т-лимфоцитов в культуре. Данные представлены в виде медианы, минимальных и максимальных значений и интерквартильных размахов (Q_{0,25}–Q_{0,75}). 1 – пациенты с БА в стадии ремиссии; 2 – пациенты с БА в стадии обострения; 3 – здоровые доноры; † – указаны достоверные различия с группой пациентов с БА, находящихся в обострении (p < 0,05, Манна–Уитни U-тест); * – указаны достоверные различия с группой доноров (p < 0,01, Манна–Уитни U-тест).

Figure 7. The number of proliferating CD4⁺T lymphocytes in response to PHA-stimulation in patients with BA in remission, in exacerbation and healthy donors

Note. The total number of CD4⁺T lymphocytes in culture is taken for 100%. Data in the diagram are given as median, interquartile range (Q_{0,25}–Q_{0,75}) and minimum and maximum values for each variable. 1, patients with BA in remission; 2, patients with BA in exacerbation; 3, healthy donors; †, significant differences with group of BA patients in exacerbation (p < 0.05, Mann–Whitney U-test); *, significant differences with group of healthy donors are indicated (p < 0.01, Mann–Whitney U-test).

ниже в РНА-стимулированной культуре по сравнению с клетками периферической крови и не-стимулированной культурой (рис. 5А, Б). Субпопуляция CD8⁺Tnaïve в процессе культивирования достоверно не изменялась ни в одной из групп.

Был изучен субпопуляционный состав CD4⁺ и CD8⁺ клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при разных стадиях БА. Обнаружено, что количество CD4⁺Tem62L⁺ и CD8⁺Tem62L⁺ клеток статистически достоверно снижено у пациентов, находящихся в стадии обострения по сравнению с донорами (рис. 6). По другим субпопуляциям различий между группой доноров и группами пациентов обнаружено не было.

Спонтанная пролиферация Т-лимфоцитов в культуре без стимуляции доходила до 1,25%

в группе пациентов с БА и 0,4% в группе доноров. При анализе митотической активности клеток, стимулированных РНА, было показано, что митоз $CD4^+$ лимфоцитов у пациентов в стадии ремиссии БА был достоверно выше, чем у пациентов в обострении и здоровых доноров (рис. 7). При этом анализ по субпопуляциям показал, что у пациентов в стадии ремиссии пролиферация была достоверно выше среди $CD4^+Tem62L^-$, $CD4^+Tcm62L^+$, $CD4^+Tcm62L^-$, а также $CD8^+Tcm62L^+$ и $CD8^+Tcm62L^-$ лимфоцитов по сравнению с пациентами в стадии обострения и донорами. Сравнение проводилось между группами с использованием критерия Манна–Уитни (данные не представлены).

Со стороны $CD8^+$ -лимфоцитов как у доноров, так и у пациентов наиболее активно делились $Tcm62L^+$ и $Tnaïve62L^+$ по сравнению с $Tem62L^+$. У доноров среди $CD4^+$ лимфоцитов активнее всего делились $Tcm62L^+$ клетки, отличий между $Tem62L^+$ и $Tnaïve62L^+$ не было. Тогда как у пациентов с БА $CD4^+Tcm62L^+$ и $CD4^+Tnaïve62L^+$ демонстрировали сходный уровень пролиферации. В то же время $CD4^+Tcm62L^+$ делились активнее, чем $CD4^+Tem62L^+$. Анализ делений $CD4^+Temra$ и $CD8^+Temra$ не проводился в связи с недостаточным количеством клеток в этих субпопуляциях. При этом во всех изучаемых субпопуляциях пролиферация 62L-позитивных клеток была достоверно выше, чем у негативных по 62L клеток. Сравнение разных субпопуляций проводилось в пределах группы методом Вилкоксона (данные не представлены).

Обсуждение

Изучению Т-клеток памяти при БА посвящен ряд работ. Исследования, проведенные на взрослых лицах, отмечают повышенное содержание Т-клеток памяти у пациентов с БА в сравнении со здоровыми лицами, которое ассоциировано со степенью тяжести данного заболевания [2]. Также повышение количества Т-клеток памяти связывают с изменением их функциональной активности и существованием различных эндотипов БА [4]. Количество $Tnaïve$ клеток ($CD4^+CD45R0^-$ и $CD8^+CD45R0^-$), по данным других авторов, не изменяется при БА, что согласуется с нашим исследованием [2, 27]. Хотя нам не удалось выявить изменение содержания Т-клеток памяти ($CD4^+CD45R0^+$ и $CD8^+CD45R0^+$) при БА, выявленное у пациентов увеличение количества Т-клеток памяти и снижение количества $Tnaïve$ с возрастом может быть признаком более раннего старения иммунной системы пациентов по сравнению с донорами. Так, показано, что происхо-

дит снижение количества $Tnaïve$ ($CD45RA^+$ клеток) у лиц пожилого возраста, причем у больных БА оно выражено сильнее, чем у здоровых [24]. Кроме того, накопление $CD4^+$ клеток памяти в периферической крови с возрастом происходит быстрее, чем $CD8^+$ клеток памяти [1]. Последним может объясняться отсутствие корреляции между возрастом и количеством $CD8^+$ клеток памяти в периферической крови у пациентов с БА. Отсутствие корреляции количества Т-клеток памяти с возрастом в РНА-стимулированной культуре свидетельствует о хорошей отвечаемости клеток на неспецифическую стимуляцию у пациентов с БА, которая сопоставима с донорами.

По данным литературы, точная роль различных субпопуляций Т-клеток памяти в патогенезе БА не установлена. Так, в проведенном недавно исследовании, наряду с функциональными изменениями Т-клеток памяти, было выявлено повышенное содержание $TcmCD62L^+$ и $TemCD62L^+$ в $CD4^+$ клетках периферической крови у пациентов с БА [4]. В другой работе было показано, что у взрослых пациентов с БА, вне зависимости от формы и степени тяжести заболевания, повышается число $CD4^+Tcm$, но не $CD4^+Tem$ по сравнению с донорами, что не подтверждается данными нашего исследования [28]. На наш взгляд, обнаруженное снижение количества $CD4^+$ и $CD8^+CD62L^+Tem$ в периферической крови у пациентов, находящихся в обострении БА может быть свидетельством того, что активированные Tem мигрируют на периферию в стадии обострения БА и находятся преимущественно в дыхательных путях в виде резидентных Tem . Последнее подтверждается сообщениями о преобладании $CD4^+T$ -лимфоцитов с фенотипом клеток памяти в нижних дыхательных путях у пациентов с БА [11, 20]. При этом считается, что $CD4^+T$ -клетки памяти при обострении БА активированы больше, чем в ремиссии и характеризуются сниженной чувствительностью к апоптозу [2, 13, 20]. Кроме того, в последних опытах на мышинных моделях показано, что именно резидентные тканевые $CD4^+T$ -клетки памяти поддерживают сенсibilизацию к причинно-значимому аллергену и содействуют быстрой прогрессии патологического процесса в легочной ткани [25]. Хотя значение $CD8^+T$ -клеток памяти менее изучено, признано, что активированные цитотоксические Т-лимфоциты, аналогично Т-хелперам, инфильтрируют дыхательные пути при БА, что ассоциировано со снижением функции внешнего дыхания и может служить предиктором неблагоприятного исхода БА [5, 19, 26].

Результаты субпопуляционного анализа также показали, что $T_{cm}62L^+$ лимфоциты более чувствительны к РНА, чем другие субпопуляции Т-клеток памяти. А увеличение количества $CD4^+T_{cm}62L^+$ у пациентов с БА в ответ на стимуляцию РНА может говорить о переходе T_{cm} в $CD4^+T_{cm}62L^+$. Так как было показано, что T_{cm} способны дифференцироваться в T_{em} , например под воздействием факторов гомеостатической пролиферации (IL-7, IL-15) [8, 9]. Также это свидетельствует о том, что у пациентов с БА T_{em} находятся в активированном состоянии. Подтверждением последнего служат данные о повышенной экспрессии CD25- и HLA-DR-маркеров и сниженной индукции апоптоза в $CD4^+$ лимфоцитах у пациентов с БА [12, 23]. Снижение количества $CD4^+T_{naïve}$ у пациентов с БА при стимулировании РНА может быть связано с их способностью переходить в клетки памяти [9]. Интересно, что количество $CD8^+62L^+T_{em}га$ не изменялось, а $CD8^+62L^-T_{em}га$ уменьшалось как у пациентов, так и у доноров. Это может быть вызвано более низкой отвечаемостью и выживаемостью $CD8^+T_{em}га$ на воздействие различных стимулов [8].

Рассматривая пролиферативную активность Т-лимфоцитов на воздействие митогеном, следует отметить, что РНА, с одной стороны, является неспецифическим стимулятором, а с другой — имитирует TCR-опосредованный ответ, так как вызывает поликлональный ответ Т-лимфоцитов *in vivo*. Считается, что в норме, в ответ на стимуляцию TCR, $T_{naïve}$ и T_{cm} пролиферируют существенно сильнее, чем T_{em} [8, 9]. Данные нашего исследования в целом совпадают с литературными. Вместе с тем в группе доноров $CD4^+T_{cm}$ делились даже активнее, чем $CD4^+T_{naïve}$. С одной стороны, эти данные могут говорить о том, что стимуляция РНА близка к модели TCR-активации. А с другой стороны, они свидетельствуют о лучшей отвечаемости T_{cm} по сравнению с $T_{naïve}$ при стимуляции РНА. Интересно, что пролиферация в ответ на РНА среди субпопуляций $CD4^+$ Т-клеток памяти выше в группе пациентов с ремиссией БА, чем у пациентов в обострении и доноров. Возможно, такая реакция на митоген вызвана тем, что Т-клетки памяти в стадии ремиссии находятся в состоянии «повышенной готовности» к иммунному ответу, в отличие от Т-клеток памяти у доноров и пациентов в обострении.

Обращает на себя внимание, что среди всех субпопуляций Т-клеток памяти лучшим образом пролиферируют после воздействия РНА $CD62L$ -позитивные клетки. Известно, что $CD4^+CD45R0^+CD62L^-$ и $CD4^+CD45R0^+CD62L^+$

клетки по экспрессии транскрипционных факторов и синтезу цитокинов функционально поляризованы в сторону Th1- и Th2-лимфоцитов соответственно [17]. Стимуляция лимфоцитов периферической крови РНА *ex vivo* приводит к повышению секреции IL-5 у здоровых лиц и больных БА, а также сопровождается повышением IL-4 и тенденцией к снижению секреции IFN γ у пациентов с БА по сравнению с донорами [6, 23]. Учитывая это, обнаруженные нами особенности изменения субпопуляционного состава на РНА со стороны $CD4^+$ клеток памяти могут также объясняться функциональной поляризацией $CD62L^+$ клеток в сторону Th2-лимфоцитов. В свою очередь, $CD8^+$ Т-лимфоциты под воздействием Th2-условий могут быть частично поляризованы в сторону цитотоксических Т-лимфоцитов 2 типа. При этом активация $CD8^+$ лимфоцитов в Th2-условиях способствует поддержанию экспрессии CCR7, но снижает экспрессию маркера $CD62L$ [7]. Поскольку в нашем исследовании проводилось совместное культивирование $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов, то воздействием цитокинов Th2-типа может частично объясняться преимущественное поддержание $CD8^+CCR7^+$ субпопуляций ($T_{naïve}$ и T_{cm}) при стимулировании РНА как у доноров, так и у пациентов. Вместе с тем в нашем исследовании отсутствовало повышение количества $CD62L$ -клеток в большинстве субпопуляций. Это может говорить о том, что клетки успешно вступают в деление, так как экспрессия L-селектина повышается при активной пролиферации [7].

Таким образом, показанное для пациентов с БА увеличение количества $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти и уменьшение содержания наивных Т-лимфоцитов с возрастом позволяют предполагать их вовлеченность в процесс развития БА. Вместе с тем пролиферативная реакция Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов на митоген-индуцированную стимуляцию свидетельствуют о сохранности их функциональных свойств при БА. Оценка количества $CD4^+T_{em}CD62L^+$ и $CD8^+T_{em}CD62L^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с БА нуждается в дальнейших исследованиях, поскольку, по нашему мнению, служит косвенным показателем активности воспалительного процесса в бронхиальном дереве. И в перспективе, будучи более доступным, безопасным и менее инвазивным методом, чем проведение бронхиальной биопсии и взятие бронхоальвеолярного лаважа, может явиться информативным маркером, который позволит идентифицировать тяжесть заболевания и группу риска для пациента с БА.

Список литературы / References

1. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Копыльцова Е.А., Алешкин В.А. Возрастная динамика экспрессии изоформ CD45-T-хелперами и Т-цитотоксическими лимфоцитами крови здоровых людей // Иммунология, 2014. Т. 35, № 4. С. 229-232. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Kopyltsova E.A., Alyoshkin V.A. Age-dependent dynamics of the CD45 isoforms expression on the T helper and T cytotoxic lymphocytes in the blood of the healthy people. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no. 4, pp. 229-232. (In Russ.)]
2. Abdulmir A.S., Hafidh R.R., Abubakar F., Abbas K.A. Changing survival, memory cell compartment, and T-helper balance of lymphocytes between severe and mild asthma. *BMC Immunol.*, 2008, Vol. 9, p. 73.
3. Amelink M., de Groot J.C., de Nijs S.B., Lutter R., Zwinderman A.H., Sterk P.J., ten Brinke A., Bel E.H. Severe adult-onset asthma: A distinct phenotype. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, no. 2, pp. 336-341.
4. Chen Z., Pan J., Jia Y., Li D., Min Z., Su X., Yuan H., Shen G., Cao S., Zhu L., Wang X. Effect of memory CD4⁺ T-cells' signal transducer and activator of transcription (STATs) functional shift on cytokine-releasing properties in asthma. *Cell Biol. Toxicol.*, 2017, Vol. 33, no. 1, pp. 27-39.
5. den Otter I., Willems L.N.A., van Schadewijk A., van Wijngaarden S., Janssen K., de Jeu R.C., Sont J.K., Sterk P.J., Hiemstra P.S. Lung function decline in asthma patients with elevated bronchial CD8, CD4 and CD3 cells. *Eur. Respir. J.*, 2016, Vol. 48, no. 2, pp. 393-402.
6. Endo H., Iwamoto I., Nakajima H., Yoshida S. *In vitro* interleukin-5 production of peripheral blood mononuclear cells is increased in patients with asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1993, Vol. 101, no. 4, pp. 425-430.
7. Fox A., Harland K.L., Kedzierska K., Kelso A. Exposure of human CD8⁺ T cells to type-2 cytokines impairs division and differentiation and induces limited polarization. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1141. doi: 10.3389/fimmu.2018.01141.
8. Geginat J., Lanzavecchia A., Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, 2003, Vol. 101, no. 11, pp. 4260-4266.
9. Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory, and effector memory CD4⁺ T cells. *Pathol. Biol.*, 2003, Vol. 51, no. 2, pp. 64-66.
10. Global Initiative for asthma. Global Strategy for asthma management and prevention (2018 updated). Electronic resource. Access mode: <https://ginasthma.org/2018-pocket-guide-for-asthma-management-and-prevention/>.
11. Hondowicz B.D., An D., Schenkel J.M., Kim K.S., Steach H.R., Krishnamurthy A.T., Keitany G.J., Garza E.N., Fraser K.A., Moon J.J., Altemeier W.A., Masopust D., Pepper M. Interleukin-2-dependent allergen-specific tissue resident memory cells drive asthma. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 1, pp. 155-166.
12. Jiang T., Sheng J., Qin Y., Xiong H., Gong Y., Tang H., Zhou J., Deng Z., Zhang H., Cui Y., Qian J., Shen Y., Jin Y. Enhanced proliferation and defective activation-induced cell death of CD4⁺ T cells in childhood asthma. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 2014, Vol. 32, no. 1, pp. 75-83.
13. Lamb J.P., James A., Carroll N., Siena L., Elliot J., Vignola A.M. Reduced apoptosis of memory T-cells in the inner airway wall of mild and severe asthma. *Eur. Respir. J.*, 2005, Vol. 26, no. 2, pp. 265-270.
14. Lloyd C.M., Hessel E.M. Functions of T cells in asthma: more than just Th2 cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 12, pp. 838-848.
15. Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F., Roederer M., Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, no. 11, pp. 2797-2809.
16. Maldonado A., Mueller Y.M., Thomas P., Bojczuk P., O'Connors C., Katsikis P.D. Decreased effector memory CD45RA⁺CD62L⁻CD8⁺ T cells and increased central memory CD45RA⁻CD62L⁺CD8⁺ T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Therapy*, 2003, Vol. 5, no. 2, pp. R91-R96.
17. Matsuzaki S., Shinozaki K., Kobayashi N., Agematsu K. Polarization of Th1/Th2 in human CD4⁺T cells separated by CD62L: analysis by transcription factors. *Allergy*, 2005, Vol. 60, no. 6, pp. 780-787.
18. Miranda C., Busacker A., Balzar S., Trudeau J., Wenzel S.E. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004, Vol. 113, no. 1, pp. 101-108.
19. O'Sullivan S., Cormican L., Faul J.L., Ichinohe S., Johnston S.L., Burke C.M., Poulter L.W. Activated, cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, Vol. 164, no. 4, pp. 560-564.
20. Robinson D.S., Bentley A.M., Hartnell A., Kay A.B., Durham S.R. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. *Thorax*, 1993, Vol. 48, no. 1, pp. 26-32.
21. Sallusto F., Lenig D., Förster R., Lipp M., Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, Vol. 401, no. 6754, pp. 708-712.
22. Sprent J., Surh C.D. Normal T cell homeostasis: the conversion of naïve cells into memory-phenotype cells. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 6, pp. 478-484.
23. Tang C., Rolland J.M., Ward C., Bish R., Thien F., Walters E.H. Seasonal comparison of cytokine profiles in atopic asthmatics and atopic non-asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, Vol. 154, no. 6, pp. 1615-1622.

24. Todo-Bom A., Mota-Pinto A., Alves V., Santos-Rosa M. Aging and asthma – changes in CD45RA, CD29 and CD95 T cells subsets. *Allergol. Immunopatol.*, 2012, Vol. 40, no. 1, pp. 14-19.
25. Turner D.L., Goldklang M., Cvetkovski F., Paik D., Trischler J., Barahona J., Cao M., Dave R., Tanna N., D'Armiento J.M., Farber D.L. Biased generation and in situ activation of lung tissue-resident memory CD4 T cells in the pathogenesis of allergic asthma. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, no. 5, pp. 1561-1569.
26. van Rensen E.L.J., Sont J.K., Evertse C.E., Willems L.N.A., Mauad T., Hiemstra P.S., Sterk P.J. Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2005, Vol. 172, no. 7, pp. 837-841.
27. Weng N., Levine B.L., June C.H., Hodes R.J., Human naïve and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, Vol. 92, no. 24, pp. 11091-11094.
28. Wiest M., Upchurch K., Yin W., Ellis J., Xue Y., Lanier B., Millard M., Joo H.M., Oh S.K. Clinical implications of CD4⁺T cell subsets in adult atopic asthma patients. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 14, Article no. 7. doi: 10.1186/s13223-018-0231-3.
29. Wisniewski J.A., Muehling L.M., Eccles J.D., Capaldo B.J., Agrawal R., Shirley D.A., Patrie J.T., Workman L.J., Schuyler A.J., Lawrence M.G., Teague W.G., Woodfolk J.A. TH1 signatures are present in the lower airways of children with severe asthma, regardless of allergic status. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 141, no. 6, pp. 2048-2060.

Авторы:

Барковская М.Ш. — младший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Блинова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Гришина Л.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Леонова М.И. — врач аллерголог-иммунолог отделения аллергологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Barkovskaya M.Sh., MD, Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Blinova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Grishina L.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Leonova M.I., MD, Allergologist-Immunologist, Department of Allergology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Непомнящих В.М., врач аллерголог-иммунолог
отделения аллергологии ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Демина Д.В. — к.м.н., врач аллерголог-иммунолог,
заведующий отделением аллергологии ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик
РАН, заведующий лабораторией клинической
иммунопатологии, научный руководитель
НИИФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

Nepomniashchikh V.M., MD, Allergologist-Immunologist,
Department of Allergology, Research Institute of Fundamental
and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Demina D.V., MD, PhD (Medicine), Allergologist-
Immunologist, Head, Department of Allergology, Research
Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., MD, DC (Medicine), Professor, Full Member,
Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical
Immunopathology, Scientific Director, Research Institute of
Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian
Federation

Поступила 09.11.2018
Отправлена на доработку 19.11.2018
Принята к печати 27.12.2018

Received 09.11.2018
Revision received 19.11.2018
Accepted 27.12.2018

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИЕЙ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Устьянцева Л.С., Шамова К.П.,
Бычкова С.В., Боцьковская М.А., Газиева И.А.

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. С целью оценки показателей иммунитета детей, рожденных в сроке сверхранних преждевременных родов (22-27 недель), с бронхолегочной дисплазией (БЛД) различной степени тяжести, проведено динамическое обследование 35 новорожденных: 17 детей с БЛД тяжелой степени, 18 — БЛД легкой и среднетяжелой степени тяжести. Группу сравнения составили 7 детей 22-27 недель гестационного возраста без БЛД. Методом проточной цитометрии определяли количество лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺CD56⁺, CD4⁺CD25⁺) и моноцитов (CD14⁺CD64⁺, CD14⁺HLA-DR⁺), методом иммуноферментного анализа определяли уровень цитокинов (IL-6, IL-8, IL-4). Выявлены особенности иммунного статуса детей с БЛД тяжелой, легкой и среднетяжелой степени тяжести. Установлено, что предикторами формирования БЛД тяжелой степени у детей, рожденных от сверхранних преждевременных родов, являются повышенное содержания IL-8 при рождении и в возрасте 1 месяца жизни, сниженный уровень экспрессии на моноцитах (CD64, HLA-DR) по достижению 1 месяца жизни и CD14⁺CD64⁺ клеток в 38-40 недель постконцептуального возраста.

Выявленные особенности иммунного статуса у новорожденных с БЛД могут быть использованы для оценки эффективности проводимой терапии, что диктует необходимость проведения дальнейших исследований.

Ключевые слова: недоношенные дети, бронхолегочная дисплазия, адаптивный иммунитет, врожденный иммунитет

FEATURES OF IMMUNE RESPONSE IN PRETERM BABIES WITH BRONCHOPULMONARY DISPLASIA OF VARIOUS SEVERITY

Chistyakova G.N., Remizova I.I., Ustyantseva L.S., Shamova K.P.,
Bychkova S.V., Botskovskaya M.A., Gazieva I.A.

Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. To evaluate the immunity indexes in the children who were born with bronchopulmonary dysplasia (BPD) of varying severity at very early delivery terms (22-27 weeks), dynamic examinations were performed

Адрес для переписки:

Ремизова Ирина Ивановна
ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ
620089, Россия, г. Екатеринбург, ул. Родонитовая, 3/1-45.
Тел.: 8 (343) 371-28-30.
E-mail: RemizovaII@yandex.ru

Address for correspondence:

Remizova Irina I.
Ural Research Institute for Maternal and Child Care
620089, Russian Federation, Ekaterinburg,
Rodonitovaya str., 3/1-45.
Phone: 7 (343) 371-28-30.
E-mail: RemizovaII@yandex.ru

Образец цитирования:

Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, Л.С. Устьянцева, К.П. Шамова, С.В. Бычкова, М.А. Боцьковская, И.А. Газиева «Особенности иммунного ответа недоношенных детей с бронхолегочной дисплазией различной степени тяжести» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 517-526.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-517-526
© Чистякова Г.Н. и соавт., 2019

For citation:

G.N. Chistyakova, I.I. Remizova, L.S. Ustyantseva, K.P. Shamova, S.V. Bychkova, M.A. Botskovskaya, I.A. Gazieva "Features of immune response in preterm babies with bronchopulmonary dysplasia of various severity", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 517-526.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-517-526
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-517-526

in 35 infants: 17 children were with severe BPD; 18, with mild-severity and moderately severe BPD. The comparison group consisted of seven children born at 22-27 weeks of gestational age without signs of BPD. Relative numbers of lymphocyte subpopulations (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺CD56⁺, CD4⁺CD25⁺), and monocytes (CD14⁺CD64⁺, CD14⁺HLA-DR⁺) were determined by flow cytometry. The level of cytokines (IL-6, IL-8, IL-4) was measured by enzyme immunoassay technique. The features of immune status in children with BPD of severe, mild and moderate severity were discerned. It was found that the predictors of severe BPD development in the children born at very early terms, are: increased content of IL-8 at birth and at the age of 1 month, reduced level of expression on monocytes (CD64, HLA-DR) on the 1 month of life, and CD14⁺CD64⁺ cells at 38-40 weeks post conception. The revealed features of immune status in newborns with BPD can be used to assess the effectiveness of the therapy, which requires further research in this direction.

Keywords: extremely low body weight, bronchopulmonary dysplasia, adaptive immunity, innate immunity

Введение

По мере увеличения выживаемости детей, родившихся с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ), значимое влияние на состояние их здоровья и качества жизни стала оказывать бронхолегочная дисплазия (БЛД) — заболевание легких, обусловленное нарушением роста и развития альвеол и сосудов малого круга кровообращения [9], имеющее исходы от клинического выздоровления до высокой летальности (11-36%) в первый год жизни [7]. По данным Лебедевой О.В., частота БЛД у недоношенных детей, родившихся с экстремально низкой массой тела, достигает 46,6% [5]. К моменту выписки из стационара большая часть детей с тяжелой БЛД имеют сопутствующие заболевания, обусловленные перинатальным поражением центральной нервной системы (ЦНС), зрения, слуха и других органов и систем, а к годовалому возрасту имеют нарушения в психомоторном развитии и составляют группу риска по формированию обструктивной болезни легких [8, 12]. Общий уровень инвалидизации детей достаточно высок.

Иммунная система является одной из самых уникальных систем организма, обладающих способностью быстро реагировать на различные патогены и регулировать функции систем гомеостаза при патологических процессах, что определяет выживание недоношенного ребенка, особенности течения постнатального периода жизни, эффективность лечебных и реабилитационных мероприятий.

Однако источников, содержащих информацию о факторах врожденного и адаптивного иммунитета, определяющих формирование БЛД, влияющих на тяжесть течения и исход заболевания, крайне мало, что и послужило целью настоящего исследования.

Цель исследования — оценка показателей врожденного и адаптивного иммунитета пуповинной и периферической крови детей, рожденных в сроке сверхранних преждевременных родов, в зависимости от степени тяжести БЛД,

сформировавшейся к постконцептуальному возрасту 38-40 недель.

Материалы и методы

Проспективное исследование включало в себя оценку иммунологических показателей пуповинной и периферической крови детей, родившихся в сроке сверхранних преждевременных родов (22-27 недель). Дети с БЛД в ходе исследования были подразделены на группы в зависимости от степени тяжести: 17 детей с БЛД тяжелой степени (1-я группа), 18 детей с БЛД легкой и среднетяжелой степенью тяжести (2-я группа). Группу сравнения (3-я группа) составили 7 детей 22-27 недель гестационного возраста без БЛД. Проведение данного исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» Минздрава России. От всех матерей нами были получены информированные добровольные согласия на обработку персональных данных, лечение, обследование и забор биологического материала у детей.

Иммунофенотипирование лимфоцитов и моноцитов осуществляли методом проточной лазерной цитофлуориметрии на анализаторе FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (США) с использованием наборов моноклональных антител того же производителя, конъюгированных с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) и фикоэритрином (PE). Определяли количество субпопуляций лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺CD56⁺, CD4⁺CD25⁺) и активированных моноцитов (CD14⁺CD64⁺, CD14⁺HLA-DR⁺). Уровень цитокинов (IL-6, IL-8, IL-4) оценивали методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих тест-систем «Вектор-Бест» (Россия). Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel и Statistica 6. Проверку на нормальность распределения статистических показателей проводили с использованием критерия Колмогорова—Смирнова. При соответствии данных нормальному распределению значения количественных признаков представляли в виде

$M \pm SD$, где M – среднее значение количественного признака, SD – стандартное отклонение среднего. Различия между группами устанавливали при помощи критерия χ^2 (качественные), критерия Стьюдента (количественные). При отклонении распределения от нормального данные представляли в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей ($Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$). Сравнение количественных признаков проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни. Уровень значимости межгрупповых различий с учетом поправки Бонферрони принимали равным 0,017. При $0,05 < p < 0,017$ констатировали тенденцию к изменению параметров.

Результаты

Дети от сверхранних преждевременных родов с БЛД тяжелой степени имели меньший гестационный возраст ($25,4 \pm 1,53$ против $26,2 \pm 0,88$ и $26,57 \pm 0,53$ недель соответственно, $p_{1-2} = 0,04$; $p_{1-3} = 0,01$) и массу тела при рождении ($751,1 \pm 119,4$ г против $844,17 \pm 96,5$ г и $968,57 \pm 33,38$ г соответственно, $p_{1-2} = 0,01$, $p_{1-3, 2-3} = 0,0001$).

При исследовании пуповинной крови детей с БЛД, родившихся в сроке сверхранних преждевременных родов, обнаружено статистически значимое повышение абсолютного количества лейкоцитов (табл. 1).

Абсолютный лимфоцитоз достоверно чаще наблюдался у детей с БЛД тяжелой степени ($p_{1-2} = 0,015$, $p_{1-3} = 0,013$). Также в этой группе детей содержание лимфоцитов $CD3^+$, $CD19^+$ и процентное содержание НК-клеток существенно превышало показатели детей с легкой и среднетяжелой степенью БЛД и детей без БЛД ($p_{1-2} = 0,047$, $p_{1-3} = 0,008$; $p_{1-2} = 0,02$, $p_{1-3} = 0,01$; $p_{1-2, 1-3} = 0,010$), что указывало на активацию Т- и В-клеточного звена иммунитета, а также на повышение цитотоксического потенциала. Необходимо отметить, что у детей 2-й группы наблюдалось повышение абсолютного количества $CD4^+$ клеток ($p_{1-2} = 0,014$, $p_{2-3} = 0,017$).

Ввиду несостоятельности адаптивного иммунитета ребенка раннего возраста основные защитные функции выполняют клетки моноцитарно-макрофагального звена. Статистически значимых различий в уровне экспрессии маркеров активации моноцитов у детей иссле-

ТАБЛИЦА 1. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С БЛД, $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$

TABLE 1. POPULATION AND SUBPOPULATION OF LYMPHOCYTES OF UMBILICAL CORD BLOOD OF PREMATURE INFANTS WITH BPD, $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$

Показатели Parameters	1-я группа Group 1 (n = 17)	2-я группа Group 2 (n = 18)	3-я группа Group 3 (n = 7)
Лейкоциты, $10^9/л$ Leukocytes, $10^9/l$	7,0 (6,4-12,0)*	11,85 (7,15-17,45)**	5,0 (3,78-6,40)
Лимфоциты, $10^9/л$ Lymphocytes, $10^9/l$	5,1 (3,83-9,20)***^	3,44 (3,09-3,69)	3,38 (2,38-3,55)
$CD3^+$, $10^9/л$ $10^9/l$	2,24 (1,85-3,94)**^	1,42 (1,31-1,78)	1,31 (1,02-1,36)
$CD19^+$, $10^9/л$ $10^9/l$	1,06 (0,25-1,46)**^	0,29 (0,22-0,44)	0,43 (0,33-0,49)
$CD4^+$, $10^9/л$ $10^9/l$	1,7 (0,8-2,3)	1,31 (1,13-1,54)***^	0,78 (0,63-0,93)
$CD8^+$, $10^9/л$ $10^9/l$	0,54 (0,30-1,34)	0,45 (0,38-0,48)	0,28 (0,22-0,46)
$CD16^+CD56^+$, %	8,0 (4,0-10,0)***^	3 (2,5-3,5)**	2,0 (2,0-3,0)
$CD25^+CD4^+$, $10^9/л$ $10^9/l$	0,19 (0,06-0,25)**	0,19 (0,10-0,28)**	0,09 (0,03-0,11)

Примечание. 1-я группа – недоношенные новорожденные с БЛД тяжелой степени; 2-я группа – недоношенные новорожденные с БЛД легкой и умеренной степени; 3-я группа – недоношенные новорожденные без БЛД; ** – различия статистически значимы с 3-й группой; ^ – различия статистически значимы между 1-й и 2-й группами (критерий Манна–Уитни) – $p < 0,017$; * ^ – различия значимы на уровне тенденции – $p < 0,05$.

Note. 1st group, premature newborns with severe BPD; 2nd group, premature neonates with BPD of mild and moderate degree; 3rd group, premature neonates without BPD; **, the differences are statistically significant with the 3rd group; ^, the D-differences are statistically significant between the 1st and 2nd groups (the Mann–Whitney test) – $p < 0.017$; * ^, the differences are significant at the level of the trend – $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ МОНОЦИТОВ И УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С БЛД, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. MARKERS OF MONOCYTE ACTIVATION AND CYTOKINE LEVEL OF UMBILICAL CORD BLOOD OF PREMATURE INFANTS WITH BPD, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	1-я группа Group 1 (n = 17)	2-я группа Group 2 (n = 18)	3-я группа Group 3 (n = 7)
CD14 ⁺ CD64 ⁺ , %	17,5 (7,75-38,25)	17 (12-32)	28,5 (20,25-36,75)
CD14 ⁺ CD64 ⁺ , 10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,09 (0,04-0,22)	0,05 (0,04-0,15)	0,29 (0,16-0,41)
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	23,0 (14,25-29,00)	21 (10-61)	11 (7-22)
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , 10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,10 (0,09-0,31)	0,05 (0,04-0,13)	0,06 (0,04-0,19)
IL-6, пг/мл pg/ml	120,43 (12,60-160,78)*	110,3 (20,75-166,05)*	16,5 (12,01-61,15)
IL-8, пг/мл pg/ml	85,32 (70,76-120,80)**	131,1 (79,42-172,40)**	46,32 (39,03-53,29)
IL-4, пг/мл pg/ml	0,74 (0,48-0,87)	0,48 (0,22-0,80)	0,61 (0,42-0,84)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С БЛД В 1 МЕСЯЦ ЖИЗНИ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. PARAMETERS OF ADAPTIVE IMMUNITY OF PERIPHERAL BLOOD OF PREMATURE INFANTS WITH BPD IN 1 MONTH OF LIFE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	1-я группа Group 1 (n = 17)	2-я группа Group 2 (n = 18)	3-я группа Group 3 (n = 7)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /L	10,9 (9,8-14,1)	10,21 (7,95-11,42)	8,15 (7,63-9,64)
Лимфоциты, 10 ⁹ /л Lymphocytes, 10 ⁹ /L	3,43 (1,93-4,35)*	4,42 (3,35-6,12)	4,93 (4,44-5,89)
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	2,39 (1,21-2,47)	2,12 (1,56-3,14)	2,32 (2,18-2,38)
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,26 (0,22-0,50)	0,49 (0,17-0,65)	0,77 (0,57-0,81)
CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	1,82 (0,37-1,83)	1,24 (1,18-2,21)	1,79 (1,65-1,86)
CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,72 (0,54-0,83)	0,94 (0,55-1,16)*	0,62 (0,50-0,64)
CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	17 (10-18)	10 (7,0-15,5)	11 (10,5-11,0)
CD25 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,17 (0,08-0,19)	0,21 (0,17-0,42)	0,29 (0,24-0,30)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

дующих групп не выявлено. Тем не менее у недоношенных детей с БЛД, вне зависимости от степени тяжести данной патологии, отмечалось статистически значимое повышение уровня IL-8 ($p_{1-3,2-3} = 0,015$) и увеличение на уровне тенденции IL-6 ($p_{1-3} = 0,03$; $p_{2-3} = 0,05$) (табл. 2).

Согласно результатам динамического наблюдения у новорожденных обеих групп с БЛД к 28-м суткам жизни происходила нормализации параметров адаптивного иммунитета (табл. 3). Тем не менее, на уровне тенденции, у детей 1-й группы отмечалось снижение абсолютного коли-

чества лимфоцитов ($p_{1-3} = 0,03$), у детей 2-й группы — повышение числа $CD8^+$ клеток ($p_{2-3} = 0,04$).

При сравнении показателей врожденного иммунитета детей от сверхранних преждевременных родов, вне зависимости от степени тяжести БЛД, выявлено статистически значимое снижение относительного количества $HLA-DR^+$ моноцитов ($p_{1-3, 2-3} = 0,01$) и уменьшение числа $CD14^+CD64^+$ клеток ($p_{1-3} = 0,007$, $p_{1-2} = 0,004$) у детей с тяжелой формой заболевания (табл. 4). У новорожденных с БЛД тяжелой степени сохранялось статистически значимое повышение уровня $IL-8$ в отличие от детей с легкой и среднетяжелой формой заболевания ($p_{1-3} = 0,010$, $p_{2-3} = 0,03$).

К постконцептуальному возрасту (ПКВ) 38-40 недель в периферической крови детей с тяжелой степенью БЛД на фоне повышенного процентного содержания НК-клеток ($p_{1-3} = 0,01$) регистрировалось снижение абсолютного количества $CD3^+$ и $CD4^+$ лимфоцитов относительно показателей детей без БЛД ($p_{1-3} = 0,025$, $p_{1-3} = 0,01$) (табл. 5).

При исследовании маркеров активации моноцитов периферической крови в этой группе детей сохранялось снижение экспрессии $CD64^+$ ($p_{1-2} = 0,01$, $p_{1-3} = 0,03$) моноцитами крови по сравнению с показателями детей, имеющих легкую и среднюю степень и детей без БЛД того же гестационного возраста (табл. 6). Содержание провоспалительных и регуляторных цитокинов в сыворотке периферической крови у всех недоношенных детей с БЛД, по достижении ПКВ

38-40 недель, не отличалось от показателей детей без БЛД.

Обсуждение

Одними из основных факторов риска развития БЛД являются масса тела и срок гестации. В основе многофакторной этиологии БЛД лежит гипоксия, внутриутробные инфекции, сопутствующая патология, дефицит сурфактанта, гипероксигенация организма, которые приводят к развитию и прогрессированию воспалительного процесса, а также оказывают повреждающее действие на сосудисто-капиллярную сеть, включая сосуды легких.

Согласно мнению многих авторов, развивающаяся воспалительная реакция при бронхолегочной дисплазии вследствие повреждения легочной ткани является результатом иммунопатологических процессов, протекающих на системном и локальном уровнях [1, 4, 9]. В литературе имеются сведения, что для бронхолегочной дисплазии не характерна выраженная иммуносупрессия по клеточному типу. В результате проведенного динамического исследования у недоношенных детей в возрасте от 1 месяца до 3-х лет Мустафаевым И.А. и соавт. установлено отсутствие статистически значимых изменений в содержании основных популяций лимфоцитов в фазе обострения и фазе ремиссии, за исключением сниженного процентного содержания $CD3^+$ -клеток [6]. Аналогичные данные получены при проведении настоящего исследования. Установ-

ТАБЛИЦА 4. МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ МОНОЦИТОВ И УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С БЛД В 1 МЕСЯЦ ЖИЗНИ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 4. MARKERS OF MONOCYTE ACTIVATION AND CYTOKINE LEVEL OF PERIPHERAL BLOOD OF PREMATURE INFANTS WITH BPD IN 1 MONTH OF LIFE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	1-я группа Group 1 (n = 17)	2-я группа Group 2 (n = 18)	3-я группа Group 3 (n = 7)
$CD14^+CD64^+$, %	17,5 (13,8-22,5)	39 (20,3-55,0)	41 (22-60)
$CD14^+CD64^+$, $10^9/л$ $10^9/l$	0,15 (0,05-0,24) ^{***^A}	0,31 (0,28-0,48)	0,53 (0,28-0,79)
$CD14^+HLA-DR^+$, %	64 (59-69) ^{**}	65 (44,5-77,0) ^{**}	84 (76,5-87,5)
$CD14^+HLA-DR^+$, $10^9/л$ $10^9/l$	0,88 (0,79-0,92)	0,9 (0,67-0,97)	1,45 (1,05-1,56)
$IL-6$, пг/мл pg/ml	4,69 (4,35-10,29)	5,63 (4,88-6,12)	5,1 (4,20-5,94)
$IL-8$, пг/мл pg/ml	30,63 (21,25-41,42) ^{**}	27,07 (25,56-31,33) [*]	15,8 (12,35-18,75)
$IL-4$, пг/мл pg/ml	1,39 (0,73-2,66)	1,74 (1,42-1,79)	0,0 (0,00-1,13)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 5. ПОКАЗАТЕЛИ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С БЛД В ПКВ 38-40 НЕДЕЛЬ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 5. PARAMETERS OF ADAPTIVE IMMUNITY OF PERIPHERAL BLOOD OF PREMATURE INFANTS WITH BPD IN PCA 38-40 WEEKS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	1-я группа Group 1 (n = 17)	2-я группа Group 2 (n = 18)	3-я группа Group 3 (n = 7)
Лейкоциты, $10^9/л$ Leukocytes, $10^9/l$	8,6 (7,70-8,95)	7,11 (5,57-8,54)	6,71 (6,48-7,57)
Лимфоциты, $10^9/л$ Lymphocytes, $10^9/l$	4,19 (3,24-4,74)	4,54 (4,12-5,18)	4,32 (3,95-4,67)
CD3 ⁺ , $10^9/л$ $10^9/l$	1,74 (1,52-2,53)*	2,05 (1,75-2,87)	2,36 (2,32-2,41)
CD19 ⁺ , $10^9/л$ $10^9/l$	1,07 (0,49-1,48)	1,24 (0,60-1,53)	0,68 (0,60-0,91)
CD4 ⁺ , $10^9/л$ $10^9/l$	1,05 (0,84-1,57)**	1,44 (1,13-1,72)	1,71 (1,63-1,76)
CD8 ⁺ , $10^9/л$ $10^9/l$	0,61 (0,43-0,94)	0,67 (0,53-0,78)	0,70 (0,66-0,75)
CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	22,0 (10,5-24,5)**	12,0 (8,5-16,5)	8,5 (7,3-10,0)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ , $10^9/л$ $10^9/l$	0,19 (0,11-0,24)	0,18 (0,15-0,23)	0,19 (0,18-0,21)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1

ТАБЛИЦА 6. МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ МОНОЦИТОВ И УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С БЛД В ПКВ 38-40 НЕДЕЛЬ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 6. MARKERS OF MONOCYTE ACTIVATION AND CYTOKINE LEVEL OF PERIPHERAL BLOOD OF PREMATURE INFANTS WITH BPD IN PCA 38-40 WEEKS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	1-я группа Group 1 (n = 17)	2-я группа Group 2 (n = 18)	3-я группа Group 3 (n = 7)
CD14 ⁺ CD64 ⁺ , %	27 (16,3-42,5)**^^	50 (35,3-65,0)	63,5 (47,5-73,3)
CD14 ⁺ CD64 ⁺ , $10^9/л$ $10^9/l$	0,24 (0,12-0,27)	0,27 (0,12-0,41)	0,23 (0,22-0,45)
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	70,5 (62,5-78,5)	74,0 (64,8-83,0)	80,5 (78,15-82,00)
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , $10^9/л$ $10^9/l$	0,49 (0,39-0,56)	0,46 (0,35-0,60)	0,40 (0,38-0,57)
IL-6, пг/мл pg/ml	3,91 (3,77-4,80)	3,78 (2,46-4,35)	2,75 (2,36-2,97)
IL-8, пг/мл pg/ml	16,72 (10,75-31,18)	13,2 (12,99-25,40)	15,5 (12,80-17,75)
IL-4, пг/мл pg/ml	2,7 (2,10-2,93)	1,82 (1,72-2,10)	20,5 (1,89-2,70)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

лено, что показатели адаптивного звена иммунитета у всех недоношенных детей с БЛД в возрасте 1 месяца жизни были сопоставимы с параметрами детей без БЛД. Снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов и Т-хелперов регистрировалось к ПКВ 38-40 недель при тяжелой степени

БЛД. Выявленная активация лимфоцитов в пуповинной крови (повышение абсолютного количества Т- и В-лимфоцитов, CD4⁺CD25⁺ клеток в этой группе детей, вероятно, обусловлена влиянием неблагоприятных факторов в антенатальном периоде.

В показателях врожденного иммунитета установлен неонатальный дефект функциональной активности моноцитов, проявляющийся в снижении уровня экспрессии рецепторов HLA-DR⁺ и CD64⁺ у детей с тяжелой степенью БЛД ($p_{1-3} = 0,01$, $p_{2-3} = 0,01$). Данный факт, по-видимому, обусловлен повышенным процентом случаев инфекционно-воспалительных заболеваний в данных группах (сепсис — 47,1 против 33,3 и 28,6%, $p_{1-2}, 1-3 > 0,05$; пневмония — 88,2 против 50 и 28,6%, $p_{1-2} = 0,027$, $p_{1-3} = 0,026$;). Необходимо отметить выявленные нами положительные связи между низким количеством активированных HLA-DR-моноцитов в пуповинной крови с развитием сепсиса у недоношенных детей ($r = 0,73$; $p = 0,004$), что согласуется с литературными данными, свидетельствующими о высокой предикторной значимости данного маркера в диагностике этой патологии [19].

При этом сниженный уровень экспрессии HLA-DR-моноцитами периферической крови, выявленный в возрасте 1 месяца жизни, положительно коррелировал с наличием пневмонии ($r = 0,48$; $p = 0,03$) и формированием тяжелой формы БЛД ($r = 0,52$; $p = 0,018$). Аналогичные результаты, демонстрирующие снижение экспрессии HLA-DR на моноцитах, были получены у новорожденных при инфекционной патологии, респираторных нарушениях [3, 14], при обострении БЛД по пневмоническому типу [2].

Существуют данные о формировании БЛД как результата дисбаланса провоспалительных и регуляторных механизмов, выделяющие доминирующую роль провоспалительных цитокинов и подчеркивающие недостаточную активность регуляторных. Как свидетельствуют литературные источники, повышенные концентрации цитокинов обнаруживаются в аспирате трахеи и сыворотке детей с респираторным дистресс-синдромом и впоследствии с БЛД. Эти цитокины могут инициировать или стимулировать воспалительный каскад и тем самым предрасполагать к развитию БЛД [11, 17].

Результаты исследования Rocha G. и соавт. (2012) демонстрируют существование ассоциаций между повышенным уровнем IL-8 и низким содержанием IL-6, IL-10 в пуповинной крови детей с БЛД среднетяжелой и тяжелой степени [18].

Проведенные нами исследования пуповинной крови детей с БЛД показали повышенную продукцию IL-8 при рождении вне зависимости от степени тяжести данного заболевания. Необходимо отметить сохранение статистически значимых различий в повышенной концентрации IL-8 у детей с БЛД тяжелой степени в возрасте 1 месяца жизни, что, по-видимому, является следствием перенесенной при рождении пневмонии,

а также обусловлено наличием воспаления респираторной ткани при развитии заболевания. При проведении корреляционного анализа обнаружены положительные связи между уровнем IL-8 и наличием перенесенной пневмонии в неонатальном периоде ($r = 0,57$; $p = 0,03$), что косвенно подтверждает полученные нами данные.

В отличие от результатов, полученных Rocha G. и соавт. (2012), свидетельствующих о снижении уровня IL-6 в пуповинной крови детей с БЛД тяжелой степени, в проведенном нами исследовании отмечалось его повышение на уровне тенденции. Некоторые авторы связывают высокие уровни IL-6 при рождении с развитием синдрома воспалительной реакции плода и неблагоприятным неонатальным исходом [13], ранними пери/интравентрикулярными кровоизлияниями [15] и сепсисом у недоношенных детей [16]. По нашему мнению, повышение уровня IL-6 в пуповинной крови может явиться следствием перенесенной гипоксии, внутриутробной инфекции [10].

К ПКВ 38-40 недель уровень IL-6 и IL-8 не отличался от аналогичных значений детей без БЛД, что, возможно, является результатом проведенной антибактериальной терапии.

Таким образом, состояние иммунной системы недоношенных детей с БЛД тяжелой степени характеризуется активацией адаптивного (увеличение количества лимфоцитов и CD3⁺, CD19⁺, CD4⁺CD25⁺ субпопуляций) и врожденного (NK-клетки, IL-8) иммунитета при рождении; при прогрессировании заболевания в возрасте 1 месяца жизни — сниженной способностью моноцитов к адгезии и презентации антигенов (CD14⁺CD64⁺, CD14⁺HLA-DR⁺), повышенным уровнем IL-8 при рождении и в возрасте 1 месяца жизни; к ПКВ 38-40 недель — уменьшением количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, снижением экспрессии рецептора CD64⁺ моноцитами, при повышенном количестве натуральных киллеров и лейкоцитов.

У детей с легкой и среднетяжелой степенью БЛД имеет место повышение количества лейкоцитов, CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ клеток, а также уровня IL-8 пуповинной крови.

Установлено, что предикторами БЛД тяжелой степени у детей, рожденных от сверхранних преждевременных родов, является повышенное содержания IL-8 при рождении и в возрасте 1 месяца, сниженный уровень экспрессии на моноцитах рецепторов CD64, HLA-DR по достижении 1 месяца и CD64 в 38-40 недель ПКВ.

Выявленные особенности иммунного статуса у новорожденных с БЛД могут быть использованы для оценки эффективности проводимой терапии, что диктует необходимость проведения дальнейших исследований.

Список литературы / References

1. Батман Ю.А., Натрус Л.В., Павлюченко В.В., Мельник А.В. Изучение патогенетических механизмов формирования иммунологического ответа у недоношенных детей с бронхолегочной дисплазией // Медико-социальные проблемы семьи, 2013. Т. 18, № 2. С. 85-90. [Batman Yu.A., Natrus L.V., Pavlyuchenko V.V., Melnik A.V. Study of the pathogenetic mechanisms of immunological response in preterm infants with bronchopulmonary dysplasia. *Mediko-sotsialnye problemy semyi* = *Medical and Social Problems of the Family*, 2013, Vol. 18, no. 2, pp. 85-90. (In Russ.)]
2. Боровская Т.Ф., Курпас Э.Х., Гусева О.Е., Ефименко М.В., Козлов В.К., Пичуева Е.В., Гандуров С.Г. Особенности иммунного статуса и цитокинового профиля у детей с бронхолегочной дисплазией при различных вариантах обострения // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2005. № 21. С. 69-72. [Borovskaya T.F., Kurpas E.Kh., Guseva O.E., Efimenko M.V., Kozlov V.K., Pichueva E.V., Gandurov S.G. Immune status and cytokine profile peculiarities in children with broncho-pulmonary dysplasia with different degrees of exacerbation. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya* = *Bulletin of Physiology and Pathology of Respiration*, 2005, no. 21, pp. 69-72. (In Russ.)]
3. Дударева М.В., Линде В.А. Патогенетическая роль цитотоксических лимфоцитов у доношенных новорожденных с респираторным дистресс-синдромом // Журнал фундаментальной медицины и биологии, 2013. № 4. С. 22-25. [Dudareva M.V., Linde V.A. Peculiarities of inborn immunity in newborns with respiratory distress and with artificial lung ventilation. *Zhurnal fundamentalnoy meditsiny i biologii* = *Journal of Fundamental Medicine and Biology*, 2013, no. 4, pp. 22-25. (In Russ.)]
4. Каракушикова К.В., Рахимова К.В., Абдуллаева Г.М. Особенности иммунного статуса недоношенных детей с перинатальной патологией в раннем неонатальном периоде // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2012. Т. 91, № 1. С. 20-25. [Karakushikova K.V., Rakhimova K.V., Abdullaeva G.M. Features of the immune status of preterm infants with perinatal pathology in the early neonatal period. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo* = *Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2012, Vol. 91, no. 1, pp. 20-25. (In Russ.)]
5. Лебедева О.В. Факторы риска формирования бронхолегочной дисплазии у новорожденных с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении // Педиатрическая фармакология, 2014. Т. 14, № 3. С. 37-41. [Lebedeva O.V., Cherkasov N.S. Clinical and immunological aspects of severe bronchopulmonary dysplasia in newborns with very low and extremely low birth weight. *Pediatricheskaya farmakologiya* = *Pediatric Pharmacology*, 2014, Vol. 14, no. 3, pp. 37-41. (In Russ.)]
6. Мустафаев И.А., Аллахвердиева Л.И., Богданова А.В. Иммунный статус при бронхолегочной дисплазии // Казанский медицинский журнал, 2016. Т. 97, № 3. С. 346-350. [Mustafaev I.A., Allakhverdiyeva L.I., Bogdanova A.V. Immune status in bronchopulmonary dysplasia. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal* = *Kazan Medical Journal*, 2016, Vol. 97, no. 3, pp. 346-350. (In Russ.)]
7. Овсянников Д.Ю., Комлева Н.А., Оболадзе Т.Б., Маркарян О.В., Кузьменко Л.Г. Современные алгоритмы диагностики бронхолегочной дисплазии // Вопросы диагностики в педиатрии, 2011. Т. 3, № 1. С. 12-20. [Ovsyannikov D.Yu., Komleva N.A., Oboladze T.B., Markaryan O.V., Kuzmenko L.G. Modern algorithms for diagnostics of bronchopulmonary dysplasia. *Voprosy diagnostiki v pediatrii* = *Pediatric Diagnostics*, 2011, Vol. 3, no. 1, pp. 12-20. (In Russ.)]
8. Овсянников Д.Ю. Бронхолегочная дисплазия: естественное развитие, исходы и контроль // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2011. Т. 90, № 1. С. 141-150. [Ovsyannikov D.Yu. Bronchopulmonary dysplasia: natural development, outcomes and control. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo* = *Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2011, Vol. 90, no. 1, pp. 141-150. (In Russ.)]
9. Панченко А.С., Гаймоленко И.Н., Тихоненко А.В., Игнатьева А.В. Бронхолегочная дисплазия у детей: клиника, диагностика, исходы // ЭНИ Забайкальский медицинский вестник, 2013. № 1. С. 175-183. [Panchenko A.S., Gaymolenko I.N., Tikhonenko A.V., Ignatyeva A.V. Bronchopulmonary dysplasia in children: clinical features, diagnosis, outcomes. *ENI Zabaykalskiy meditsinskiy vestnik* = *Transbaikal Medical Journal*, 2013, no. 1, pp. 175-183. (In Russ.)]
10. Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Гагиева И.А., Бычкова С.В., Занина Е.В., Чарипова Б.Т. Про- и противовоспалительные медиаторы у новорожденных с перинатальной патологией // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2014. № 2. С. 66-70. [Chistyakova G.N., Remizova I.I., Gazieva I.A., Bychkova S.V., Zanina E.V., Charipova B.T. Pro- and anti-inflammatory mediators in neonates with perinatal pathology. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii* = *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2014, no. 2, pp. 66-70. (In Russ.)]
11. Ambalavanan N., Carlo W.A., d'Angio C.T., McDonald S.A., Das A., Schendel D., Thorsen P., Higgins R.D. Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Pediatrics*, 2009, Vol. 123, no. 4, pp. 1132-1141.
12. Bhandari A., McGrath-Morrow S. Long-term pulmonary outcomes of patients with bronchopulmonary dysplasia. *Semin. Perinatol.*, 2013, Vol. 37, no. 2, pp. 132-137.
13. Hofer N., Kothari R., Morris N., Müller W., Resch B. The fetal inflammatory response syndrome is a risk factor for morbidity in preterm neonates. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2013, Vol. 209, no. 6, p. 542.

14. Juskewitch J.E., Abraham R.S., League S.C., Jenkins S.M., Smith C.Y., Enders F.T., Grebe S.K., Carey W.A., Huskins W.C. Monocyte HLA-DR expression and neutrophil CD64 expression as biomarkers of infection in critically ill neonates and infants. *Pediatr. Res.*, 2015, Vol. 78, no. 6, pp. 683-690.
15. Khosravi N., Badamchi A., Khalesi N., Tabatabaee A., Naghdalipour M., Asgarian R. Measurement of interleukin-6 (IL-6) and erythropoietin (EPO) in umbilical cords of preterm infants with intraventricular hemorrhage in two hospitals in Tehran. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 2017, Vol. 30, no. 15, pp. 1847-1850.
16. Nakstad B. The diagnostic utility of procalcitonin, interleukin-6 and interleukin-8, and hyaluronic acid in the Norwegian consensus definition for early-onset neonatal sepsis (EONS). *Infect. Drug Resist.*, 2018, no. 11, pp. 359-368.
17. Paananen R., Husa A.K., Vuolteenaho R., Herva R., Kaukola T., Hallman M. Blood cytokines during the perinatal period in very preterm infants: relation-ship of inflammatory response and bronchopulmonary dysplasia. *J. Pediatr.*, 2009, Vol. 154, no. 1, pp. 39-43.
18. Rocha G., Proença E., Guedes A., Carvalho C., Areias A., Ramos J.P., Rodrigues T., Guimarães H. Cord blood levels of IL-6, IL-8 and IL-10 may be early predictors of bronchopulmonary dysplasia in preterm newborns small for gestational age. *Disease Markers*, 2012, Vol. 33, no. 1, pp. 51-60.
19. Zhuang Y., Peng H., Chen Y., Zhou S., Chen Y. Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of sepsis. *Front. Biosci., Landmark*, 2017, Vol. 22, pp. 1344-1354.

Авторы:

Чистякова Г.Н. — д.м.н., профессор, руководитель отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Ремизова И.И. — к.б.н., старший научный сотрудник отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Устьянцева Л.С. — младший научный сотрудник отделения физиологии и патологии новорожденных и детей раннего возраста ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Шамова К.П. — врач анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных, заочный аспирант ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Chistyakova G.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Remizova I.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Ustyantseva L.S., Junior Research Associate, Department of Physiology and Pathology of Newborns and Infants, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Shamova K.P., Anesthesiologist, Intensive Care Department for Newborns, Postgraduate Student, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Бычкова С.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отделения сохранения репродуктивной функции ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Боцьковская М.А. — врач-неонатолог отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных, заочный аспирант ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Газиева И.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник отделения антенатальной охраны труда ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Bychkova S.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Reproductive Function Preservation, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Botskovskaya M.A., Neonatologist, Department of Intensive Care for Newborns, Postgraduate Student, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Gazieva I.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Department of Antenatal Labor Protection, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 10.08.2018

Отправлена на доработку 19.09.2018

Принята к печати 19.09.2018

Received 10.08.2018

Revision received 19.09.2018

Accepted 19.09.2018

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕФЕРЕНСНЫХ ИНТЕРВАЛОВ TREC И KREC ДЛЯ СКРИНИНГА НОВОРОЖДЕННЫХ С ИММУНОДЕФИЦИТНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ В РФ

Гордукова М.А.¹, Корсунский И.А.¹, Чурсинова Ю.В.², Бяхова М.М.²,
Оскорбин И.П.³, Продеус А.П.^{1,4}, Филипенко М.Л.^{3,5}

¹ ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия

² ГБУЗ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

³ ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», г. Новосибирск, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

⁵ ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. В настоящей работе мы использовали популяционную выборку сухих пятен крови новорожденных на картах Гатри размером 2739 индивидуальных образцов для определения референсного интервала значений молекул ДНК TREC и KREC с целью диагностики первичных иммунодефицитных состояний в неонатальном скрининге. Медиана полученных абсолютных значений TREC и KREC составила 195 (CI95%: 185-206) и 185 (CI95%: 176-197) копий на мкл, соответственно, нормированных значений для TREC – 2780 (CI95%: 2690-2840) и для KREC – 2790 (CI95%: 2700-2900) копий на 2×10^5 копий гена альбумина или 10^5 ядросодержащих клеток. Референсный интервал рассчитывался для 99 и 99,9 перцентилей всех величин TREC и KREC. Для фильтрации «выпадающих» значений (outliers) был применен критерий Тьюки после логарифмической трансформации данных, ввиду их несимметричного распределения. При анализе абсолютных значений (TREC/KREC на мкл крови) не было идентифицировано «выпадающих» значений TREC, для KREC из дальнейшего анализа было исключено 18 значений (от 9,8 до 13,5). В нормированных значениях TREC/KREC «выбросов» не выявлено. Полученные референсные значения TREC и KREC (на уровне 0,1 перцентиля) составили 458 и 32 на 10^5 ядросодержащих клеток, 23 и 17 на мкл крови новорожденных соответственно.

Ключевые слова: первичные иммунодефициты (ПИД), Т-лимфоциты, В-лимфоциты, скрининг, TREC, KREC, новорожденные, референсные интервалы, нормы

Адрес для переписки:

Гордукова Мария Александровна
ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9
имени Г.Н. Сперанского ДЗМ»
123317, Россия, Москва, Шмитовский проезд, 29.
Тел.: 8 (499) 256-21-62.
Факс: 8 (499) 256-61-27.
E-mail: ma.gordukova@dgkb-9.ru

Address for correspondence:

Gordukova Maria A.
G. Speransky Children's Hospital No. 9
123317, Russian Federation, Moscow, Shmitovsky lane, 29.
Phone: 7 (499) 256-21-62.
Fax: 7 (499) 256-61-27.
E-mail: ma.gordukova@dgkb-9.ru

Образец цитирования:

М.А. Гордукова, И.А. Корсунский, Ю.В. Чурсинова,
М.М. Бяхова, И.П. Оскорбин, А.П. Продеус,
М.Л. Филипенко «Определение референсных интервалов
TREC и KREC для скрининга новорожденных
с иммунодефицитными состояниями в РФ»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3.
С. 527-538. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-527-538
© Гордукова М.А. и соавт., 2019

For citation:

M.A. Gordukova, I.A. Korsunsky, Yu.V. Chursinova,
M.M. Byakhova, I.P. Oscorbin, A.P. Prodeus, M.L. Filipenko
“Determining reference ranges for TREC and KREC assays
in immune deficiency screening of newborns in Russian
Federation”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 527-538.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-527-538
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-527-538

DETERMINING REFERENCE RANGES FOR TREC AND KREC ASSAYS IN IMMUNE DEFICIENCY SCREENING OF NEWBORNS IN RUSSIAN FEDERATION

Gordukova M.A.^a, Korsunsky I.A.^a, Chursinova Yu.V.^b,
Byakhova M.M.^b, Oscorbin I.P.^c, Prodeus A.P.^{a,d}, Filipenko M.L.^{c,e}

^a G. Speransky Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

^b M. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation

^c Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

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

^e Novosibirsk State University (NSU), Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. In this work, we used a reference population of newborns and sampled dried blood spots on Guthrie cards of 2,739 individual samples to determine the reference intervals for TRECs and KRECs values, in order to diagnose primary immunodeficiency by means of neonatal screening. The median absolute values for TRECs and KRECs were 195 (CI95%: 185–206) and 185 (CI95%: 176–197) copies per μL , respectively; the normalized value for TRECs was 2780 (CI95%: 2690–2840), and for KRECs, 2790 (CI95%: 2700–2900) copies per 2×10^5 copies of the albumin gene or 10^5 cells. The reference interval was calculated for 99 and 99.9 percentiles of total TRECs and KRECs individual values. Due to asymmetric distribution of data, the outliers were filtered off, using the Tukey's criterion applied after logarithmic transformation of the data. When analyzing absolute values for TREC/KREC (per μL of blood), no “drop-down” TRECs values were identified; for KRECs, 18 experimental values were excluded from further analysis (from 9.8 to 13.5). The outlying values were not identified among the normalized values of TRECs/KRECs. The obtained reference values for TRECs and KRECs (at the 0.1 percentile level) were, respectively, 458 and 32 per 10^5 cells, or 23 and 17 per μL of blood samples from neonates.

Keywords: primary immunodeficiency (PID), T cells, B cells, screening, TREC, KREC, newborn, reference intervals

Введение

Референсные интервалы являются важной частью интерпретации результатов лабораторных исследований и представляют собой наиболее широко используемый инструмент принятия медицинских решений [23]. Концепция референсных интервалов впервые описана в 1969 году [21] и сегодня является обязательной для всех разработанных клинико-лабораторных тестов.

Для определения референсных интервалов требуется группа клинически здоровых индивидов с целью установления «нормальных» значений тестируемого анализата [19]. Этот процесс является дорогостоящим, трудоемким и сложным. Международная федерация клинической химии и лабораторной медицины (IFCC) опубликовала рекомендации по созданию и использованию лабораторных референсных интервалов [46]. Минимальная референсная группа должна быть не менее 120 человек, в которой 90 % доверительные границы референсного интервала должны определяться непараметрическими методами [23]. Значительно большие группы (до 700) должны быть исследованы в случае, если распределение значений анализата имеет значи-

тельную асимметрию и не соответствует нормальному [33].

Критерии определения клинически здорового индивидуума не всегда очевидны и могут существенно отличаться в зависимости от заболевания, специфики популяционной группы или тестируемого анализата. Например, Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам в США (NCCLS) рекомендует использование как априорных, так и апостериорных критериев исключения для выборки анализируемых образцов от здоровых субъектов [38]. Априорные критерии могут включать проводимые до основного исследования лабораторные анализы, на основании которых исключаются больные субъекты. Критерии апостериорного исключения применяются после отбора образцов и проведения основного исследования — определения лабораторных измерений. Субъекты, имеющие невыявленные медицинские проблемы, могут быть включены в референсную группу и давать выбросы измеряемых значений тестируемого анализата. На этом этапе стандарт NCCLS позволяет апостериорно исключить их значения, если они выявлены критерием Диксона [18], в особенности если для рас-

четов используются подходы непараметрической статистики.

Классический (априорный) подход к формированию выборки здоровой референсной популяционной группы часто не может быть применен к детям. Для них референсные группы являются труднодоступными, этические соображения ограничивают отбор проб крови у здоровых детей с целью определения референсных интервалов различных аналитов [5]. Определение референсных норм у новорожденных стоит в ряду организационно сложных задач, для которых популяционные подходы с минимальным отбором на стадии формирования выборки и дальнейшим статистическим анализом целевого аналита является методом выбора [40]. Особенно это применимо к определению референсных интервалов аналитов, используемых для диагностики редких заболеваний, для которых попадание «больных» субъектов в референсную группу имеет низкую вероятность. К такой группе заболеваний относятся первичные иммунодефицитные состояния (ПИД), которые представляют собой гетерогенную группу врожденных дефектов иммунной системы. Тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID, ТКИН) — это одна из форм ПИД, которая может привести к смерти ребенка без ранней терапии, а результаты терапии значительно улучшаются, если случаи заболевания диагностируются и младенцы получают лечение в течение первых нескольких месяцев жизни. Эксцизионные кольца Т-клеточного рецептора (TREC) представляют собой небольшие кольцевые молекулы эпизомальной ДНК, которые образуются во время перестройки генов Т-клеточного рецептора (TCR) в наивных Т-клетках и, таким образом, являются суррогатными маркерами для клеток — недавних эмигрантов тимуса. Скрининг на ТКИН с использованием анализа на эксцизионные кольца Т-клеточного рецептора (TREC) был введен во многих странах мира [41]. Также была описана возможность дополнительного исследования с тем же подходом с помощью эксцизионных колец каппа-делеционного элемента (KREC), позволяющая выявлять детей с тяжелыми формами ПИД, проявляющимися Т- и В-клеточной лимфопенией. Количественный анализ KREC был успешно применен для обнаружения пациентов с болезнью Брутона (Х-сцепленная агаммаглобулинемия, XLA) [12], с дефицитом аденозин деаминазы (ADA) [48], синдромом повреждения Неймегена (NBS) [12], с дефицитом пуриноклеозид-фосфорилазы (PNP) [30]. Дуплексный TREC/KREC анализ успешно использовался для скрининга пациентов с ТКИН [47, 50], атаксией телеангиэктазией (АТМ) [12, 27], синдромом

Вискотта—Олдрича (WAS) [11], синдромом делеции 22q11.2 или синдромом Ди Джорджи [16, 20, 32] и трисомией по 21-й хромосоме [54].

Ранее нами была разработана мультиплексная ПЦР в режиме реального времени для количественного анализа молекул ДНК TREC и KREC [1]. В настоящей работе мы использовали популяционную выборку сухих пятен крови новорожденных на картах Гатри с минимальными критериями исключения для определения референсного интервала значений молекул ДНК TREC и KREC с дальнейшей целью диагностики первичных иммунодефицитных состояний в неонатальном скрининге.

Материалы и методы

Сухие пятна крови на картах Гатри были получены из ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (заведующая лабораторией С.Г. Калининкова, директор Д.Ю. Семенов). Карты были собраны в ходе стандартной программы скрининга новорожденных [4]. Сбор пяточной крови от новорожденных детей осуществлялся на специальные фильтровальные бумажные тест-бланки — карты Гатри — на 4-5 день жизни ребенка.

Критерии исключения: недоношенность (срок гестации менее 37 недель), количество копий гена *ALB* (гена сывороточного альбумина, присутствующего в гаплоидном геноме в единичной копии) менее 10^5 на мл цельной крови.

Экстракцию ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва) с удлинением времени инкубации с лизирующим раствором до 45 минут и переносом жидкой фазы в отдельную пробирку с раствором для преципитации для того, чтобы избежать ингибирования ПЦР бумагой. Полученный препарат ДНК растворяли в 50 мкл буфера.

Количество молекул ДНК TREC и KREC определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени и набора реагентов «БиТ-тест» (ООО «АБВ-ТЕСТ», Москва) на приборах CFX96 (Bio-Rad, США) и Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) согласно инструкции производителя. Нормированные значения TREC и KREC рассчитывали на 10^5 ядродержащих клеток (лейкоцитов) с учетом внутреннего контроля *ALB* по формуле: кол-во TREC (KREC) = (кол-во копий TREC (KREC) на мл/кол-во копий *ALB*) * 200000.

Статистическая обработка данных

Анализ нормальности распределения значений молекул ДНК TREC и KREC проводили с помощью теста Д'Агостино—Пирсона [15]. Построение 99 и 99,9% «левосторонних»

(референсное нижнее значение аналита) референсных интервалов выполняли с помощью непараметрического метода определения перцентилей [24] с помощью программного обеспечения MedCalc v. 11.

Результаты

Международная федерация клинической химии и лабораторной медицины (IFCC) рекомендует использовать для оценки референсных значений аналита по меньшей мере 120 субъектов. В нашем исследовании мы использовали значительно большую выборку (2739 индивидуальных образцов пятен крови на картах Гатри), что было обусловлено анализом предварительных данных, показывающих несимметричное распределение значений TREC и KREC.

С помощью количественной ПЦР в режиме реального времени (кПЦР-РВ) нами определено количество молекул ДНК TREC и KREC, а также гена альбумина, маркирующего количество ядро-

содержащих клеток в образце сухого пятна крови. В основном до настоящего времени большая часть исследователей проводила нормировку количества значений TREC и реже KREC (которые просто хуже изучены и пока реже использовались для скрининга ПИД) к 1 мкл крови на карте Гатри.

Мы провели дополнительное уточнение соответствия объема крови площади пятна на картах Гатри (Whatman 903™). В результате анализа площади сухого пятна крови, полученного нанесением 25 мкл свежей периферической крови пациентов возрастом от 1 до 12 месяцев, было выяснено, что 2 мм² соответствуют примерно 1 мкл крови (коэффициент вариации не превышал 10%). Площадь кружка диаметром 3,2 мм равна 7 мм². Таким образом, в одном анализируемом образце, состоящем из трех пятен, в среднем содержится около 10,5 мкл крови. В процессе выделения осадок ДНК растворяли в 50 мкл буфера и использовали 10 мкл для проведения кПЦР-РВ, что соответствует анализу около 2 мкл крови.

ТАБЛИЦА 1. ОПИСАТЕЛЬНАЯ СТАТИСТИКА ЗНАЧЕНИЙ TREC И KREC В ИССЛЕДУЕМОЙ ВЫБОРКЕ ДНК СУХИХ ПЯТЕН И НИЖНИЕ РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ДЛЯ 1 И 0,1 ПЕРЦЕНТИЛЯ

TABLE 1. DESCRIPTIVE STATISTICS OF TREC AND KREC VALUES IN THE STUDIED DRY SPOTS DNA SAMPLES AND LOWER REFERENCE VALUES OF ONE AND 0.1 PERCENTILES.

	TREC (норма) TREC (normalized)	KREC (норма) KREC (normalized)	TREC на 1 мкл TREC per mkl	KREC на 1 мкл KREC per mkl
Наименьшее значение Minimum	389	29	20	17
Наибольшее значение Maximum	25700	37900	2260	3265
Среднее Mean	3103	3485	290	289
Медиана Median	2780	2790	195	185
95% CI для медианы 95% CI for median	2690-2840	2700-2900	185-206	176-197
Коэффициент асимметрии Skewness	2,00 (p < 0,0001)	3,04 (p < 0,0001)	2,00 (p < 0,0001)	2,56 (p < 0,0001)
Тест на нормальное распределение D'Agostino-Pearson test	Нет Not p < 0,0001	Нет Not p < 0,0001	Нет Not p < 0,0001	Нет Not p < 0,0001
Нижняя граница (99% референсный интервал) Low values (99% reference interval)	733	162	26	26
Нижняя граница (99,9% референсный интервал) Low values (99,9% reference interval)	458	32	23	17

На основании этих рассуждений нами были рассчитаны абсолютные значения концентрации ДНК TREC и KREC на 1 мкл крови новорожденных. Медиана полученных значений составила 195 (CI95%: 185–206) и 185 (CI95%: 176–197) копий на мкл, соответственно (табл. 1). Диаграмма рассеивания полученных значений TREC и KREC приведена на рисунке 1, диаграммы распределений – на рисунке 2. Нормированные значения TREC и KREC рассчитывали на 10^5 ядросодержащих клеток (лейкоцитов) с учетом внутреннего контроля *ALB*. Медиана полученных нормированных значений составила для TREC 2780 (CI95%: 2690–2840) и для KREC – 2790 (CI95%: 2700–2900) копий на 2×10^5 копий гена альбумина или 10^5 ядросодержащих клеток (табл. 1).

Определение референсных интервалов молекул TREC и KREC было выполнено на основе анализа ДНК из сухих пятен крови на рутинно собранных картах Гатри от новорожденных, представляющих собой популяционную группу, из которой были удалены образцы, полученные от недоношенных детей (срок гестации менее 37 недель), в соответствии с основным положением ГОСТа Р 53022.3–2008 [2]. Референсный интервал рассчитывался для 99 и 99,9 перцентилей всех величин TREC и KREC. Проверку соответствия распределения полученных значений TREC и KREC с нормальным проводили обобщенным тестом Д’Агостино–Пирсона [15] (табл. 1). Также оценивали наличие асимметрии. Ввиду того, что полученные распределения TREC и KREC отличались от нормального распределения ($p < 0,0001$), применяли непараметрический метод определения 1% и 0,1% перцентилей. Для фильтрации «выпадающих» значений (outliers) был применен критерий Тьюки [52] после логарифмической трансформации данных, ввиду их несимметричного распределения. При анализе абсолютных значений (TREC/KREC на мкл крови) не было идентифицировано «выпадающих» значений TREC, для KREC из дальнейшего анализа было исключено 18 значений (от 9,8 до 13,5). В нормированных значениях TREC/KREC «выбросов» не выявлено. Полученные референсные значения TREC и KREC приведены в таблице 1.

Обсуждение

Для использования разработанного набора реагентов «БиТ» в клинической практике, в частности для неонатального скрининга иммунодефицитных состояний, необходимо определение популяционного распределения нормальных значений TREC и KREC, которое в дальнейшем может быть использовано в качестве клинических пороговых значений нормы и патологии.

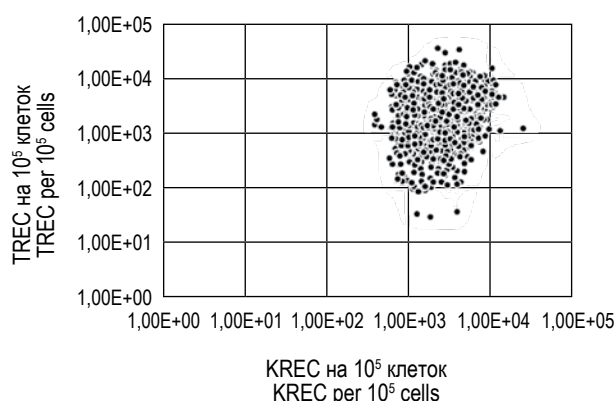
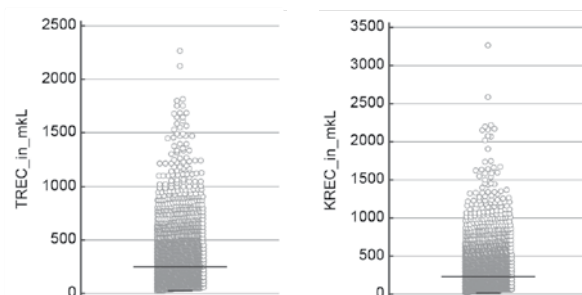


Рисунок 1. Диаграмма рассеивания нормированных значений TREC и KREC

Figure 1. Scatter diagram of the normalized values of TREC and KREC

А (А)



Б (Б)

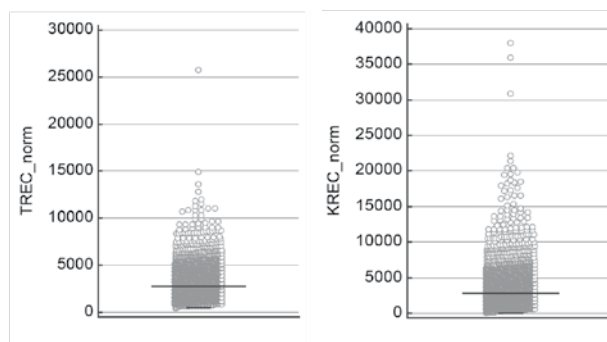


Рисунок 2. А – распределение абсолютных значений количества TREC и KREC на мкл анализируемой крови; Б – распределение нормированных значений количества TREC и KREC

Примечание. Длинная поперечная линия – медиана, короткая – значение 0,1 перцентиля для TREC и KREC на мкл крови (А) и нормированных значений TREC и KREC (Б).

Figure 2. A, distribution of the absolute values of TREC and KREC copies per μ l of blood; B, distribution of normalized TREC and KREC values

Note. The long transverse line is the median, the short line is the 0.1 percentile value for TREC and KREC per μ l of blood (A) and for the normalized values for TREC and KREC (B).

Для решения этой задачи были использованы карты Гатри (собранные в 2017-2018 годах и поступившие в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского для проведения рутинного неонатального скрининга) для выделения ДНК и оценки нормированного на количество анализируемых ядерных клеток уровня TREC и KREC. В настоящее время для определения референсного интервала рекомендуется так называемый «прямой» подход, где субъекты отбираются из исследуемой популяции именно с этой целью и фильтруются по отсутствию целевых заболеваний [25]. В данном исследовании использован «непрямой» метод, где для определения референсных интервалов используют клинические образцы, уже собранные для скрининга, диагностики или мониторинга.

Частота ПИД варьирует от региона к региону и часто связана с наличием регистров данных заболеваний. Так, согласно Регистру Великобритании, частота ПИД составляет 6-7 случаев на 100 тыс. живых новорожденных [45], 2-4 случая/100 тыс. новорожденных согласно национальному регистру Швейцарии [36], 6,87 на 100 тыс. во Франции [35] и в целом 6 на 100 тыс. населения по европейскому региону [34]. В национальной программе скрининга на ТКИН в США к 2010 частота ТКИН составила 1 на 58 000 новорожденных [28]. Болезнь Брутона встречается с частотой 1 на 200 000 новорожденных [51]. Наиболее часто встречаемый врожденный синдром, также влияющий на количество наивных Т- и, возможно, В-клеток, синдром Ди Джоржи имеет распространенность 1:4000 [22].

Таким образом, так как встречаемость первичных иммунодефицитных состояний, при которых может наблюдаться патологически сниженный уровень TREC и KREC, в популяции не превышает 1:1000, использование неотобранной популяционной выборки пациентов оправдано (то есть без дополнительной диагностики именно здоровых детей). Этот факт также может служить основанием для вычисления референсного «левого» (нижнего) интервала на уровне 0,1 перцентиля, который был применен в нашей работе.

Большинство опубликованных к настоящему времени исследований определяют уровень TREC и KREC на мкл крови новорожденного (3 мкл крови в панче (диске) диаметром 3,2 мм или 1 мкл в панче диаметром 1,5 мм). Сравнение полученных нами абсолютных значений TREC и KREC на мкл крови, а также их нижних пограничных значений со значениями, полученными в ранее проведенных исследованиях, приведено на рисунках 3, 4, 5 и 6 (соответственно).

Полученные нами медианные значения TREC (195 копий на мкл цельной крови) наиболее близки к таковым, полученным с использованием моноплексных “in-house” тест-систем [13, 14, 26, 29, 31, 41, 44, 47]. Между тем значения TREC в исследованиях проведенных с использованием коммерческого набора Enlite™ Neonatal TREC kit (PerkinElmer, Turku, Finland), отличаются несколько меньшими значениями (96-112 копий на мкл) [6, 7, 8, 10, 42, 43].

Обращают на себя внимание низкие значения как TREC, так и KREC, полученные в работах [9, 17], выполненных с использованием коли-

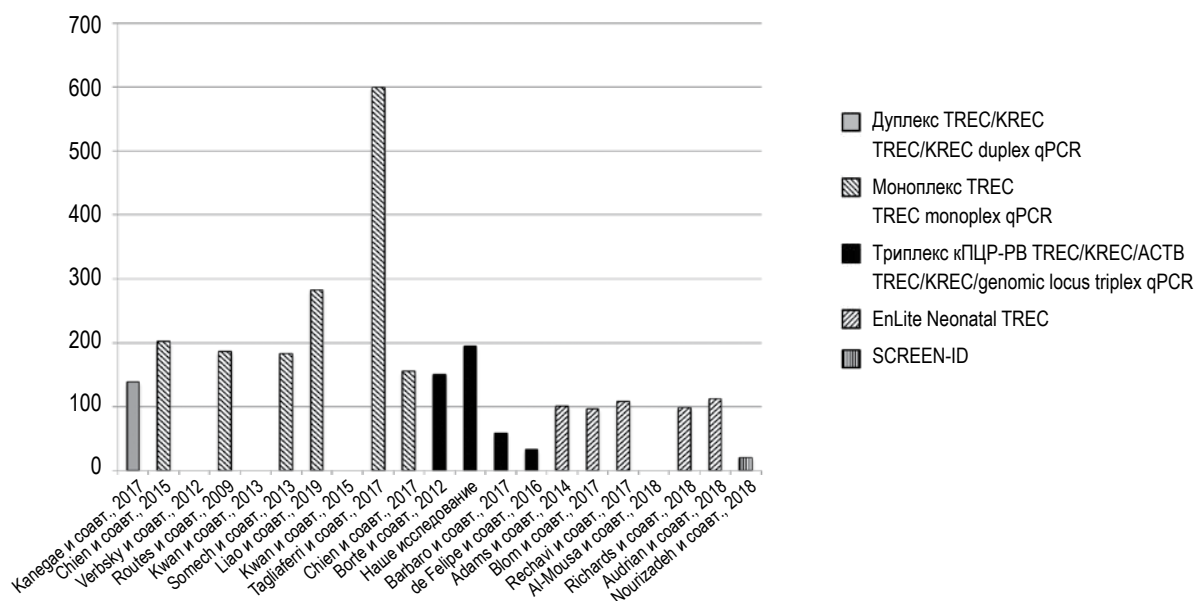


Рисунок 3. Медианы значений TREC на 1 мкл крови новорожденных

Figure 3. Median of TREC copies per 1 µl of neonatal blood

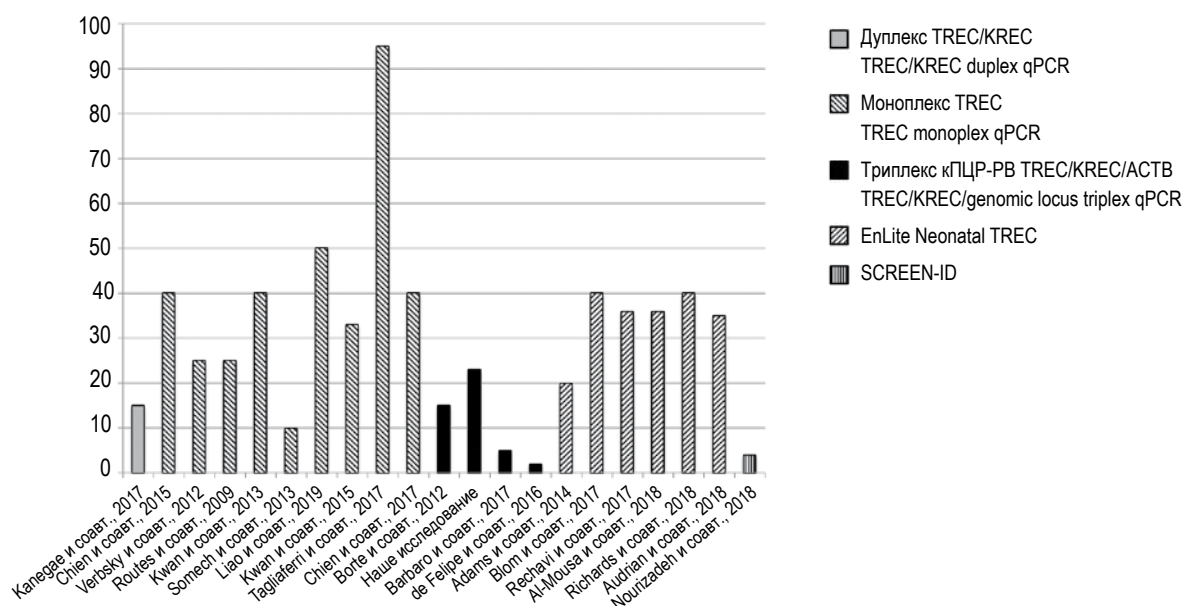


Рисунок 4. Выбранные пограничные нижние значения TREC на 1 мкл крови новорожденных

Figure 4. Cut-offs of TREC copies per 1 µl of neonatal blood

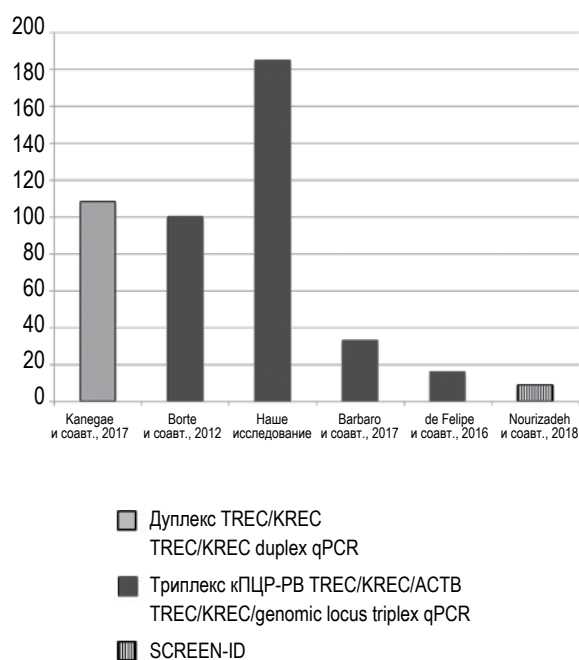


Рисунок 5. Медианы значений KREC на 1 мкл крови новорожденных

Figure 5. Median of KREC copies per 1 µl of neonatal blood

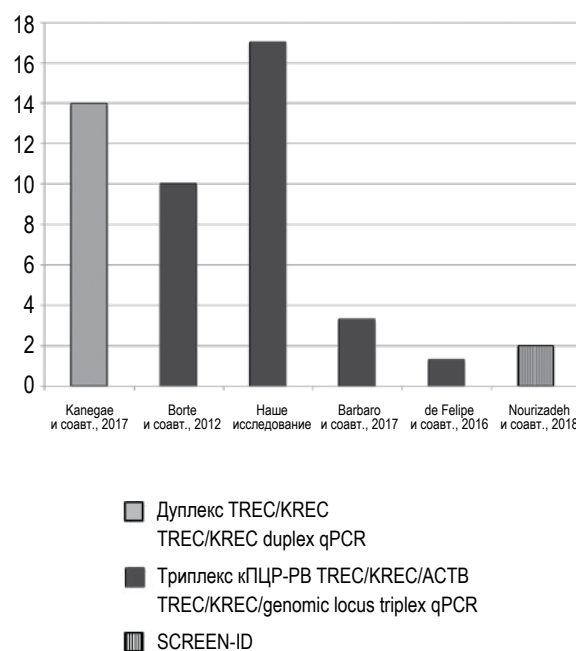


Рисунок 6. Выбранные пограничные нижние значения KREC на 1 мкл крови новорожденных

Figure 6. Cut-offs of KREC copies per 1 µl of neonatal blood

чественной триплексной ПЦР, описанной Borte и соавт. [12], а также Nourizadeh и соавт. [39], в которой также был использована триплексная ПЦР The SPOT-it™ kit, предложенная теми же автора-

ми (ImmunoID, Sweden, Stockholm). Возможное объяснение может быть связано с недостаточной эффективностью элюции ДНК из пятен крови с помощью гомогенного метода выделения без

использования сильных детергентов и хаотропных агентов. Например, в работе Nourizadeh и соавт. [39] медиана значений копий гена актина, используемого в качестве эндогенного контроля, составила 2201. В то же время один панч с диаметром 3,2 мм с 3 мкл крови должен содержать 30-60 тысяч геном-эквивалентов, в связи с тем, что в 1 мкл крови здоровых новорожденных содержится 8-15,4 тыс. лейкоцитов [37]. Кроме того, в определенной степени вариабельность значений TREC и KREC при различных подходах разных авторов может быть связана с недостаточно точно определенной концентрацией калибраторов, так как в большинстве публикаций отсутствует указание на метод проверки их концентрации. В работе Somech и соавт. [47] концентрацию KREC рассчитывали по калибраторам для TREC, что не могло не повлиять на точность полученных значений.

Несмотря на то, что практически все авторы используют амплификацию однокопийного геномного локуса (например, гены альбумина, РНКазы Р или бета-актина) для контроля экстракции ДНК, среди этих исследований нет таких, в которых проводится количественная оценка этих генов для оценки эффективности (количества) выделения ДНК из карт Гатри для последующей корректировки значений TREC и KREC. В большинстве протоколов для количественного анализа TREC и KREC амплификация эндогенных контрольных локусов интерпретируется полуквантитативно: установлены лишь граничные значения по копийности или Ct, которые позволяют сделать вывод о валидности образца. Кроме того, в подавляющем числе исследований [например, 29, 44, 53] амплификацию локуса внутреннего контроля проводили отдельно в мультимплексном варианте и только в том случае, если полученное значение TREC оказывалось меньше граничного. При этом очевидно, что эффективность выделения ДНК из пятен крови может варьировать, что будет сказываться на абсолютных значениях TREC и KREC, рассчитанных на мкл крови на панч.

С целью коррекции возможных различий в количестве элюированной с карт Гатри ДНК нами была введена нормировка значений TREC и KREC на количество копий гена альбумина в образце (см. Материалы и методы). Полученные нормированные значения (см. табл. 1) демонстрируют лучшую стабильность, что может сокращать количество ретестов (данные не приведены).

Среди российских исследований на картах Гатри ранее была проведена работа Дерябиной и соавт., в которой были проанализированы образцы сухих пятен крови 26 девочек и 26 маль-

чиков, родившихся доношенными и не имевших тяжелых заболеваний, где была предпринята попытка расчета «нормальных» значений TREC и KREC с использованием RUO версии набора «БиТ-тест». Однако, в силу небольшого размера исследованной выборки, истинно референсные значения авторами не вычислялись [3].

Для расчета пограничных значений исследуемого анализата также может быть применен альтернативный подход, а именно исследование двух выборок: условно здоровых и пациентов с подтвержденным диагнозом. С помощью ROC-анализа, изменяя пограничное значение анализата (в данном случае это пограничное нижнее значение TREC или KREC), может быть рассчитано максимально возможное значение AUC (площадь под кривой), определяющее оптимальную чувствительность и специфичность анализа, и выбран оптимальный референсный порог. Данный подход доминирует в опубликованных исследованиях при расчете пограничных TREC для диагностики ТКИН. Тем временем определенные таким методом нормы не позволяют выявлять мягкие формы ПИД, а также ряд синдромов, при которых нарушается нормальная функция и количество наивных Т- или В-клеток, например синдром Ди Джоржи. Так, Катае и соавт. сообщали о возможности классификации пациентов с ОВИН (общая вариабельная иммунная недостаточность) с помощью мультимплексного определения уровня KREC/TREC [25]. Им удалось разделить 40 пациентов на 4 группы (A = TREC⁺/KREC⁺, B = TREC⁺/KREC⁻, C = TREC⁻/KREC⁺, D = TREC⁻/KREC⁻) и выявить ассоциацию между тяжестью течения заболевания и уровнем KREC/TREC. Для проведения такого рода исследований референсные нижние значения при анализе KREC и TREC должны быть заданы именно нижней границей популяционных значений условно здоровых детей, а не значениями для ТКИН и агаммаглобулинемии.

Проведенное нами исследование имеет ряд очевидных ограничений. Далеко не во всех случаях нами была проведена повторная экстракция ДНК для оценки причин низких абсолютных значений (на мкл крови) KREC или TREC, в основе которых может лежать неэффективная экстракция ДНК из сухих пятен крови. Вопрос влияния метода экстракции ДНК вообще недостаточно изучен в приложении к таким малым кольцевым молекулам, как TREC или KREC, по сравнению с тотальной геномной ДНК.

Также наше исследование несколько проигрывает ввиду отсутствия панели Гатри карт с образцами крови от детей с подтвержденным в дальнейшем клиническим диагнозом ПИД

или рассматриваемых врожденных синдромов, при которых может уменьшаться количество TREC, KREC или TREC/KREC. Для полноты оценки адекватности полученных нами граничных значений KREC или TREC это является важным этапом, который должен быть пройден в ближайших работах, направленных на внедрение разработанного набора реагентов в систему неонатального скрининга ПИД в РФ.

В настоящий момент более 90% новорожденных в США проходят скрининг на ТКИН. Полученные результаты свидетельствуют, что анализ количества ДНК молекул TREC имеет чувствительность, близкую к 100%, для диагностики ТКИН и ее более мягких форм, например проявляющихся синдромом Оменна. При раннем выявлении эти дети имеют благоприятный прогноз после своевременной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток до манифестации

инфекционных заболеваний. Таким образом, полученные в настоящей работе данные способствуют развитию эффективного скрининга иммунодефицитных состояний в РФ и улучшению качества жизни пациентов с этим серьезным диагнозом.

Благодарности

Авторы публикации выражают благодарность медицинскому лабораторному технику Евгении Александровне Шершавиной за самоотверженность, проявленную на стадии экстракции большого количества образцов ДНК из карт Гатри.

Финансовая поддержка: Филипенко М.Л. и Оскорбин И.П. участвовали в представленной работе в рамках базового финансирования ИХБФМ СО РАН по Проекту базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210025-5.

Список литературы / References

1. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филипенко М.Л., Протеус А.П. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 467-478. [Gordukova M.A., Oskorbin I.P., Mishukova O.V., Zimin S.B., Zinovieva N.V., Davydova N.V., Smirnova A.S., Nikitina I.A., Korsunsky I.A., Filipenko M.L., Prodeus A.P. Development of real-time multiplex PCR for the quantitative determination of TREC's and KREC's in whole blood and in dried blood spots. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 467-478. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2015-5-467-478.
2. ГОСТ Р 53022.3 – 2008 Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. [GOST R 53022.3 – 2008 National Standard of Russian Federation. Clinical laboratory technologies. Requirements to the quality of clinical laboratory studies. Part 3. Rules for evaluating the clinical informativity of laboratory tests.
3. Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Шершнев В.Н. Определение нормативных значений TREC и KREC в сухих пятнах крови новорожденных разного срока гестации в Свердловской области // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 85-98. [Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Shershnev V.N. Determination of reference values for TREC and KREC in dry blood spots of newborns from different gestation ages in Sverdlovsk Region. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 85-98. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-85-98.
4. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 22.03.2006 N 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания» [The Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation Order No. 185 issued 22 March 2006 on "Total screening of newborns for hereditary diseases".
5. Abdelhaleem M., Adeli K., Bamforth F., Callahan J., Chan A., Cheung Chan P., Delvin E., Dooley K., Fu L., Grey V., Kahr W., Lepage N., Lyon M., Meng Q., Potter M., Verjee Z. An editorial on behalf of the CALIPER investigators. Pediatric reference intervals: critical gap analysis and establishment of a national initiative. *Clinical Biochemistry*, 2006, Vol. 39, pp. 559-560.
6. Adams S.P., Rashid S., Premachandra T., Harvey K., Ifederu A., Wilson M.C., Gaspar H.B. Screening of neonatal UK dried blood spots using a duplex TREC screening assay. *J. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 34, pp. 323-330.
7. Al-Mousa H., Al-Dakheel G., Jabr A., Elbadaoui F., Abouelhoda M., Baig M., Monies D., Meyer B., Hawwari A., Dasouki M. High incidence of severe combined immunodeficiency disease in Saudi Arabia detected through combined T cell receptor excision circle and next generation sequencing of newborn dried blood spots. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 782. doi: 10.3389/fimmu.2018.00782.
8. Audrain M.A.P., Léger A.J.C., Hémond C.A.F., Mirallié S.M., Cheillan D., Rimbart M.G.M., Le Thuaut A.M., Sébille-Rivain V.A., Prat A., Pinel E.M.Q., Divry E., Dert C.G.L., Fournier M.A.G., Thomas C.J.C. Newborn Screening for severe combined immunodeficiency: Analytic and clinical performance of the T cell receptor excision circle assay in France (DEPISTREC Study). *J. Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 38, no. 7, pp. 778-786.

9. Barbaro M., Ohlsson A., Borte S., Jonsson S., Zetterström R.H., King J., Winiarski J., von Döbeln U., Hammarström L. Newborn screening for severe primary immunodeficiency diseases in Sweden – a 2-year pilot TREC and KREC screening study. *J. Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 1, pp. 51-60.
10. Blom M., Pico-Knijnenburg I., Sijne-van Veen M., Boelen A., Bredius R.G.M., van der Burg M., Schielen P.C.J.I. An evaluation of the TREC assay with regard to the integration of SCID screening into the Dutch newborn screening program. *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 180, pp. 106-110.
11. Borte S., Meeths M., Liebscher I., Krist K., Nordenskjöld M., Hammarström L., von Döbeln U., Henter J.I., Bryceson Y.T. Combined newborn screening for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and severe T- and B-cell immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 1, pp. 226-228.
12. Borte S., von Döbeln U., Fasth A., Wang N., Janzi M., Winiarski J., Sack U., Pan-Hammarström Q., Borte M., Hammarström L. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood*, 2012, Vol. 119, pp. 2552-2555.
13. Chien Y.H., Chiang S.C., Chang K.L., Yu H.H., Lee W.I., Tsai L.P., Hsu L.W., Hu M.H., Hwu W.L. Incidence of severe combined immunodeficiency through newborn screening in a Chinese population. *J. Formos. Med. Assoc.*, 2015, Vol. 114, pp. 12-16.
14. Chien Y.H., Yu H.H., Lee N.C., Ho H.C., Kao S.M., Lu M.Y., Jaing T.H., Lee W.I., Chang K.W., Shieh C.C., Chen J.S., Chiang S.C., Liu C.C., Hwu W.L. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in Taiwan. *Int. J. Neonatal Screen.*, 2017, Vol. 3, no. 16, 12 p.
15. D'Agostino R.B., Belanger A., d'Agostino R.B. Jr. A suggestion for using powerful and informative tests of normality. *Am. Statistician*, 1990, Vol. 44, no. 4, pp. 316-321.
16. Dar N., Gothelf D., Korn D., Frisch A., Weizman A., Michaelovsky E., Carmel M., Yeshayahu Y., Dubnov-Raz G., Pessach I.M., Simon A.J., Lev A., Somech R. Thymic and bone marrow output in individuals with 22q11.2 deletion syndrome. *Pediatr Res.*, 2015, Vol. 77, no. 4, pp. 579-585.
17. de Felipe B., Olbrich P., Lucenas J.M., Delgado-Pecellin C., Pavon-Delgado A., Marquez J., Salamanca C., Soler-Palacin P., Gonzalez-Granado L.I., Antolin L.F., Borte S., Neth O. Prospective neonatal screening for severe T- and B-lymphocyte deficiencies in Seville. *Pediatr Allergy Immunol.*, 2016, Vol. 27, no. 1, pp. 70-77.
18. Dixon W.J. Processing data for outliers. *Biometrics*, 1953, Vol. 9, no. 1, pp. 74-89.
19. Ezzelle J., Rodriguez-Chavez I.R., Darden J.M., Stirewalt M., Kunwar N., Hitchcock R., Walter T., D'Souza M.P. Guidelines on good clinical laboratory practice: bridging operations between research and clinical research laboratories. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, Vol. 46, no. 1, pp. 18-29.
20. Froňková E., Klocperk A., Svatoň M., Nováková M., Kotrová M., Kayserová J., Kalina T., Keslová P., Votava F., Vinohradská H., Freiburger T., Mejstříková E., Trka J., Sedivá A. The TREC/KREC assay for the diagnosis and monitoring of patients with DiGeorge syndrome. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 12, e114514. doi: 10.1371/journal.pone.0114514.
21. Grasbeck R., Saris N.E. Establishment and use of normal values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1969, Vol. 26, pp. 62-63.
22. Gul K.A., Øverland T., Osnes L., Baumbusch L.O., Pettersen R.D., Lima K., Abrahamsen T.G. Neonatal levels of T-cell receptor excision circles (TREC) in patients with 22q11.2 deletion syndrome and later disease features. *J. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 35, pp. 408-415.
23. Horn P.S., Pesce A.J. Reference intervals: an update. *Clinica Chimica Acta*, 2003, Vol. 334, iss. 1-2, pp. 5-23.
24. Horowitz G.L., Altaie S., Boyd J.C., Ceriotti F., Garg U., Horn P., Pesce A., Harrison E. Sine H.E., Zakowski J. National Committee for Clinical Laboratory Standards EP28-A3c defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline. Third Edition. Vol. 28, no. 30.
25. Kamae C., Nakagawa N., Sato H., Honma K., Mitsui N., Ohara O. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 131, pp. 1437-1440.e5.
26. Kanegae M.P.P., Barreiros L.A., Sousa J.L., Brito M.A.S., Oliveira E.B. Jr., Soares L.P., Mazzucchelli J.T.L., Fernandes D.Q., Hadachi S.M., Holanda S.M., Guimarães F.A.T.M., Boacnin M.A.P.V.V., Pereira M.A.L., Bueno J.M.C., Grumach A.S., Gesu R.S.W.D., Santos A.M.N.D., Bellesi N., Costa-Carvalho B.T., Condino-Neto A. Screening for severe combined immunodeficiencies using trecs and krecks: second pilot study in brazil. *Rev. Paul Pediatr.*, 2017, Vol. 35, no. 1, pp. 25-32.
27. Kraus M., Lev A., Simon A.J., Levran I., Nissenkorn A., Levi Y.B., Berkun Y., Efrati O., Amariglio N., Rechavi G., Somech R. Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia telangiectasia. *J. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 34, no. 5, pp. 561-572.
28. Kwan A., Abraham R.S., Currier R., Brower A., Andruszewski K., Abbott J.K., Baker M., Ballow M., Bartoshesky L.E., Bonilla F.A., Brokopp C., Brooks E., Caggana M., Celestin J., Church J.A., Comeau A.M., Connelly J.A., Cowan M.J., Cunningham-Rundles C., Dasu T., Dave N., de la Morena M.T., Duffner U., Fong C.T., Forbes L., Freedenberg D., Gelfand E.W., Hale J.E., Hanson I.C., Hay B.N., Hu D., Infante A., Johnson D., Kapoor N., Kay D.M., Kohn D.B., Lee R., Lehman H., Lin Z., Lorey F., Abdel-Mageed A., Manning A., McGhee S., Moore T.B., Naides S.J., Notarangelo L.D., Orange J.S., Pai S.Y., Porteus M., Rodriguez R., Romberg N., Routes J., Ruehle M., Rubenstein A., Saavedra-Matiz C.A., Scott G., Scott P.M., Secord E., Serogy C., Shearer W.T., Siegel S., Silvers S.K., Stiehm E.R., Sugerman R.W., Sullivan J.L., Tanksley S., Tierce M.L. 4th, Verbsky J., Vogel B., Walker R., Walkovich K., Walter J.E., Wasserman R.L., Watson M.S., Weinberg G.A., Weiner L.B., Wood H., Yates A.B., Puck J.M., Bonagura V.R.

Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA*, 2014, Vol. 312, no. 7, pp.729-738.

29. Kwan A., Church J.A., Cowan M.J., Agarwal R., Kapoor N., Kohn D.B., Lewis D.B., McGhee S.A., Moore T.B., Stiehm E.R., Porteus M., Aznar C.P., Currier R., Lorey F., Puck J.M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia in California: results of the first 2 years. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, pp. 140-150.

30. Ia Marca G., Canessa C., Giocaliere E., Romano F., Malvagias S., Funghini S., Moriondo M., Valleriani C., Lippi F., Ombrone D., Della Bona M.L., Speckmann C., Borte S., Brodzski N., Gennery A.R., Weinacht K., Celmeli F., Pagel J., de Martino M., Guerrini R., Wittkowski H., Santisteban I., Bali P., Ikinciogullari A., Herschfield M., Notarangelo L.D., Resti M., Azzari C. Diagnosis of immunodeficiency caused by a purine nucleoside phosphorylase defect by using tandem mass spectrometry on dried blood spots. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 1, pp. 155-159.

31. Liao H.C., Liao C.H., Kao S.M., Chiang C.C., Chen Y.J. Detecting 22q11.2 deletion syndrome in newborns with low T Cell receptor excision circles from severe combined immunodeficiency screening. *J. Pediatr.*, 2019, Vol. 204, pp. 219-224.e1.

32. Lingman Framme J., Borte S., von Döbeln U., Hammarström L., Oskarsdóttir S. Retrospective analysis of TREC based newborn screening results and clinical phenotypes in infants with the 22q11 deletion syndrome. *J. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 34, no. 4, pp. 514-519.

33. Linnet K. Two-stage transformations for normalization of reference distributions evaluated. *Clin. Chem.*, 1987, Vol. 33, pp. 381-386.

34. Mahlaoui N., Gathmann B., Kindle G., Ehl S., on behalf of the ESID Registry Working Party Steering Committee (Quinti I., Grimbacher B., Buckland M., Seidel M., van Montfrans J., and the ESID Society. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry: recent advancements in the epidemiology of Primary Immunodeficiencies and how does that translate in clinical care. *Rare Dis. Orph. Drugs*, 2014, Vol. 1, no. 4, Suppl. 4.

35. Mahlaoui N., Jais J.P., Brosselin P., Mignot C., Beaurain B., Brito C., Costes L., Courteille V., de Vergnes N., Alcaïs A., Fischer A.; CEREDIH Prevalence Study Collaborators. Prevalence of primary immunodeficiencies in France is underestimated. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 140, no. 6, pp. 1731-1733.

36. Marschall K., Hoernes M., Bitzenhofer-Grüber M., Jandus P., Duppenhaler A., Willemin W.A., Rischewski J., Boyman O., Heininger U., Hauser T., Steiner U., Posfay-Barbe K., Seebach J., Recher M., Hess C., Helbling A., Reichenbach J.; Swiss PID Registry Working Group. The Swiss National Registry for Primary Immunodeficiencies: report on the first 6 years' activity from 2008 to 2014. *Clin. Exp. Immunol.*, 2015, Vol. 182, no. 1, pp. 45-50.

37. Mayo Foundation for Medical Education and Research, Test ID: CBC. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/9109>.

38. National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline. Second Edition. NCCLS document C28-A2, 2000, Vol. 20, no. 13.

39. Nourizadeh M., Shakerian L., Borte S., Fazlollahi M., Badalzadeh M., Houshmand M., Alizadeh Z., Dalili H., Rashidi-Nezhad A., Kazemnejad A., Moin M., Hammarström L., Pourpak Z. Newborn screening using TREC/KREC assay for severe T and B cell lymphopenia in Iran. *Scand. J. Immunol.*, 2018, Vol. 6, e12699. doi: 10.1111/sji.12699.

40. Poole S., Schroeder L.F., Shah N. An unsupervised learning method to identify reference intervals from a clinical database. *J. Biomed. Inform.*, 2016, Vol. 59, pp. 276-284.

41. Puck J.M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia. *Immunol. Rev.*, 2019, Vol. 287, no. 1, pp. 241-252.

42. Rechavi E., Lev A., Simon A.J., Stauber T., Daas S., Saraf-Levy T., Broides A., Nahum A., Marcus N., Hanna S., Stepensky P., Toker O., Dalal I., Etzioni A., Almashanu S., Somech R. First year of Israeli newborn screening for severe combined immunodeficiency – clinical achievements and insights. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 6, no. 8, 1448. doi: 10.3389/fimmu.2017.01448.

43. Richards S., Pitt J., Choo S. Newborn screening for severe combined immunodeficiency: Evaluation of a commercial T-cell receptor excision circle-based method in Victorian dried blood spots. *J. Paediatr. Child Health.*, 2018, Vol. 54, no. 1, pp. 14-19.

44. Routes J.M., Grossman W.J., Verbsky J., Laessig R.H., Hoffman G.L., Brokopp C.D., Baker M.W. Statewide newborn screening for severe T-cell lymphopenia. *JAMA*, 2009, Vol. 302, no. 22, pp. 2465-2470.

45. Shillito B., Bangs C., Guzman D., Gennery A.R., Longhurst H.J., Slatter M., Edgar D.M., Thomas M., Worth A., Huissoon A., Arkwright P.D., Jolles S., Bourne H., Alachkar H., Savic S., Kumararatne D.S., Patel S., Baxendale H., Noorani S., Yong P.F.K., Waruiru C., Pavaladurai V., Kelleher P., Herriot R., Bernatonienne J., Bhole M., Steele C., Hayman G., Richter A., Gompels M., Chopra C., Garcez T., Buckland M. The United Kingdom Primary Immune Deficiency (UKPID) registry 2012 to 2017. *Clin. Exp. Immunol.*, 2018, Vol. 192, no. 3, pp. 284-291.

46. Solberg H.E.. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, Vol. 42, no. 7, pp. 710-714.

47. Somech R., Lev A., Simon A.J., Korn D., Garty B.Z., Amariglio N., Rechavi G., Almashanu S., Zlotogora J., Etzioni A. Newborn screening for severe T and B cell immunodeficiency in Israel: a pilot study. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2013, Vol. 15, pp. 404-409.

48. Speckmann C., Neumann C., Borte S., la Marca G., Sass J.O., Wiech E., Fisch P., Schwarz K., Buchholz B., Schlesier M., Felgentreff K., Grimbacher B., Santisteban I., Bali P., Hershfield M.S., Ehl S. Delayed-onset adenosine deaminase deficiency: strategies for an early diagnosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 130, no. 4, pp. 991-994.
49. Tagliaferri L., Kunz J.B., Happich M., Esposito S., Bruckner T., Hübschmann D., Okun J.G., Hoffmann G.F., Schulz A., Kappe J., Speckmann C., Muckenthaler M.U., Kulozik A.E. Newborn screening for severe combined immunodeficiency using a novel and simplified method to measure T-cell excision circles (TREC). *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 175, pp. 51-55.
50. Tamura S., Higuchi K., Tamaki M., Inoue C., Awazawa R., Mitsuki N., Nakazawa Y., Mishima H., Takahashi K., Kondo O., Imai K., Morio T., Ohara O., Ogi T., Furukawa F., Inoue M., Yoshiura K., Kanazawa N. Novel compound heterozygous DNA ligase IV mutations in an adolescent with a slowly-progressing radiosensitive-severe combined immunodeficiency. *Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 160, no. 2, pp. 255-260.
51. Taneja A., Chhabra A. Bruton Agammaglobulinemia. StatPearls [Internet], 2018. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448170/>.
52. Tukey J.W. Exploratory Data Analysis. Addison Wesley, 1977.
53. Verbsky J.W., Baker M.W., Grossman W.J., Hintermeyer M., Dasu T., Bonacci B., Reddy S., Margolis D., Casper J., Gries M., Desantes K., Hoffman G.L., Brokopp C.D., Seroogy C.M., Routes J.M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency; the Wisconsin experience (2008-2011). *J. Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 32, pp. 82-88.
54. Verstegen R.H., Borte S., Bok L.A., van Zwieten P.H., von Döbeln U., Hammarström L., de Vries E. Impact of Down syndrome on the performance of neonatal screening assays for severe primary immunodeficiency diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 133, no. 4, pp. 1208-1211.

Авторы:

Гордукова М.А. — биолог клинической диагностической лаборатории ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия

Корсунский И.А. — к.м.н., заведующий Московским городским центром детской иммунологии и аллергологии ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия

Чурсинова Ю.В. — заведующая отделением организации и сопровождения клинических исследований, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики факультета усовершенствования врачей ГБУЗ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Бяхова М.М. — к.м.н., старший научный сотрудник патологоанатомического отделения ГБУЗ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Осборбин И.П. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», г. Новосибирск, Россия

Продеус А.П. — д.м.н., профессор, заместитель главного врача по инфекционным болезням ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва; профессор-консультант ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Филипенко М.Л. — к.б.н., заведующий лабораторией фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН»; заведующий лабораторией молекулярной диагностики ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Gordukova M.A., Clinical Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory, G. Speransky Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

Korsunsky I.A., PhD (Medicine), Head, Moscow City Center for Pediatric Immunology and Allergy, G. Speransky Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

Chursinova Yu.V., Head, Department of Arrangement and Management of Clinical Studies, Assistant Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Faculty of Postgraduate Education, M. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation

Byakhova M.M., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Pathology Department, M. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation

Oscorbin I.P., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Pharmacogenomics, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Prodeus A.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Medical Director for Infectious Diseases, G. Speransky Children's Hospital No. 9, Moscow; Consulting Professor, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Filipenko M.L., PhD (Biology), Head, Laboratory of Pharmacogenomics Laboratory, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Laboratory of Molecular Diagnostics, Novosibirsk State University (NSU), Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 01.02.2019

Отправлена на доработку 05.03.2019

Принята к печати 15.03.2019

Received 01.02.2019

Revision received 05.03.2019

Accepted 15.03.2019

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИБИОТИКОВ АНТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ В МОДЕЛЬНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HeLa

Кутилин Д.С., Могушкова Х.А.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения
РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Раково-тестикулярные антигены (РТА) могут использоваться в качестве мишени при иммунотерапии злокачественных опухолей различных локализаций, в том числе рака шейки матки. Однако иммунотерапия часто применяется в комплексе с химиотерапией антрациклиновыми антибиотиками, в частности доксорубицином (DXR), эффекты которого на экспрессию генов РТА не изучены. Поэтому целью исследования стало изучение влияния разных концентраций доксорубицина и времени экспозиции на транскрипционный профиль 16 раково-тестикулярных (РТ) генов клеток HeLa CCL-2. В работе использовали культуру клеток человека – рак шейки матки линии HeLa CCL-2. Культивирование клеток HeLa CCL-2 проводилось в стерильных культуральных флаконах с адгезионной поверхностью и вентилируемыми крышками в условиях 5% CO₂ и 95% влажности при 37 °С в среде RPMI-1640 с 10% фетальной телячьей сывороткой при концентрации гентамицина 50 мкг/мл и различными концентрациями доксорубицина: 0 мкг/мл (контроль), 2 мкг/мл и 4 мкг/мл. Определение уровня экспрессии 16 РТ-генов проводили методом количественной RT-PCR на термоциклере Bio-Rad CFX96. Нормализацию проводили по референсному гену и экспрессии соответствующих генов в образцах контроля. Установлено, что существенное влияние на экспрессию генов *MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *PRAME1* и *SYCP1* оказывает время культивирования и концентрация DXR, при этом на экспрессию *SSX2*, *MAGEA2*, *GAGE4* и *MAGEC1* эти факторы существенного влияния не оказывают, а концентрация DXR, отдельно взятая, не влияет на экспрессию *MAGEB1* и *MAGEB2*. Полученные данные по скорости ответа на воздействие DXR позволили выделить ранние РТ-гены (повышающие экспрессию – *MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *NY-ESO1*, *SYCP1*, и снижающие экспрессию – *GAGE1* и *BAGE*) и поздние РТ-гены (повышающие экспрессию – *GAGE3* и *XAGE3*). Эти результаты необходимо учитывать при проведении иммунотерапии, основанной на технологии дендритно-клеточных вакцин.

Ключевые слова: раково-тестикулярные антигены, экспрессия генов, доксорубицин, HeLa

Адрес для переписки:

Кутилин Денис Сергеевич
ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский
онкологический институт» Министерства
здравоохранения РФ
344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63, корп. 8.
Тел.: 8 (863) 300-02-00 (доб. 472).
E-mail: k.denees@yandex.ru

Address for correspondence:

Kutilin Denis S.
Rostov Research Institute of Oncology
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don, 14 Line, 63,
bldg 8.
Phone: 7 (863) 300-02-00 (add. 472).
E-mail: k.denees@yandex.ru

Образец цитирования:

Д.С. Кутилин, Х.А. Могушкова «Влияние
противоопухолевых антибиотиков антрациклинового
ряда на транскрипционную активность раково-
тестикулярных антигенов в модельном эксперименте
на клеточной линии HeLa» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 539-546.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-539-546

© Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., 2019

For citation:

D.S. Kutilin, Kh.A. Mogushkova “Effect of anthracycline
antitumor antibiotics upon transcription activity of cancer-testis
antigens in model experiments with HeLa cells”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 3, pp. 539-546.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-539-546

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-539-546

EFFECT OF ANTHRACYCLINE ANTITUMOR ANTIBIOTICS UPON TRANSCRIPTION ACTIVITY OF CANCER-TESTIS ANTIGENS IN MODEL EXPERIMENTS WITH HeLa CELLS

Kutulin D.S., Mogushkova Kh.A.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Cancer-testis antigens (CTA) can be used as a target for immunotherapy of various malignant tumors, including cervical cancer. However, immunotherapy is often used in combination with anthracycline chemotherapy, in particular, doxorubicin (DXR). Their effects upon expression of CTA genes have not been yet studied. Therefore, we studied the effects of doxorubicin at different concentrations and exposure time upon transcriptional profile of 17 cancer-testicular (CT) genes of HeLa CCL-2 cells. A long-term line of human cervical cancer cells (HeLa CCL-2 line) was used in this work. Culturing of HeLa CCL-2 cells was carried out in sterile culture flasks with adhesive surface and ventilated lids at 5% CO₂ and 95% humidity at 37 °C, in RPMI-1640 medium with 10% fetal bovine serum, supplied with gentamicin (50 µg/ml), and different concentrations of doxorubicin: 0 µg/ml (control), 2 µg/ml, and 4 µg/ml. Expression levels of 16 RT-genes were determined by quantitative RT-PCR using a Bio-Rad CFX96 thermal cycler. Normalization of results was performed against a reference gene, and expression of tested genes in the control samples. We have found that the time of *in vitro* exposure, and concentration of doxorubicin exert a significant influence upon expression of *MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE*, *CTAG1B*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *PRAME1* and *SYCP1* genes, however, without affecting the *SSX2*, *MAGEA2*, *GAGE4* and *MAGEC1* expression, and DXR concentration as a single factor did not affect *MAGEB1* and *MAGEB2* expression. Time of response to DXR effects enabled us to discern early cancer testicular genes with increased expression (*MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *NY-ESO1*, *SYCP1*), reduced expression (*GAGE1* and *BAGE*), and late inducible testicular genes (*GAGE3* and *XAGE3*). These results must be taken into account when carrying out immunotherapy based on the dendritic-cell vaccine technology.

Keywords: cancer-testis antigens, gene expression, doxorubicin, HeLa

Раково-тестикулярные антигены (РТА) являются одной из групп опухоль-ассоциированных антигенов. Экспрессия РТА в зрелых соматических клетках практически отсутствует, а ее появление может служить молекулярным маркером малигнизации ткани [1, 4]. Иммунный ответ на РТА может быть активизирован с помощью дендритно-клеточных противоопухолевых вакцин [1, 2]. Однако иммунотерапия наиболее часто применяется в качестве дополнения к основным методам лечения опухолей – хирургическому лечению, радио- и химиотерапии [3]. К числу наиболее часто используемых химиотерапевтических средств для лечения различных видов рака относятся антрациклиновые антибиотики, которые ингибируют синтез нуклеиновых кислот, за счет интеркаляции между парами азотистых оснований, что приводит к нарушению вторичной спирализации ДНК [7, 9, 14]. Доксорубин (DXR) в настоящее время продолжает использоваться в составе химиотерапии при раке шейки матки [13], при этом его эффекты на экспрессию генов РТА и результаты последующей иммунотерапии остаются неизученными. Поэтому целью нашего исследования стала оценка влияния

разных концентраций доксорубина и времени экспозиции (культивирования клеток) на транскрипционный профиль РТА клеток HeLa CCL-2.

В работе использована культура клеток человека – рак шейки матки линии HeLa CCL-2. Культивирование клеток HeLa CCL-2 проводилось в 9 стерильных плоскодонных культуральных флаконах площадью 25 см² с адгезионной поверхностью и вентилируемыми крышками (Sarstedt, Германия). Инкубирование шло в условиях контролируемого 5% CO₂ и 95% влажности при 37 °C в мультигазовом инкубаторе CB 150 (Binder, Германия). Культивирование клеток проводилось в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия) с 10% фетальной телячьей сывороткой (Thermo Scientific hyclone, США) при концентрации гентамицина 50 мкг/мл и различными концентрациями доксорубина (DXR): 0 мкг/мл (контроль), 2 мкг/мл и 4 мкг/мл (по 3 флакона). Через 1, 5 и 24 часа культивирования проводилось микроскопирование монослойной культуры с помощью инвертированного микроскопа DM IL LED Fluo (Leica, Германия) и цифровой камеры DFC365FX (Leica, Германия). После микроскопирования клеточные линии снимались с подложки флакона пу-

тем трипсинизации раствором Трипсин/Версена (Биолот, Россия). Подсчет общего количества клеток и анализ соотношения живых и мертвых клеток проводился в камере Горяева с использованием 0,4% раствора трипанового синего. После чего клеточная масса отмывалась от среды фосфатно-солевым буферным раствором Дюльбекко (DPBS) (Биолот, Россия) и осаждалась центрифугированием.

В процессе эксперимента проводилось гено-типирование HeLa CCL-2 с помощью набора реактивов COrDIS Sprint («Гордиз», Россия) и реал-тайм амплификатора (Applied Biosystems).

Суммарную РНК из образцов выделяли по методу Р. Chomczynski и N. Sacchi [8]. Для удаления следов геномной ДНК полученные образцы суммарной РНК обрабатывали препаратами ДНК-азы. Синтез кДНК проводили с использованием коммерческих наборов Reverta-L («Интерлабсервис», Россия) [5]. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров (табл. 1) осуществлялся нами с использованием референсных последовательностей NCBI GenBank и программы Primer-BLAST на основе следующих принципов: область отжига олигонуклеотидных праймеров должна быть в диапазоне 58–60 °С; GC-состав в диапазоне 40–60%; в последовательности праймера

должны отсутствовать стабильные вторичные структуры — шпильки и димеры, е-value последовательности праймера должно стремиться к нулю и быть не больше 0,05, а query coverage (покрытие целевой последовательности) — 100% (для версии BLASTN 2.3.1+), температуры отжига праймеров (Forward и Reverse) не должны различаться более чем на 0,50. При подборе праймеров учитывался сплайсинг мРНК (использовали опцию “Primer must span an exon-exon junction” программы Primer-BLAST) [6]. Определение относительной экспрессии 16 генетических локусов (*MAGE-A1*, *MAGE-A2*, *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *MAGE-B1*, *MAGE-B2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGE-C1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SYCP1*, *PRAME1*) проводили методом Real-Time qPCR (референсный ген — *GAPDH*) на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США).

Полученную библиотеку кДНК амплифицировали в 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,25мМ каждого из dNTP, 2,5 мМ MgCl₂, 1-ый ПЦР-буфер и 1 ед. акт. SynTaq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Россия), краситель EVA-Green и по 400 нМ прямого и обратного праймеров для референсного гена (*GAPDH*) или гена-мишени. Количественную RT-PCR-

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СПЕЦИФИЧНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ

TABLE 1. SEQUENCES OF SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS

№	Название генетического локуса Name of the genetic locus	Последовательности праймеров 5'→3' Sequences of primers 5'→3'	
		Прямой Forward	Обратный Reverse
1	<i>MAGEA1</i>	GAAGGAACCTGACCCAGGC	AGGGAATCCTGTCCTCTGGG
2	<i>MAGEA2</i>	CGCAGGCTCCGTGAGG	CTGTGTTGACCTGAGTCACCT
3	<i>MAGEA3</i>	TGAGCAACGAGCGACGG	TCAGCCTGTCCCTCAGAA
4	<i>MAGEB1</i>	TTCAGTGTGGTGTCCAGCAG	CGAGTTGTA CTCTGGATGATCT
5	<i>MAGEB2</i>	AGCCAGGGGTGAATTCTCAG	GGCACGGAGCTTACTCTTCT
6	<i>GAGE-1</i>	CTGATGGGCAGGAGATGGAC	CCAGTCTGGGCAACATAGTGA
7	<i>GAGE3</i>	TCACACAGATGAGTTGGCGA	CTGTGTGAAATATGAGTTGGCGA
8	<i>GAGE4</i>	GAGGAGGTGAAAACGCCTGA	GCATCATTTCAACGTGCCTTCT
9	<i>MAGEC1</i>	ACGAGGATCGTCTCAGGTCA	CCAGGTCTTCAACTCCTGCT
10	<i>MAGEA4</i>	CTGACCAGCAGCTTGGGAT	TCCAGGGAATCCTGTCCTCC
11	<i>BAGE</i>	GCCGGCTCCTTTCAGGATT	ACATCTTTCAGGAGCTTGGTCA
12	<i>NY-ESO1</i>	TCACTGTGTCCGGCAACATA	TGATGGAGAGCTGCAGTTGG
13	<i>XAGE3</i>	ACTTGCCCTGAGACTTAGTTCCG	ACTTGCCCTGAGACTTAGTTCCG
14	<i>SSX2</i>	CACGGTTGGTGCTCAAATACC	CCGAGGCTTTTCATCTTTTCCC
15	<i>SYCP1</i>	CGGTGAAACCTCAGACCCT	AGTCTTTGCAATGGAACCTCAAA
16	<i>PRAME1</i>	GCTGAGCCATTGTCTCGTTC	AGGTCTCAGTCACTTGTGGCC
17	<i>GAPDH</i>	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	TGCCCCACTTGATTTTGGAA

амплификацию проводили на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: первичная денатурация: $t = 95^{\circ}\text{C}$ в течение 3 мин; 40 циклов: $t = 95^{\circ}\text{C}$ в течение 10 с, $t = 58^{\circ}\text{C}$ в течение 30 с (регистрация сигнала), $t = 72^{\circ}\text{C}$ в течение 30 с. Относительную экспрессию генетического локуса (RE) рассчитывали по формуле $RE = 2^{-C_t}$ [6]. Нормализацию проводили по референсному гену *GAPDH* [1, 2, 5] и экспрессии соответствующих генов в образцах контроля, последовательно по схеме, приведенной ниже:

1. Нормализация по референсному гену:
 $\Delta C(t) = C(t)_{\text{target}} - C(t)_{\text{reference}}$

2. Расчет среднего арифметического $\Delta C(t)$ по каждому гену для контрольной и опытной групп.

3. Нормализация по контрольной группе:
 $\Delta\Delta C(t) = \Delta C(t)_{\text{среднее опытной группы}} - \Delta C(t)_{\text{среднее контрольной группы}}$

4. Окончательный результат (кратное различие): $2^{-\Delta\Delta C(t)}$

Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с повторениями (оценивалось влияние факторов А – время культивирования и Б – концентрация доксорубина), а также Post Hoc теста (тест Newman–Keuls) в программе Statistica 8.0 (StatSoft Inc.).

Во время модельного эксперимента изменение генотипа HeLa CCL-2 не было обнаружено. Результаты генотипирования свидетельствуют о соответствии используемой клеточной линии генотипу HeLa CCL-2 (www.lgcstandards-atcc.org) и об отсутствии контаминации (табл. 2).

В ходе исследования установлено достоверное ($p < 0,001$) влияние факторов времени инкубации

(культивирования) и концентрации доксорубина (вместе и по отдельности) на выживаемость клеток HeLa CCL-2.

При культивировании клеток HeLa с концентрацией доксорубина 0 мкг/мл (контроль) в течение 1, 5 и 24 часов наблюдалось увеличение количества живых клеток на 3,8, 20,2 и 129,4%, соответственно, относительно изначального количества (порядка 1 млн 700 тыс.). При культивировании клеток HeLa в среде с концентрацией доксорубина 2 мкг/мл через 1 час отсутствовал значимый прирост количества живых клеток (менее 1%), а через 5 и 24 часа наблюдалось снижение их количества на 13,1 и 35,9% соответственно. При инкубации клеток HeLa в среде с концентрацией доксорубина 4 мкг/мл через 1 час также отсутствовал значимый прирост количества живых клеток, а через 5 и 24 часа наблюдалось снижение их количества на 35,0 и 53,0% соответственно (рис. 1А, Б, В).

Также установлено, что факторы времени инкубации клеток и концентрации DXR, вместе взятые, статистически достоверно ($p < 0,005$) влияют на экспрессию 12 из 16 (75%) исследованных генов раково-тестикулярных антигенов (РТ-генов): *MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *PRAME1* и *SYCP1*. При этом факторы времени инкубации клеток и концентрация DXR статистически достоверно не влияли на экспрессию генов *SSX2*, *MAGEA2*, *GAGE4* и *MAGEC1*, концентрация DXR, отдельно взятая, статистически достоверно не влияет на экспрессию генетических локусов *MAGEB1* и *MAGEB2* (влияет фактор времени инкубации, $p < 0,05$), а фактор времени инкубации не влияет на экспрессию гена *PRAME1* (влияет фактор концентрации DXR, $p < 0,05$).

ТАБЛИЦА 2. STR АЛЛЕЛИ HeLa CCL-2 ИЗ БАЗЫ ДАННЫХ ATCC И STR АЛЛЕЛИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ В ДАННОМ ИССЛЕДОВАНИИ

TABLE 2. HeLa CCL-2 STR ALLELES FROM THE ATCC DATABASE AND THE STR ALLELES OF THE CELL LINE USED IN THIS STUDY

STR	Аллель STR HeLa CCL-2 (ATCC) HeLa CCL-2 STR allele (ATCC)	Аллель STR клеточной линии, используемой в данном исследовании STR allele of the cell line used in this study
Amelogenin	X	X
D13S317	12, 13.3	12, OL
D16S539	9, 10	9, 10
D5S818	11, 12	11, 12
D7S820	8, 12	8, 12
THO1	7	7
TPOX	8, 12	8, 12
vWA	16, 18	16, 18
CSF1PO	9, 10	9, 10

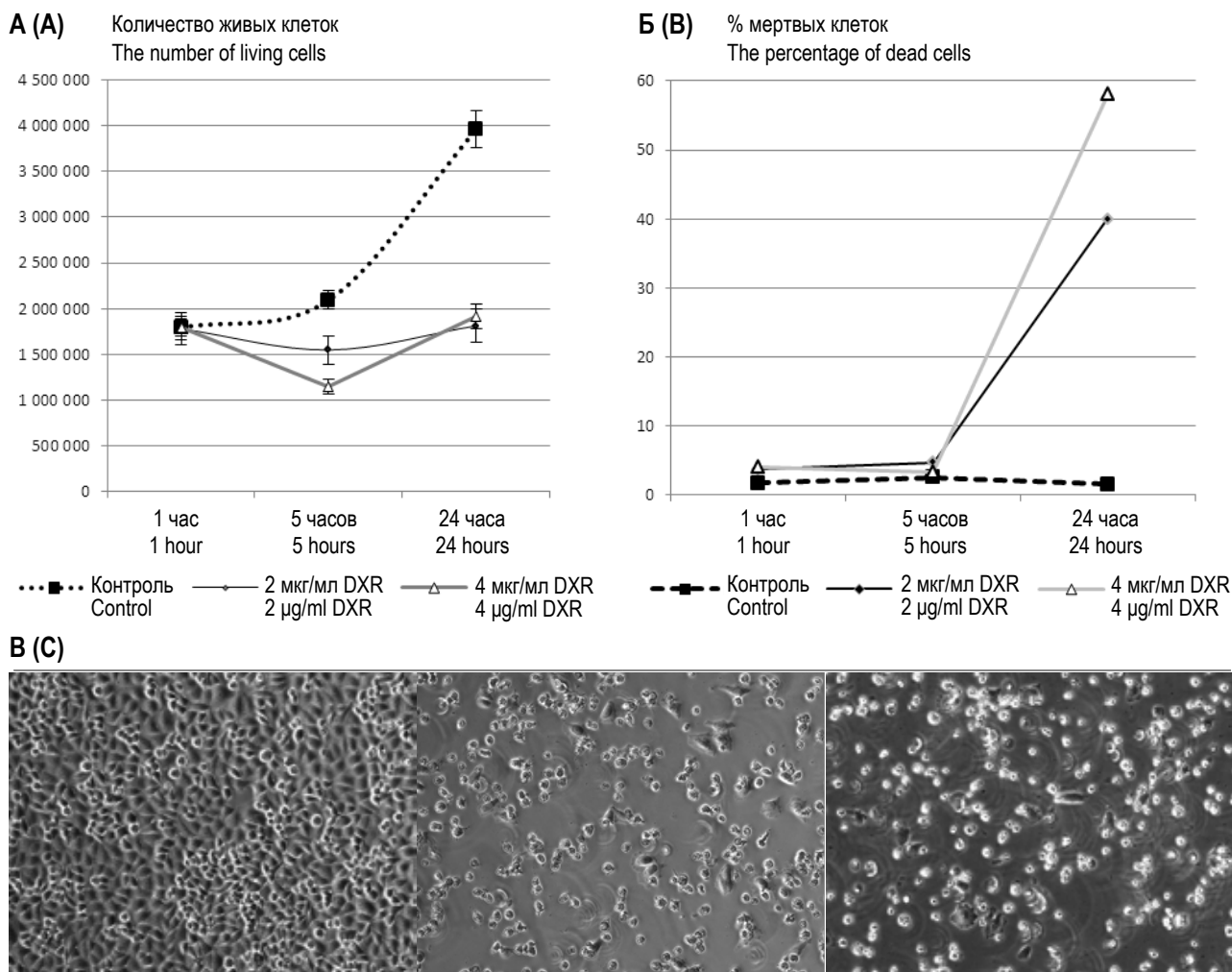


Рисунок 1. Изменение количества клеток HeLa при культивировании в течение 1, 5 и 24 часов в среде, содержащей разную концентрацию доксорубина (0, 2 и 4 мкг/мл)

Примечание. А) жизнеспособных клеток. Б) нежизнеспособных клеток (млн/мл). В) микрофотографии клеточной линии HeLa при культивировании 24 часа в среде с концентрацией доксорубина 0, 2 и 4 мкг/мл (на рисунке увеличение концентрации слева направо). Увеличение 100×. Фазовый контраст.

Figure 1. Changes in the number of HeLa cells during cultivation for 1, 5 and 24 hours in medium containing doxorubicin (0, 2 and 4 µg/ml)

Note. A) viable cells. B) non-viable cells (million/ml). C) micrographs of the HeLa cell line when cultured for 24 hours in medium with a concentration of doxorubicin 0, 2 and 4 µg/ml (in the figure the increase in concentration from left to right). An increase of 100×. Phase contrast.

Выполненное с использованием теста Newman–Keuls попарное сравнение 9 групп по 2 факторам для каждого РТ-гена выявило следующие статистически значимые отличия для $p < 0,002$ (рис. 2, 3):

1) относительно контроля (среда без DXR) через 1 час культивирования при концентрации DXR 2 мкг/мл обнаружено повышение экспрессии *MAGEA1* в 6,9 раза, *MAGEA4* в 9,1 раза, *MAGEA3* в 2,0 раза и *SYCP1* в 41,3 раза, *NY-ESO1* (2 и 4 мкг/мл DXR), а также подавление экспрессии генов *GAGE1* и *BAGE* в 2,5 и 1,4 раза соответственно (2 мкг/мл DXR);

2) относительно контроля через 5 часов культивирования обнаружена пониженная экспрессия *BAGE* в 2,0 и 1,6 раза (2 и 4 мкг/мл DXR соответственно);

3) относительно контроля через 24 часа культивирования обнаружена сниженная экспрессия *GAGE1* в 1,4 раза (2 и 4 мкг/мл DXR), *BAGE* в 2,5 и 1,3 раза (2 и 4 мкг/мл DXR) и повышенная экспрессия гена *XAGE3* в 12,4 и 3,5 раза (2 и 4 мкг/мл DXR соответственно);

4) относительно точки 1 час культивирования с доксорубином разной концентрации обнаружено снижение экспрессии РТ-генов: *MAGEA1* в 11,5 раз, *MAGEA4* в 22,8 раза, *MAGEA3* в 2,2 раза, *MAGEB1* в 8,1 раза, *BAGE* в 1,3 и *SYCP1* в 103,3 раза (2 мкг/мл DXR) через 5 часов культивирования; *MAGEA1* в 7,7 раза, *MAGEA4* в 10,1 раза, *MAGEA3* в 1,7 раза, *MAGEB1* в 20,3 раза (2 мкг/мл DXR), *MAGEB2* в 4,3 раза (4 мкг/мл DXR), *BAGE* в 1,7 раза и *SYCP1* в 45,9 раза (2 мкг/мл DXR) через 24 часа культивирования;

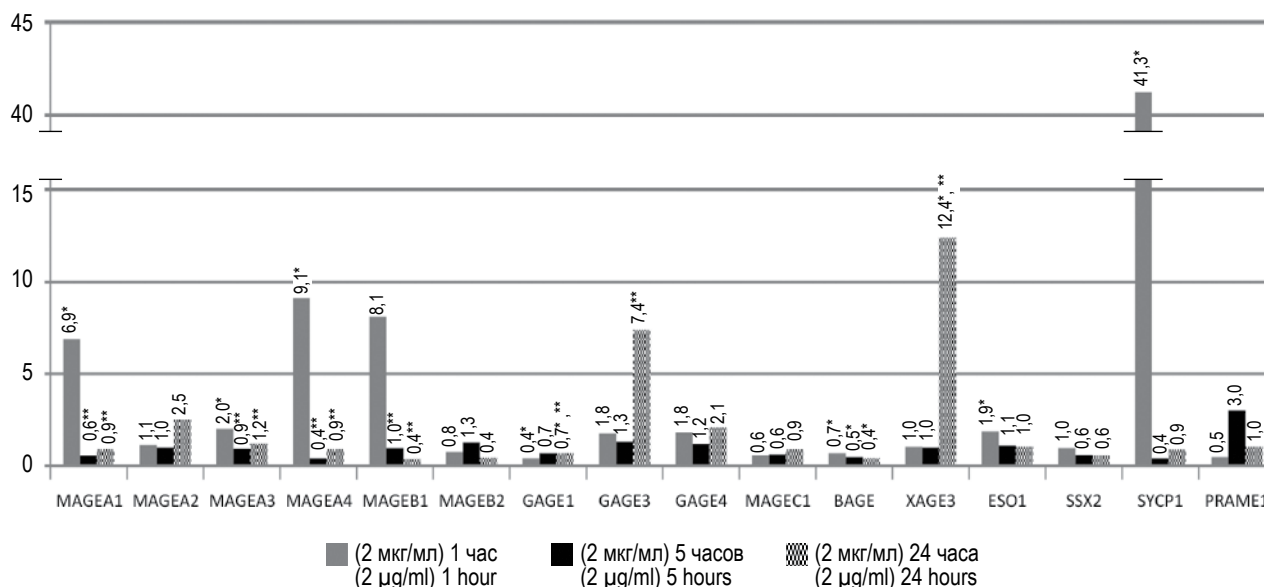


Рисунок 2. Влияние доксорубина в концентрации 2 мкг/мл среды на экспрессию РТ-генов в клетках HeLa CCL-2 при культивировании в течение 1, 5 и 24 часов

Примечание. * – статистически достоверные отличия относительно контроля; ** – статистически достоверные отличия относительно 1 часа культивирования ($p < 0.002$).

Figure 2. The effect of 2 µg/ml doxorubicin on the expression of CT-genes in HeLa CCL-2 cells during cultivation for 1, 5 and 24 hours

Note. *, statistically significant differences relative to the control; **, statistically significant differences relative to 1 hour of cultivation ($p < 0.002$).

5) относительно точки 1 час культивирования с доксорубином разной концентрации обнаружено повышение экспрессии *GAGE1* в 1,8 раза (2 мкг/мл DXR) через 24 часа, *GAGE3* в 4,1 раза (2 мкг/мл DXR) через 24 часа, *XAGE3* в 12,4 и 2,9 раза (2 и 4 мкг/мл DXR соответственно) через 24 часа культивирования (рис. 2, 3).

Таким образом, максимальное (от 6,9 до 41,3 раз) увеличение транскрипционной активности у 31% (*MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *ESO1*, *SYCP1*) исследованных РТ-генов наблюдается через 1 час культивирования клеток HeLa CCL-2 в среде, содержащей 2 мкг/мл доксорубина, при этом для 12% (*GAGE1*, *BAGE*) исследованных РТ-генов наблюдается снижение транскрипционной активности, а 57% исследованных РТ-генов не изменяют ее по сравнению с контролем. После 1 часа культивирования клеток HeLa CCL-2 в среде содержащей 2 мкг/мл доксорубина (5–24 часа) наблюдается снижение экспрессии 31% РТ-генов (*MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1* и *BAGE*), увеличение экспрессии 18% РТ-генов (*GAGE1*, *GAGE3*, *XAGE3*) и отсутствие достоверного изменения экспрессии 51% РТ-генов. При культивировании клеток HeLa CCL-2 в среде, содержащей 4 мкг/мл доксорубина, наблюдается изменение экспрессии только 31% исследованных РТ-генов, при этом менее выраженное, чем при концентрации доксорубина 2 мкг/мл. Подобный эффект, вероятно, может быть связан

с более выраженным цитотоксическим действием доксорубина (из-за продукции свободных радикалов хинона (убисемихинона) [12]) в дозе 4 мкг/мл (см. рис. 1), при этом выживают клетки, толерантные к данному антрациклиновому антибиотiku. Формирование толерантных клеток при увеличении концентрации доксорубина ранее было показано в работе Tsou S.H. и соавт. [15]. За счет интеркаляции между парами азотистых оснований доксорубин ингибирует топоизомеразу II, релаксирующую суперспираль ДНК для транскрипции [11], вызывает выведение гистонов из транскрипционно-активного хроматина, в результате нарушается регуляция эпигенома и транскриптома [10]. Соответственно, разные концентрации DXR (2 и 4 мкг/мл) будут оказывать разное воздействие на транскрипционную активность генов в культуре, в зависимости от количества толерантных к данному препарату клеток.

Полученные данные позволили также сформировать группы РТ-генов по времени ответа на воздействие DXR (для 2 мкг/мл): 1) ранние РТ-гены, повышающие экспрессию (*MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *NY-ESO1*, *SYCP1*) и снижающие экспрессию (*GAGE1* и *BAGE*) под воздействием DXR; 2) поздние РТ-гены, повышающие экспрессию под воздействием DXR (*GAGE3* и *XAGE3*).

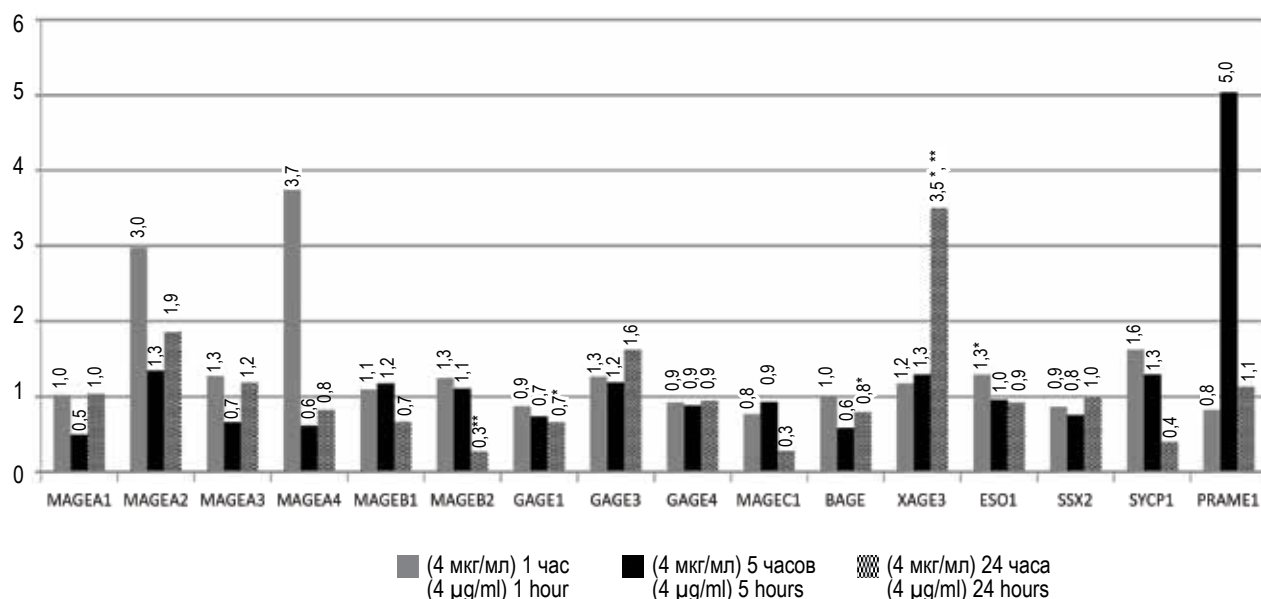


Рисунок 3. Влияние доксорубицина в концентрации 4 мкг/мл среды на экспрессию РТ-генов в клетках HeLa CCL-2 при культивировании в течение 1, 5 и 24 часов

Примечание. * – статистически достоверные отличия относительно контроля; ** – статистически достоверные отличия относительно 1 часа культивирования ($p < 0,002$).

Figure 3. The effect of 4 µg/ml doxorubicin on the expression of CT-genes in HeLa CCL-2 cells during cultivation for 1, 5 and 24 hours

Note. *, statistically significant differences relative to the control; **, statistically significant differences relative to 1 hour of cultivation ($p < 0.002$).

Существенное влияние на экспрессию РТ-генов клеточной линии HeLa CCL-2 *MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE*, *CTAG1B*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *PRAME1* и *SYCP1* оказывает время культивирования и концентрация доксорубицина, при этом на экспрессию РТ-генов *SSX2*, *MAGEA2*, *GAGE4* и *MAGEC1* эти факторы существенного влияния не оказывают, а концентрация DXR, отдельно взятая, не влияет на экспрессию *MAGEB1*

и *MAGEB2*. Полученные данные также позволили сформировать следующие группы РТ-генов:

1) ранние РТ-гены, повышающие экспрессию (*MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *NY-ESO1*, *SYCP1*) и снижающие экспрессию (*GAGE1* и *BAGE*) под воздействием DXR;

2) поздние РТ-гены, повышающие экспрессию под воздействием DXR (*GAGE3* и *XAGE3*). Эти результаты имеют важное значение для проведения иммунотерапии, в частности для создания и применения дендритно-клеточных вакцин.

Список литературы / References

1. Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., Ващенко Л.Н., Никитина В.П., Кит О.И. Транскрипционная активность раково-тестикулярных антигенов у больных раком молочной железы люминальных подтипов А и В // Современные проблемы науки и образования, 2017. № 4. [Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A., Vashchenko L.N., Nikitina V.P., Kit O.I. Transcriptional activity of cancer-testis antigens in patients with breast cancer of luminal subtypes A and B. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* = *Modern Problems of Science and Education*, 2017, no. 4. (In Russ.)]
2. Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., Кит О.И. Транскрипционный профиль раково-тестикулярных антигенов у больных раком молочной железы // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 383-390. [Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A., Kit O.I. Transcriptional profile of cancer-testicular antigens in patients with breast cancer. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 383-390. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390.
3. Давыдов М.И., Ганцев Ш.Х. Онкология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 920 с. [Davydov M.I., Gantsev Sh.Kh. *Oncology: a textbook*. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 920 p.
4. Кит О.И., Солдатова К.И., Кутилин Д.С., Водолажский Д.И. Раково-тестикулярные антигены в диагностике опухолей толстой кишки // Современные проблемы науки и образования, 2018. № 2. [Kit O.I., Soldatova K.I., Kutilin D.S., Vodolazhsky D.I. Cancer-testis antigens in colon tumors diagnostics., *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* = *Modern Problems of Science and Education*, 2018, no. 2. (In Russ.)]

5. Кутилин Д.С., Бондаренко Т.И., Корниенко И.В., Михалева И.И. Влияние пептида дельта-сна на экспрессию генов антиоксидантных ферментов в мозге и крови крыс при физиологическом старении организма // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2014. Т. 157, № 5. С. 634-637. [Kutilin D.S., Bondarenko T.I., Kornienko I.V., Mikhaleva I.I. Effect of delta sleep-inducing peptide on the expression of antioxidant enzyme genes in the brain and blood of rats during physiological aging. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, Vol. 157, no. 5, pp. 634-637. (In Russ.)]
6. Кутилин Д.С., Димитриади С.Н., Водолажский Д.И., Франциянц Е.М., Кит О.И. Влияние тепловой ишемии-реперфузии на экспрессию апоптоз-регулирующих генов в почечной ткани больных с почечно-клеточным раком // Нефрология, 2017. № 21 (1). С. 80-86. [Kutilin D.S., Dimitriadi S.N., Vodolazhsky D.I., Frantsiyants E.M., Kit O.I. Effect of thermal ischemia-reperfusion on expression of apoptosis-regulating genes in the renal tissue of patients with renal cell carcinoma. *Nefrologiya = Nephrology*, 2017, no. 21 (1), pp. 80-86. (In Russ.)]
7. Calcagno A.M., Salcido C.D., Gillet J.P., Wu C.P., Fostel J.M., Mumau M.D., Gottesman M.M., Varticovski L., Ambudkar S.V. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2010, no. 102, pp. 1637-1652.
8. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.*, 2006, Vol. 1, no. 2, pp. 581-585.
9. Hanada M. Amrubicin, Chapter 6 in case studies in modern drug discovery and development. Eds. Huang X., Aslanian R.G. John Wiley & Sons, 2012.
10. Pang B., de Jong J., Qiao X., Wessels L.F., Neeftjes J. Chemical profiling of the genome with anti-cancer drugs defines target specificities. *Nat. Chem. Biol.*, 2015, Vol. 11, no. 7, pp. 472-480.
11. Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.*, 2010, Vol. 17, no. 5, pp. 421-433.
12. Rossi S. Australian Medicines Handbook. Adelaide: The Australian Medicines Handbook Unit Trust, 2013.
13. Soper J.T., Reisinger S.A., Ashbury R., Jones E., Clarke-Pearson D.L. Feasibility study of concurrent weekly cisplatin and whole abdominopelvic irradiation followed by doxorubicin/cisplatin chemotherapy for advanced stage endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group trial. *Gynecol. Oncol.*, 2004, Vol. 95, no. 1, pp. 95-100.
14. Takimoto C.H., Calvo E. Principles of oncologic pharmacotherapy in cancer management: a multidisciplinary approach. Pazdur R., Wagman L.D., Camphausen K.A., Hoskins W.J. (Eds). 11 ed., London, UK: UBM Medica, 2008, pp. 42-58.
15. Tsou S.H., Chen T.M., Hsiao H.T., Chen Y.H. A critical dose of doxorubicin is required to alter the gene expression profiles in MCF-7 cells acquiring multidrug resistance. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 1, e0116747. doi: 10.1371/journal.pone.0116747.

Авторы:

Кутилин Д.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Могушкова Х.А. — аспирант ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Kutilin D.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Mogushkova Kh.A., Postgraduate Student, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 03.09.2018

Принята к печати 03.09.2018

Received 03.09.2018

Accepted 03.09.2018

ИЗУЧЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНОГО ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ БРУЦЕЛЛЕЗА В ЛИМФОЦИТАРНЫХ ТЕСТАХ *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНТИГЕННОГО КОМПЛЕКСА

Костюченко М.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г.,
Логвиненко О.В., Курчева С.А., Бердникова Т.В., Русанова Д.В.,
Куличенко А.Н.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Нормативно-методическая база, регламентирующая проведение оценки иммунологической эффективности вакцинации против бруцеллеза и выраженности иммунологической поствакцинальной перестройки не разработана. Учитывая ведущую роль клеточного иммунитета в формировании иммунологической защиты от бруцеллеза, оценку клеточной реакции в ответ на антигенную стимуляцию можно считать наиболее информативным и объективным подходом для анализа иммунологической перестройки организма при вакцинации. Для разработки наиболее диагностически информативных методик постановки антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* необходим тщательный подбор стимулирующего агента (антигена), обладающего достаточным активирующим потенциалом и обеспечивающим специфичность реакции в условиях *in vitro*. Цель исследования — изучить в условиях *in vitro* специфическую активность белково-полисахаридного антигенного комплекса из штамма *Brucella abortus* 19 ВА (БрАг) и возможность его применения для оценки формирования поствакцинального клеточного иммунитета против бруцеллеза.

Объект исследования — белые лабораторные мыши ($n = 50$), иммунизированные штаммом *Brucella abortus* 19 ВА. Контрольную группу ($n = 50$) составили лабораторные мыши, которым введен стерильный физиологический раствор в объеме 0,5 мл. Взятие крови у иммунизированных и контрольных биомоделей осуществляли до вакцинации и на 7, 14, 21 и 30 сутки после иммунизации. При цитометрическом исследовании определяли активационные молекулы CD25, CD69, МНС II и CD95, экспрессированные на Т-лимфоцитах ($CD3^+CD69^+$, $CD3^+CD25^+$, $CD3^+CD95^+$, $CD3^+MHC^+$). Для оценки формирования иммунитета уровень интенсивности экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитов рассчитывали с использованием коэффициента стимуляции. Для специфической стимуляции Т-лимфоцитов *in vitro* применяли БрАг. В качестве антигена для сравнения при изучении возмож-

Адрес для переписки:

Пonomarenko Дмитрий Григорьевич
ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт»
Роспотребнадзора
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15.
Тел.: 8 (8652) 26-03-37.
Тел./факс: 8 (8652) 26-03-12.
E-mail: ponomarenko.dg@gmail.com

Address for correspondence:

Ponomarenko Dmitry G.
Stavropol Anti-Plague Institute
355035, Russian Federation, Stavropol,
Sovetskaya str., 13-15.
Phone: 7 (8652) 26-03-37.
Phone/Fax: 7 (8652) 26-03-12.
E-mail: ponomarenko.dg@gmail.com

Образец цитирования:

М.В. Костюченко, Е.Л. Ракитина, Д.Г. Пономаренко, О.В. Логвиненко, С.А. Курчева, Т.В. Бердникова, Д.В. Русанова, А.Н. Куличенко «Изучение формирования клеточного поствакцинального иммунитета против бруцеллеза в лимфоцитарных тестах *in vitro* с использованием экспериментального антигенного комплекса» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 547-554.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-547-554

© Костюченко М.В. и соавт., 2019

For citation:

M.V. Kostyuchenko, E.L. Rakitina, D.G. Ponomarenko, O.V. Logvinenko, S.A. Kurcheva, T.V. Berdnikova, D.V. Rusanova, A.N. Kulichenko "Studying development of post-vaccinal cellular immunity against brucellosis by means of lymphocyte *in vitro* tests using an experimental antigenic complex", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 547-554.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-547-554

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-547-554

ности применения БрАг для оценки формирования поствакцинального иммунитета использовали аллерген бруцеллезный жидкий – бруцеллин.

Анализ результатов исследования показал, что БрАг обладает выраженной специфической активностью, не вызывает неспецифических реакций (активации) Т-лимфоцитов в условиях *in vitro*, что дает возможность использования его в качестве тест-антигена при постановке реакции антигенспецифической активации Т-лимфоцитов для оценки формирования адаптивного вакцинального иммунитета против бруцелл.

Анализ применения экспериментального бруцеллезного антигена, для постановки антигенстимулированных клеточных реакций *in vitro*, с целью оценки формирования поствакцинального иммунитета против бруцеллеза показал, что использование БрАг способствует повышению диагностической чувствительности (в эксперименте) клеточных реакций *in vitro*. Полученный экспериментальный антиген имеет реальную перспективу применения при разработке алгоритмов лабораторной диагностики бруцеллеза и оценки фактической привитости контингентов риска после вакцинации против бруцеллеза.

Ключевые слова: бруцеллез, поствакцинальный иммунитет, антигенный комплекс, активация лимфоцитов *in vitro*, маркеры активации, проточная цитометрия

STUDYING DEVELOPMENT OF POST-VACCINAL CELLULAR IMMUNITY AGAINST BRUCELLOSIS BY MEANS OF LYMPHOCYTE *IN VITRO* TESTS USING AN EXPERIMENTAL ANTIGENIC COMPLEX

Kostyuchenko M.V., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G.,
Logvinenko O.V., Kurcheva S.A., Berdnikova T.V., Rusanova D.V.,
Kulichenko A.N.

Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. Regulatory framework and methodological approaches to evaluation of immunological effects of vaccination against brucellosis are not established, and the degree of immunological post-vaccinal rearrangement is not yet developed. Due to leading role of cellular immunity in formation of immune protection against brucellosis, evaluation the cellular response in response to antigenic stimulation may be considered the most informative and objective approach to analysis of immune changes in the body during vaccination. In order to develop the most diagnostically informative methods for design of antigen-stimulation cell tests *in vitro*, a careful selection of a stimulating agent (antigen) is required, which should have a sufficient activating potential, thus providing specificity of reaction under *in vitro* conditions. The aim of the present study is to study the *in vitro* specific activity of a protein-polysaccharide antigenic complex from the *Brucella abortus* 19 BA strain (BrAg), and an opportunity of its application in order to assess the formation of post-vaccinal cellular immunity against brucellosis.

The study was performed with white laboratory mice (n = 50) immunized with the *Brucella abortus* 19 BA strain. The control group (n = 50) consisted of laboratory mice that received a sterile saline solution in a volume of 0.5 ml. Blood samples were taken from immunized and control animals before vaccination, and 7, 14, 21, and 30 days after immunization. By means of flow cytometry, the activation molecules CD25, CD69, MHC II and CD95, expressed on T lymphocytes (CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD95⁺, CD3⁺MHC⁺) were determined. To observe the development of immunity, the intensity of expression of T lymphocyte activation markers was calculated using the stimulation quotient. BrAg was used for specific *in vitro* stimulation of T lymphocytes. The liquid brucellosis allergen (brucellin) was used as an antigen for comparison, when studying opportunity of BrAg usage for assessing the postvaccinal immunity development.

The following results were obtained: BrAg has pronounced specific activity, it did not cause non-specific *in vitro* reactions (activation) of T lymphocytes, thus enabling its application as a test antigen when evaluating development of adaptive vaccine immunity against brucella.

Experimental testing of brucellosis antigen for carrying out the *in vitro* antigen-stimulated cellular reactions, aiming for evaluation of post-vaccinal immunity development against brucellosis, showed that the usage of BrAg promotes increase in diagnostic sensitivity of cellular reactions under *in vitro* experimental conditions. The applied experimental antigen is a quite promising tool for development of laboratory algorithms for brucellosis diagnostics, and assessment of actual vaccination efficiency in cohorts previously vaccinated against brucellosis.

Keywords: brucellosis, postvaccinal immunity, antigenic complex, *in vitro* lymphocyte activation, activation markers, flow cytometry

Введение

Эффективность вакцинации против бруцеллеза во многом зависит от правильного определения показаний к ее проведению, полноты отбора подлежащих иммунизации профессиональных групп, в том числе временного персонала, соблюдения сроков вакцинации и ревакцинации. Согласно санитарно-эпидемиологическим правилам СП 3.1.7.2613-10 «Профилактика бруцеллеза» перед вакцинацией/ревакцинацией контингентов риска, проводится медицинский осмотр с обязательным серологическим и аллергологическим обследованием, основанном на выявлении специфических антител (реакция агглютинации, ИФА) и кожной реакции с бруцеллином (проба Бюрне) [7].

Нормативно-методическая база, регламентирующая проведение оценки иммунологической эффективности вакцинации против бруцеллеза (фактической привитости) и выраженности иммунологической поствакцинальной перестройки, не разработана.

Существующие принципы обеспечения правильности и полноты отбора контингентов риска инфицирования возбудителем бруцеллеза, подлежащих иммунизации, предполагают комплексное применение различных методов, ориентированных на выявление специфических мишеней (маркеров). К иммунологическим маркерам, отражающим наличие и напряженность специфического иммунитета, относятся серопозитивность в отношении возбудителя инфекции и способность факторов адаптивного клеточного иммунитета (премированные лимфоциты, Т-клетки иммунологической памяти) к активации при контакте со специфическим антигеном.

Учитывая ведущую роль клеточного иммунитета в формировании иммунологической защиты от бруцеллеза, оценку клеточной реакции в ответ на антигенную стимуляцию можно считать наиболее информативным и объективным подходом при анализе иммунологической перестройки организма при вакцинации [1].

Для оценки специфического клеточно-опосредованного иммунитета против возбудителя бруцеллеза предложена кожная аллергологическая реакция с бруцеллином, принцип которой

основан на выявлении гиперчувствительности замедленного типа, осуществляемой антиген-компетентными Т-лимфоцитами в кооперации с макрофагами против антигенов клеточных мембран [5]. Проба Бюрне в настоящее время применяется достаточно редко, в связи с высоким риском развития общих и местных побочных реакций в виде повышения температуры, озноба, головной боли, воспалительной реакции на месте ведения, лимфангита, артралгии и др.

В настоящее время ведутся исследования по разработке антигенспецифических методов, позволяющих оценить напряженность иммунитета к инфекционным заболеваниям. Продемонстрирована высокая эффективность применения методов антигенной активации лейкоцитов *in vitro* с использованием технологии проточной цитометрии для изучения формирования поствакцинального иммунитета [2, 3, 6]. По данным ряда авторов, перспективными показателями специфической клеточной антигенреактивности могут выступать следующие маркеры (рецепторы) активации лимфоцитов: CD25, CD69 – ранние активационные маркеры и молекулы МСН II и CD95, представляющие маркеры поздней и длительной активации лимфоцитов [4, 8, 11, 12].

Для разработки наиболее диагностически информативных методик постановки антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* необходим тщательный подбор стимулирующего агента (антигена), обладающего достаточным активирующим потенциалом и обеспечивающим специфичность реакции в условиях *in vitro*.

В настоящее время нет коммерчески доступного бруцеллезного антигена для клеточных тестов *in vitro*. На базе ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора разработан белково-полисахаридный антигенный комплекс из штамма *Brucella abortus* 19 BA (BrAg) с концентрацией белка 10 мг/мл, предназначенный для применения в антигенспецифических клеточных реакциях *in vitro*.

Цель исследования – изучить в условиях *in vitro* специфическую активность BrAg и возможность его применения для оценки формирования поствакцинального клеточного иммунитета против бруцеллеза.

Материалы и методы

Объект исследования — белые лабораторные мыши ($n = 50$), иммунизированные вакциной против бруцеллеза на основе штамма *Brucella abortus* 19 ВА (НПО «Микроген» Минздрава России) в дозе $3,4 \times 10^8 - 4,6 \times 10^8$ живых микробных клеток в 0,5 мл физиологического раствора [9]. Контрольную группу ($n = 50$) составили лабораторные мыши, которым вводили стерильный физиологический раствор в объеме 0,5 мл. Взятие крови у иммунизированных и контрольных биомоделей осуществляли до вакцинации и на 7, 14, 21 и 30 сутки после иммунизации. С целью специфической стимуляции Т-лимфоцитов *in vitro* использовали экспериментальный бруцеллезный антиген — белково-полисахаридный комплекс из штамма *Brucella abortus* 19-ВА. В качестве антигена для сравнения при изучении возможности применения БрАг при оценке формирования поствакцинального иммунитета использовали аллерген бруцеллезный жидкий — бруцеллин® (НПО «Микроген» Минздрава России).

Исследования проводили на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США), используя моноклональные антитела (МКАТ) к поверхностным антигенам Т-лимфоцитов мыши. Определяли активационные молекулы CD25, CD69, МНС II и CD95, экспрессированные на Т-лимфоцитах. Популяцию лимфоцитов идентифицировали при помощи гейтирования в координатах FSC-SSC на графике Dot Plot (программное обеспечение BD Cell Quest™). События, попавшие в регион лимфоцитов, анализировали на предмет экспрессии CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD95⁺, CD3⁺МНС⁺ рецепторов. Используемые МКАТ (Invitrogen, США) были мечены FITC (флуоресцеин изотиоцианат) и PE (фикоэритрин).

Для определения фоновых значений маркеров активации стимуляцию лимфоцитов осуществляли стерильным физиологическим раствором. Реакцию активации учитывали через 24 часа после инкубации с БрАг в условиях *in vitro*.

При изучении возможности использования БрАг для оценки формирования иммунитета уровень интенсивности экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитов рассчитывали с использованием коэффициента стимуляции (КС) по формуле: $КС = (C - D) / C \times 100$ в %, где C — относительный уровень содержания в крови активированных Т-лимфоцитов в опытной пробе (после инкубации с антигеном); D — относительный уровень в крови активированных Т-лимфоцитов в контрольной пробе (после инкубации с физ. раствором) [2].

Математическую и статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 2010. С учетом малой выборки ($n < 30$) для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий при уровне надежности $P \geq 0,95$ [10].

Для оценки специфичности разработанного антигенного комплекса — БрАг — изучено влияние БрАг в условиях *in vitro* на Т-лимфоциты у неиммунных к возбудителю бруцеллезу экспериментальных животных (контрольная группа $n = 50$). Проведенные исследования показали, что интенсивность экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитов в контрольной группе при стимуляции физиологическим раствором и экспериментальным бруцеллезным антигеном не имела статистически значимой разницы во все сроки исследования. Это указывает на то, что БрАг не вызывают неспецифической реакции лимфоцитов *in vitro*. Так, уровень экспрессии маркера CD25 при стимуляции стерильным изотоническим раствором составил в среднем $2,47 \pm 0,46\%$, МНС — $20,32 \pm 1,63$ и $20,45 \pm 1,30\%$, CD69 — $10,22 \pm 2,23$ и $11,97 \pm 2,48\%$, CD95 — $2,12 \pm 0,44$ и $2,38 \pm 0,37\%$ соответственно.

Исследования интенсивности экспрессии «ранних» активационных молекул после вакцинации показали, что на 7 сутки уровень экспрессии Т-лимфоцитами CD25 при стимуляции БрАг увеличился в сравнении с фоновыми значениями ($3,93 \pm 0,91\%$) в 2,7 раза и составил в среднем $10,49 \pm 1,57\%$. На 14 сутки после иммунизации фоновые значения не имели статистически значимой разницы — $3,73 \pm 0,40\%$, после инкубации с антигенным комплексом уровень экспрессии рецептора к IL-2 увеличился в 2,8 раза, составив в среднем $8,65 \pm 1,85\%$. Активация БрАг Т-лимфоцитов у биомоделей через 21 сутки после вакцинации инициировала статистически значимое повышение экспрессии рецептора интерлейкина 2 до $8,32 \pm 1,0\%$, что выше фоновых значений ($2,32 \pm 0,50\%$) в 3,6 раза. На 30 сутки после иммунизации значения уровней антиген-индуцированной ($3,65 \pm 0,99\%$) и фоновой ($3,14 \pm 1,29\%$) экспрессии Т-лимфоцитами CD25 не имели статистически значимой разницы.

Анализ специфической активности БрАг по маркеру ранней пролиферации лимфоцитов — CD69 — показал, что на 7 сутки после иммунизации антигенный комплекс способствовал увеличению, в сравнении с фоновыми значениями ($20,54 \pm 3,66\%$), интенсивности экспонирования CD69 от 1,8 до 2 раз — $41,21 \pm 6,07\%$. Аналогичная тенденция сохранилась на 14, 21 и 30 сутки после иммунизации: $46,81 \pm 4,53\%$ (фон — $23,07 \pm 1,87\%$),

25,20±2,65% (фон – 10,70±1,20%) и 23,60±3,82% (13,23±2,40%).

Интенсивность экспрессии показателя активации лимфоцитов – молекул МНС у иммунных в возбудителю бруцеллеза лабораторных биомоделей, после стимуляции БрАг, имела статистически значимое, в сравнении с фоновыми значениями, увеличение на 7 сутки 33,04±3,98% (фон – 23,40±3,69%) и 30 сутки – 30,21±5,88% (фон – 8,94±2,01) после вакцинации. В остальные сроки исследования уровень экспонирования Т-лимфоцитами антигенов главного комплекса гистосовместимости не имел статистически значимых отличий в сравнении с фоновыми значениями. Так, на 14 сутки интенсивность антиген-стимулированной экспрессии – 16,66±2,63% (фон – 15,63±1,81), на 21 сутки – 18,99±4,08% (фон – 12,21±2,86).

Результаты исследования специфической активности БрАг по показателю экспрессии Т-лимфоцитов маркеров индукции апоптоза – CD95 – указывают на высокий активационный потенциал антигенного комплекса. Антиген-индуцированная экспрессия Т-лимфоцитами CD95 на 7 сутки после вакцинации составила 42,54±3,07% (фон – 34,73±3,02%), 14 сутки – 19,87±2,82% (фон – 12,66±1,42%), 21 сутки – 17,14±1,91% (фон – 8,84±1,55%). На 30 сутки после иммунизации значения интенсивности БрАг-индуцированного экспонирования Т-лимфоцитами маркеров апоптоза не имели статистически значимой разницы, составив в среднем 6,57±1,14% (фон – 6,28±2,37%).

Анализ результатов исследования показал, что белково-полисахаридный антигенный комплекс, полученный из штамма *Brucella abortus* 19 ВА по модифицированной методике, обладает выраженной специфической активностью в условиях *in vitro*. БрАг не вызывает неспецифических реакций (активации) Т-лимфоцитов *in vitro*, что дает возможность использования его в качестве тест-антигена при постановке реакции антиген-специфической активации Т-лимфоцитов *in vitro* для оценки формирования адаптивного вакцинального иммунитета против бруцелл.

Проведенные экспериментальные исследования по изучению возможности применения БрАг для оценки формирования поствакцинального иммунитета против бруцеллеза показали, что уровень экспрессии исследуемых маркеров активации у биомоделей контрольной группы во все сроки исследования не имел статистически значимых изменений (колебаний) значений, составив в среднем: CD69 – 7,78±0,24%, CD25 – 3,46±0,33%, МНС II – 0,96±0,09% и CD95 – 3,43±0,25%.

При использовании бруцеллина в качестве антигена для клеточных тестов *in vitro* интенсивность экспрессии лимфоцитами маркеров активации у вакцинированных животных на 7, 14, 21 и 30 сутки после иммунизации уровень антиген-стимулированной экспрессии CD69 Т-лимфоцитами не имел статистически значимой разницы, составив в среднем 6,01±1,28, 9,77±2,18, 6,31±2,81 и 11,04±3,78% соответственно. При использовании БрАг уровень активации Т-лимфоцитов по показателю CD69 многократно превышал данные контрольной группы и при использовании бруцеллина, составив в среднем на 7 сутки – 51,61±3,51%, 14 сутки – 49,59±2,71%, 21 сутки – 60,38±7,75% и 30 – 52,32±5,54% соответственно.

Экспонирование Т-лимфоцитами CD25 указывает на их раннюю активацию. Синтез молекул CD25 производится преимущественно активированными Т-лимфоцитами, в меньшей степени В-клетками. Анализ динамики экспонирования маркера ранней активации лимфоцитов – рецептора интерлейкина II – в процессе развития вакцинального иммунного ответа позволил установить, что при стимуляции Т-клеток бруцеллином интенсивность экспрессии CD25, рассчитанная по КС, имела достаточно низкие уровни: на 7 сутки – 13,7±3,69%, 14 сутки – 10,2±3,5%, на 21 сутки уменьшилась до контрольных значений – 8,9±1,78% и к 30 суткам составила в среднем 9,66±3,67%. Активность синтеза IL-2га Т-лимфоцитами у иммунизированных животных при стимуляции экспериментальным бруцеллезным антигеном существенно отличалась от данных контрольных биомоделей и при использовании бруцеллезного аллергена. Так, на 7 сутки после иммунизации количество CD25-позитивных Т-лимфоцитов после активации БрАг увеличилось в среднем до 36,47±14,15%, 14 сутки – 59,97±4,42%, 21 сутки – 53,93±13,47%, 30 сутки – 53,26±6,13% соответственно (рис. 1).

Экспрессия лимфоцитами антигенов главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex) – МНС класса II – ассоциирована не только с поздней, но и длительной активацией лимфоцитов. При *in vitro* стимуляции Т-лимфоцитов бруцеллином интенсивность экспрессии молекул МНС II, рассчитанная по КС, составила в среднем на 7 сутки – 6,59±2,05%, 14 сутки – 5,32±1,07%, 21 сутки – 8,18±2,95% и 30 сутки – 7,72±2,73%. При использовании БрАг в антиген-стимулированном клеточном тесте *in vitro* установлено, что на 7 сутки активность экспонирования Т-лимфоцитами антигенов МНС II увеличилась до 31,97±3,25% на 14, 21 и 30 сутки составила, соответственно, 23,7±1,73, 16,40±1,91 и 61,84±4,37% (рис. 2).

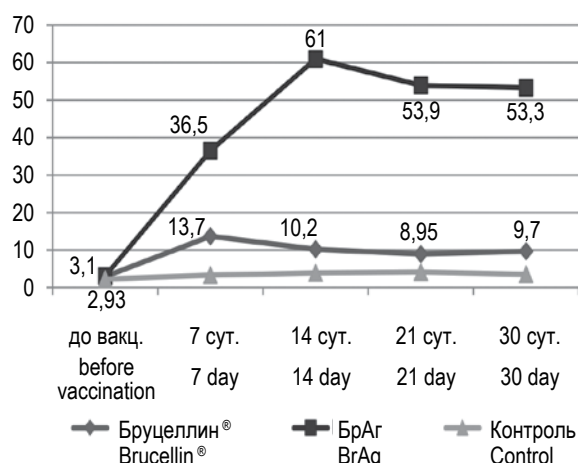


Рисунок 1. Значения интенсивности (коэффициент стимуляции) экспрессии Т-лимфоцитами рецепторов CD25 в группах сравнения до вакцинации и на 7-30 сутки после иммунизации

Figure 1. Intensity values (stimulation factor) of CD25 T lymphocyte expression in comparison groups before vaccination and 7-30 days after immunization

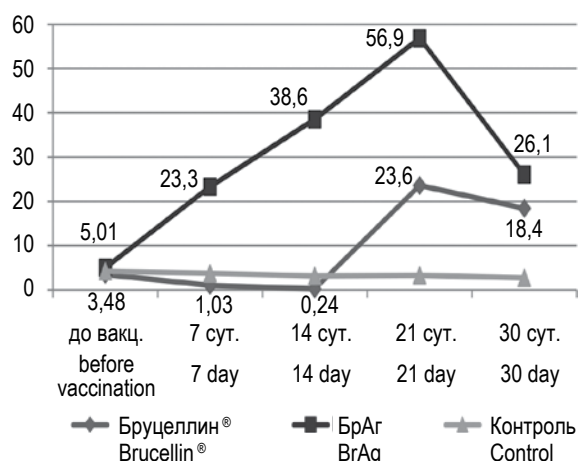


Рисунок 3. Значения интенсивности (коэффициент стимуляции) экспрессии Т-лимфоцитами рецепторов CD95 в группах сравнения до вакцинации и на 7-30 сутки после иммунизации

Figure 3. Intensity values (stimulation factor) of CD95 T lymphocyte expression in comparison groups before vaccination and 7-30 days after immunization

Анализ экспрессии Т-лимфоцитами рецептора индукции апоптоза — CD95, маркера «поздней» и «негативной» активации клеток, показал, что при использовании аллергена бруцеллина для *in vitro* активации значения экспрессии Т-лимфоцитами CD95 на 7 и 14 сутки после иммунизации были ниже уровня контрольных данных — $1,03 \pm 0,30$ и $0,24 \pm 0,06\%$ соответственно, на 21 и 30 сутки после иммунизации — соответственно, $23,59 \pm 2,54$ и $18,44 \pm 2,87\%$. При исполь-

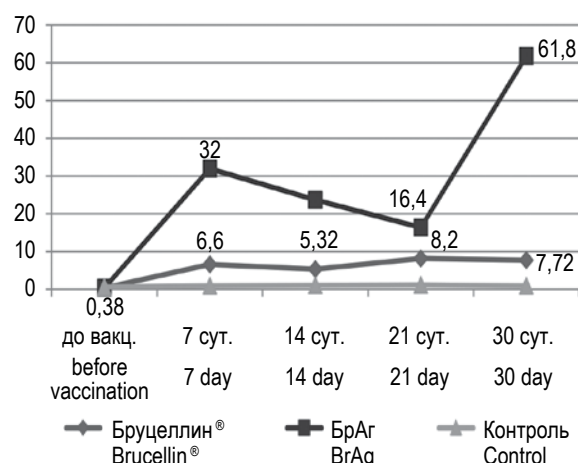


Рисунок 2. Значения интенсивности (коэффициент стимуляции) экспрессии Т-лимфоцитами рецепторов MHC II в группах сравнения до вакцинации и на 7-30 сутки после иммунизации

Figure 2. Intensity values (stimulation factor) of T lymphocyte expression of MHC II receptors in comparison groups before vaccination and 7-30 days after immunization

зовании BrAg в качестве специфического антигена бруцелл интенсивность экспонирования Т-лимфоцитами молекул индукции апоптоза составила на 7 сутки $23,26 \pm 3,55\%$, 14 сутки — $38,59 \pm 4,18\%$, 21 сутки — $56,87 \pm 2,81\%$ и 30 сутки — $26,13 \pm 6,89\%$. Поскольку апоптоз при этом выступает в качестве процесса, альтернативного пролиферации, их соотношение может служить мерой результативности ответа клеток на активирующие сигналы (негативная активации) (рис. 3).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что разработанный в ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора белково-полисахаридный антигенный комплекс на основе штамма *Brucella abortus* 19 BA не вызывает неспецифических реакций (неспецифической активации) Т-лимфоцитов *in vitro*, обладает выраженной специфической активностью в условиях *in vitro*.

Анализ применения экспериментального бруцеллезного антигена, для постановки антиген-стимулированных клеточных реакций *in vitro*, с целью оценки формирования поствакцинального иммунитета против бруцеллеза показал, что использование BrAg способствует повышению чувствительности (в эксперименте) клеточных реакций *in vitro*. Полученный экспериментальный антиген имеет реальную перспективу применения при разработке алгоритмов лабораторной диагностики бруцеллеза и оценки фактической привитости контингентов риска после вакцинации против бруцеллеза.

Список литературы / References

1. Вершилова П.А., Чернышева М.И., Князева Э.Н. Патогенез и иммунология бруцеллеза. М.: Медицина, 1974. 272 с. [Vershilova P.A., Chernysheva M.I., Knyazeva E.N. Pathogenesis and immunology of brucellosis]. Moscow: Medicine, 1974. 272 p.
2. Дармов И.В., Елагин Г.Д., Богачева Н.В., Крючков А.В., Тихвинская О.В. Современные лабораторные методы оценки эффективности проведения иммунизации против опасных и особо опасных инфекций // Клиническая лабораторная диагностика, 2011. № 6. С. 39-42. [Darmov I.V., Elagin G.D., Bogacheva N.V., Kryuchkov A.V., Tikhvinskaya O.V. Modern laboratory methods for assessing the effectiveness of immunization against dangerous and especially dangerous infections. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2011, no. 6, pp. 39-42. (In Russ.)]
3. Куличенко А.Н., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Костюченко М.В. Использование антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета // Инфекция и иммунитет, 2017. Т. 7, № 2. С. 203-208. [Kulichenko A.N., Abzaeva N.V., Gostischeva S.E., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Kostuchenko M.V. The antigen-specific cell *in vitro* tests for post-vaccination antiplague immunity formation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 2, pp. 203-208. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-203-208.
4. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 7-26. [Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhonevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Kaigorodova E.V., Goncharov A.G. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 7-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-7-26.
5. Паттерсон Р., Греммер Л., Гринбергер П. Аллергические болезни. Москва, ГЭОТАР-Медицина, 2000. 768 с. [Patterson R., Gremmer L., Grinberger P. Allergic diseases]. Moscow: GEOTAR-Medicine, 2000. 768 p.
6. Пономаренко Д.Г. Новый подход к комплексной оценке иммуно-биологической реактивности контингента, подлежащего вакцинации (ревакцинации) против бруцеллеза // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы, 2015. № 3. С. 28-31. [Ponomarenko D.G. A new approach to a comprehensive assessment of the immuno-biological reactivity of a contingent subject to vaccination (revaccination) against brucellosis. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktualnye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Topical Issues*, 2015, no. 3, pp. 28-31. (In Russ.)]
7. Профилактика бруцеллеза. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.2613-10. [Prevention of brucellosis. Sanitary-epidemiological rules of the joint venture 3.1.7.2613-10].
8. Сомова Л.М., Беседина Н.Н., Плехова Н.Г. Апоптоз и инфекционные болезни // Инфекция и иммунитет, 2014. Т. 4, № 4. С. 303-318. [Somova L.M., Besednova N.N., Plekhova N.G. Apoptosis and infectious diseases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, Vol. 4, no. 4, pp. 303-318. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-303-318.
9. Таран И.Ф., Лямкин Г.И. Бруцеллез (микробиология, иммунология, эпидемиология, профилактика). Ставрополь, 1996. 173 с. [Taran I.F., Lyamkin G.I. Brucellosis (microbiology, immunology, epidemiology, prevention)]. Stavropol, 1996. 173 p.
10. Урбах В.Ю. Биометрические методы. М.: Наука, 1964. 410 с. [Urbach V.Yu. Biometric methods]. Moscow: Science, 1964. 410 p.
11. Фирстова В.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Зырина Е.В., Иванов С.А., Киселева Н.В., Копылов П.Х., Анисимов А.П., Дятлов И.А. Определение экспрессии маркера ранней активации CD69 на лимфоцитах иммунных мышей после стимуляции их антигенами чумного микроба // Проблемы особо опасных инфекций, 2010. № 103. С. 56-59. [Firstova V.V., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Zyrina E.V., Ivanov S.A., Kiseleva N.V., Kopylov P.Kh., Anisimov A.P., Dyatlov I.A. Determination of the expression of the marker of early activation of CD69 on the lymphocytes of immune mice after stimulation with antigens of the plague microbe. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Especially Dangerous Infections*, 2010, no. 103, pp. 56-59. (In Russ.)]
12. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica Chimica Acta*, 2012, Vol. 413, pp. 1338-1349.

Авторы:

Костюченко М.В. — биолог сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Ракитина Е.Л. — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Authors:

Kostyuchenko M.V., Biologist, Sector of Immunology and Pathomorphology of Highly Dangerous Infections, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Rakitina E.L., PhD (Medicine), Doctor for Clinical Laboratory Diagnostics, Sector of Immunology and Pathomorphology of Highly Dangerous Infections, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Пономаренко Д.Г. — к.б.н., заведующий лабораторией бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Логвиненко О.В. — к.б.н., заведующая сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Курчева С.А. — к.б.н., заведующая научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Бердникова Т.В. — биолог лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Русанова Д.В. — к.м.н., врач-бактериолог лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Куличенко А.Н. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Ponomarenko D.G., PhD (Biology), Head, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Logvinenko O.V., PhD (Biology), Head, Sector of Immunology and Pathomorphology of Highly Dangerous Infections, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Kurcheva S.A., PhD (Biology), Head, Research and Production Laboratory of Diagnostic Preparations for Highly Dangerous and other infections, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Berdnikova T.V., Biologist, Brucellosis Laboratory, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Rusanova D.V., PhD (Medicine), Bacteriologist, Brucellosis Laboratory, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Kulichenko A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Поступила 31.08.2018
Отправлена на доработку 19.09.2018
Принята к печати 12.10.2018

Received 31.08.2018
Revision received 19.09.2018
Accepted 12.10.2018

ПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ НОВОЙ СУБЪЕДИНИЧНОЙ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ В СОЧЕТАНИИ С BCG СВЯЗАН С ТОРМОЖЕНИЕМ ДИССЕМИНАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ

Еремеев В.В.¹, Шепелькова Г.С.¹, Духовлинов И.В.², Гергерт В.Я.¹

¹ ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. С 1924 года вакцина БЦЖ защищает детей от наиболее тяжелых форм туберкулеза. В то же время защитный эффект BCG у взрослого населения не прослеживается. Возможности применения живой вакцины для ревакцинации дополнительно ограничены быстрым распространением инфекции ВИЧ. Рано секретируемые белки микобактерии туберкулеза широко применялись для конструирования новых противотуберкулезных вакцин, поскольку характеризуются высокой иммуногенностью и способностью защищать от ТБ в экспериментальных моделях. Целью настоящего исследования было изучение эффективности применения нового субъединичного вакцинного препарата для повышения устойчивости экспериментальных животных к ТБ путем ревакцинации после первичной иммунизации BCG. Тестируемая вакцина представляла собой сочетание химерного белка на основе Ag85B-TB10.4-FlhC и плазмидной ДНК, кодирующей антиген Ag85A. Оценку эффективности буст-вакцинации проводили на модели аэрозольного заражения вакцинированных только BCG или BCG с последующей ревакцинацией тестируемой вакциной, а также интактных лабораторных мышей линии C57BL/6 вирулентным лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv по результатам определения высеваемости микобактерий из органов и продолжительности жизни животных после заражения. Было показано, что дополнительная буст-вакцинация исследуемой вакциной, по сравнению с обычной вакцинацией BCG, приводит к усилению торможения диссеминации микобактерий из очага инфицирования и существенному продлению жизни зараженных животных.

Ключевые слова: туберкулез, вакцина, БЦЖ, ревакцинация

PROTECTIVE EFFECT INDUCED BY THE NEW SUBUNIT TUBERCULOSIS VACCINE WHEN USED AS A BCG BOOST IS ASSOCIATED WITH INHIBITION OF MYCOBACTERIAL DISSEMINATION

Yeremeev V.V.^a, Shepelkova G.S.^a, Dukhovlinov I.V.^b, Gergert V.Ya.^a

^a Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Since 1924, BCG vaccine is used to protect children from the most severe forms of tuberculosis. At the same time, the protective effect of BCG in adults is variable. The potential for revaccination with live

Адрес для переписки:

Еремеев Владимир Витальевич
ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
E-mail: yeremeev56@mail.ru

Address for correspondence:

Yeremeev Vladimir V.
Central Research Institute for Tuberculosis
107564, Russian Federation, Moscow, Yauza all., 2.
Phone: 7 (499) 785-90-72.
E-mail: yeremeev56@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Еремеев, Г.С. Шепелькова, И.В. Духовлинов, В.Я. Гергерт «Протективный эффект новой субъединичной противотуберкулезной вакцины при применении в сочетании с BCG связан с торможением диссеминации микобактерий» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 555-558.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-555-558
© Еремеев В.В. и соавт., 2019

For citation:

V.V. Yeremeev, G.S. Shepelkova, I.V. Dukhovlinov, V.Ya. Gergert "Protective effect induced by the new subunit tuberculosis vaccine when used as a BCG boost is associated with inhibition of mycobacterial dissemination", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 555-558.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-555-558
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-555-558

vaccine is further limited by the rapid spread of HIV infection. The early-secreted *Mycobacterium tuberculosis* proteins have been used extensively in TB vaccine development, due to their high immunogenicity and have shown protective effect in animal models. The aim of our study was to evaluate the opportunity to increase the anti-TB resistance in experimental animals by re-vaccination with a new subunit vaccine preparation following primary immunization with BCG. To perform such boost vaccination, we used a combination of the Ag85B-TB10.4-FliC chimeric protein, and the plasmid DNA encoding Ag85A antigen. Efficiency of the boost vaccination was evaluated in a model of *M. tuberculosis* H37Rv aerosol infection of C57BL / 6 laboratory mice, either in the intact animals, or those vaccinated with BCG only, or BCG followed by revaccination with the test vaccine. The data concerning mycobacteria outgrowth from the organs, and life-span of animals after infection were subject to comparative analysis. We have demonstrated that additional boost vaccination with the vaccine under study, as compared with conventional BCG vaccination, leads to further inhibition of mycobacteria dissemination from the site of infection, and significantly prolonged survival of infected animals.

Keywords: tuberculosis, vaccine, BCG, boost immunization

Введение

Широко применяемая для профилактики туберкулеза (ТБ) вакцина BCG отличается от вирулентных штаммов *Mycobacterium bovis* и *M. tuberculosis* (Mtb) отсутствием локуса *esx-1*, кодирующего так называемые рано секретируемые белки. Тем самым у BCG нарушена способность выходить из фагосомы в цитозоль фагоцита и стимулировать гибель клетки с последующим поглощением материала антигенпрезентирующими клетками [3]. Как следствие, вакцина лишена возможности активировать локализованные в цитозоле распознающие компоненты иммунной системы, потенциально способные участвовать в формировании протективного иммунного ответа. Очевидно, что в варианте Mtb некоторые из этих белков являются факторами вирулентности, обуславливающими чрезмерное воспаление и гранулемообразование, нарушающими тонкий баланс между защитной реакцией и патологией. В экспериментах на иммунодефицитных мышах было показано, что BCG, экспрессирующая ESX-1 из *M. marinum*, менее вирулентна по сравнению с самой Mtb и с BCG, экспрессирующей ESX-1 из Mtb, но по своим протективным свойствам превосходит обычную BCG [4]. Дополнительным аргументом для включения рано секретируемых белков в состав противотуберкулезной вакцины служит наблюдение о существенном вкладе ESAT-6-зависимого иммунного ответа, опосредованного индуцированными через цепочку NLRP3-инфламасома-IL-18 антиген-неспецифическими, IFN γ -продуцирующими CD8⁺Т-клетками, в защиту от заражения Mtb [5].

На протяжении ряда лет в нашем институте продолжается изучение протективных свойств новой субъединичной противотуберкулезной вакцины на основе Ag85B-TB10.4-FliC и плазмидной ДНК, кодирующей антиген Ag85A Mtb. В предварительном исследовании в нашей лаборатории на модели заражения лабораторных мышей относительно резистентной к туберкулезу линии C57BL/6 вирулентным лабораторным штаммом Mtb H37Rv, по результатам определе-

ния высеваемости бактерий из органов и продолжительности жизни животных после заражения, была продемонстрирована высокая (сравнимая с BCG Russia) протективная активность трех субъединичных вакцинных препаратов [1]. В последующем в той же модели для наиболее эффективного из этих препаратов было продемонстрировано длительное (до 10 месяцев после вакцинации) сохранение иммунологической памяти к бактериальному антигену [2]. **Целью настоящего исследования** было изучение эффективности применения нового вакцинного препарата для повышения устойчивости экспериментальных животных к ТБ путем ревакцинации после первичной иммунизации BCG.

Материалы и методы

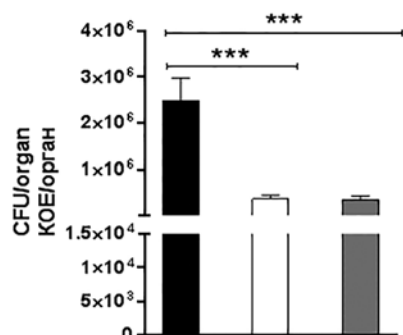
Эксперименты были проведены на самках мышей линии C57BL/6JCit (B6), содержащимися в виварии ФГБНУ «ЦНИИТ» в стандартных условиях. Условия содержания мышей и порядок проведения экспериментов были определены нормами приказа № 755 МЗ РФ. Возраст животных к началу проведения эксперимента составлял не менее 2-3 мес.

Тестируемая вакцина представляла собой сочетание вариантов химерного белка на основе Ag85B-TB10.4-FliC и плазмидной ДНК, кодирующей антиген Ag85A Mtb. Химерный белок Ag85B-TB10.4-FliC получали с использованием штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21, трансформированного векторной плазмидой pet28a-Ag85B-TB10.4-FliC. Плазмидную ДНК получали с использованием штамма *Escherichia coli* DH10/B, трансформированного векторной плазмидой pEXag85A [1].

2 группы мышей по 20 животных в каждой были подкожно провакцинированы 10^{е5} КОЕ живой вакцины BCG (штамм Russia).

Через 6 недель мышам одной из групп внутримышечно ввели 10 мкг вакцины, конъюгированной с 200 мкл гидроокиси алюминия (буст). Мышам контрольной группы внутримышечно ввели 200 мкл гидроокиси алюминия (контроль BCG).

А (A)



Б (B)

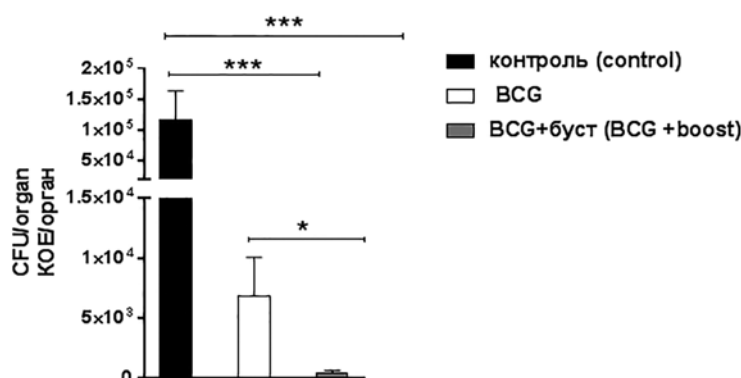


Рисунок 1. Высеваемость микобактерий туберкулеза из легких (А) и селезенки (Б) у мышей В6, вакцинированных BCG или BCG в сочетании с бустом через 3 недели после заражения

Figure 1. Isolation rates for *M. tuberculosis* from lungs (A) and spleen (B) of B6 mice immunized with BCG vaccine or BCG vaccine and boost following 3 weeks after MBT infection

Через 4 недели после последней вакцинации мыши были аэрозольно заражены вирулентным лабораторным штаммом *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv в дозе 600 КОЕ на мыш. Контроль дозы заражения осуществлялся путем посева гомогената легких 5 контрольных мышей на агар Дюбо через 24 часа после заражения. Контрольную группу составляли 20 соответствующих по возрасту мышей, не вакцинированных BCG и не получивших буст-инъекции.

Через 4 недели после заражения у 5 мышей из каждой группы после умерщвления цервикальной дислокацией забирали селезенку и легкие. Полученные органы гомогенизировали, получали серийные разведения в стерильном PBS и высевали на агар Дюбо. Растущие колонии подсчитывали визуально под микроскопом через 3 недели после посева.

Оставшиеся 15 мышей каждой группы использовали для определения среднего срока выживания после заражения.

Результаты и обсуждение

Результаты определения высеваемости микобактерий из органов мышей через 4 недели после заражения приведены на рисунке 1. В то время как вакцинация BCG, вне зависимости от буста субъединичной вакциной, эффективно снижает бактериальную нагрузку в легких (рис. 1А), применение BCG без дополнительной иммунизации в существенно меньшей степени способно притормаживать диссеминацию инфекции из легких в селезенку (рис. 1Б).

Динамика гибели мышей после заражения вирулентным штаммом Mtb представлена на рисунке 2. Сравнение кривых гибели мышей после заражения свидетельствует о положительном влиянии буст-иммунизации субъединичной вакциной на продолжительность жизни инфицированных мышей. К 343-му дню после заражения

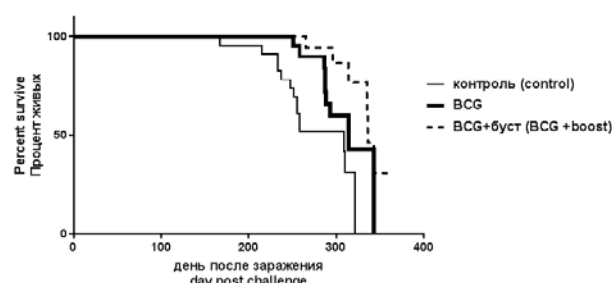


Рисунок 2. Динамика гибели зараженных вирулентными микобактериями мышей, предварительно вакцинированных BCG или BCG с бустом

Figure 2. Survival dynamics of mice infected with virulent mycobacteria, following pre-immunization with BCG vaccine or BCG vaccine and boost

все мыши в контрольных группах пали, в то время как в группе, получившей буст субъединичной вакциной, в живых оставались 5 животных (33%). Статистический анализ кривых гибели вакцинированных животных показал высокую достоверность различий ($p = 0,0009$ по Gehan–Breslow–Wilcoxon) между вакцинированными мышами и вакцинированными мышами, получившими буст.

Ключевым вопросом исследования и усовершенствования новой вакцины является подбор антигенов для включения в ее состав. За последнее десятилетие получила дальнейшее развитие концепция об определенных фазах роста Mtb, связанных с периодами репликации, персистенции и дормантности микобактерий [6]. К ассоциированным со стадией активного размножения бактерий антигенам относятся рано секретируемые белки, такие как семейство Ag85, ESAT-6 и CFP-10. Эти антигены широко применялись для конструирования новых противотуберкулезных вакцин и характеризуются высокой имму-

ногенностью и способностью защищать от ТБ в экспериментальных моделях.

Наряду с антигенами рано секретируемых белков микобактерий, в состав изучаемой нами вакцины входил участок белка FliC, способный взаимодействовать с TLR5, запуская процесс созревания макрофагов и дендритных клеток. Кроме того, в последовательность входящего в состав вакцины плазмидного вектора были встроены дополнительные CpG мотивы, также способные активировать ряд компонентов врожденного иммунитета [1].

Таким образом, в использованной нами модели экспериментального ТБ буст-стимуляция

специфической и врожденной составляющих иммунного ответа не привела к дополнительному (по сравнению с BCG) торможению репликации Mtb в очаге инфекции. В то же время буст-иммунизация способствует снижению интенсивности воспалительных реакций в легких инфицированных мышей, препятствует разрушению инфицированных клеток легкого и тем самым тормозит диссеминацию Mtb из очага заражения. В результате в нашей модели использование дополнительной иммунизации субъединичной вакциной позволяет существенно повысить протективные свойства вакцины BCG.

Список литературы / References

1. Еремеев В.В., Духовлинов И.В., Орлов А.И., Маленко А.Ф., Федорова Е.А., Балазовский М.Б., Гергерт В.Я. Исследование протективных свойств вакцинного препарата на основе рекомбинантных белков Ag85, TB10 и FliC // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 197-202. [Yeremeev V.V., Dukhovlinov I.V., Orlov A.I., Malenko A.F., Fedorova E.A., Balazovsky M.B., Gergert V.Ya. Studies on protective effects of a vaccine, based on recombinant Ag85, TB10 and FliC proteins. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 197-202. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2017-2-197-202.
2. Еремеев В.В., Духовлинов И.В., Орлов А.И., Шепелькова Г.С., Федорова Е.А., Балазовский М.Б., Гергерт В.Я. Изучение продолжительности иммунного ответа, индуцированного вакциной на основе рекомбинантных белков Ag85, TB10 и FliC // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 271-276. [Yeremeev V.V., Dukhovlinov I.V., Orlov A.I., Shepelkova G.S., Fedorova E.A., Balazovsky M.B., Gergert V.Ya. Duration of immune response induced by the vaccine based on recombinant Ag85, TB10 and FliC proteins. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 271-276. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-271-276.
3. Gröschel M.I., Sayes F., Simeone R., Majlessi L., Brosch R. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2016, Vol. 14, no. 11, pp. 677-691.
4. Gröschel M.I., Sayes F., Shin S.J., Frigui W., Pawlik A., Orgeur M., Canetti R., Honoré N., Simeone R., van der Werf T.S., Bitter W., Cho S.N., Majlessi L., Brosch R. Recombinant BCG expressing ESX-1 of *Mycobacterium marinum* combines low virulence with cytosolic immune signaling and improved TB protection. *Cell Rep.*, 2017, Vol. 18, no. 11, pp. 2752-2765.
5. Kupz A., Zedler U., Stäber M., Perdomo C., Dorhoi A., Brosch R., Kaufmann S.H. ESAT-6-dependent cytosolic pattern recognition drives noncognate tuberculosis control *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 2016, Vol. 126, no. 6, pp. 2109-2122.
6. Schubert O.T., Ludwig C., Kogadeeva M., Zimmermann M., Rosenberger G., Gengenbacher M., Gillet L.C., Collins B.C., Röst H.L., Kaufmann S.H., Sauer U., Aebbersold R. Absolute proteome composition and dynamics during dormancy and resuscitation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Host Microbe*, 2015, Vol. 18, no. 1, pp. 96-108.

Авторы:

Еремеев В.В. — д.м.н., заведующий лабораторией клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Шепелькова Г.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лабораторией клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Духовлинов И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Гергерт В.Я. — д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Authors:

Yeremeev V.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory for Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Shepelkova G.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory for Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Gergert V.Ya., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Immunology Department, Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Поступила 02.11.2018

Отправлена на доработку 19.11.2018

Принята к печати 25.12.2018

Received 02.11.2018

Revision received 19.11.2018

Accepted 25.12.2018

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ГИПОКСИИ И ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ ПРИ ЭРОЗИВНО- ЯЗВЕННЫХ ПОРАЖЕНИЯХ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ В УСЛОВИЯХ КОМОРБИДНОЙ ПАТОЛОГИИ

**Полозова Э.И., Мосина Л.М., Новикова Л.В., Трохина И.Е.,
Капкаева Р.Х.**

*Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск,
Республика Мордовия, Россия*

Резюме. Целью работы явилась оценка роли иммунологических нарушений, гипоксии и липопероксидации в развитии и прогрессировании эрозивно-язвенных поражений двенадцатиперстной кишки на фоне хронического нарушения мозгового кровообращения. Проведены исследования 125 пациентов с эрозивно-язвенными поражениями двенадцатиперстной кишки, ассоциированными с хроническим нарушением мозгового кровообращения, в возрасте от 48 до 74 лет, находившихся на амбулаторном лечении в ГБУЗ РМ «РКБ № 5» г. Саранска в 2015-2018 гг. Группу сравнения составили 39 пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения, не имеющих на момент исследования эрозивно-язвенных поражений желудка и двенадцатиперстной кишки. Пациентам проводилась классическая противоязвенная терапия в течение 14 дней. Оценивали цитокиновый профиль, показатели гипоксии и перекисного окисления липидов в сыворотке крови. Проведенные исследования показали, что при эрозивно-язвенных поражениях двенадцатиперстной кишки, в ассоциации с хроническим нарушением мозгового кровообращения на протяжении всего срока наблюдения имело место повышение уровня про- и противовоспалительных цитокинов, что указывает на формирование дисбаланса в иммунорегуляторной системе. Наблюдалось развитие гипоксических изменений в плазме крови, что подтверждалось ростом содержания молочной и пировиноградной кислот, а также коэффициента гипоксии на всех этапах наблюдения. В условиях формирования данной патологии происходит также активация процессов перекисного окисления липидов, что подтверждается ростом содержания диеновых конъюгатов, триеновых конъюгатов и уровня малонового диальдегида при поступлении, на 7-е и 14-е сутки наблюдения и снижением антиоксидантного потенциала плазмы крови, оцененного показателем супероксиддисмутазы. Только к 30-м суткам наблюдения имела место тенденция к снижению показателей диеновых конъюгатов, триеновых конъюгатов, малонового диальдегида и повышению уровня супероксиддисмутазы. Гипоксия и перекисное окисление липидов выступают в качестве предикторов хронического воспаления. В патогенезе эрозивно-язвенных поражений двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с хроническим нарушением мозгового кровообращения, существенное значение имеет формирование дисбаланса про-

Адрес для переписки:

Полозова Элла Ивановна
Национальный исследовательский Мордовский
государственный университет имени Н.П. Огарева
430000, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск,
ул. Димитрова, 35, кв. 67.
Тел.: 8 (927) 174-05-31.
E-mail: ellanac78@mail.ru

Address for correspondence:

Polozova Ella I.
Ogarev Mordovia State University
430000, Russian Federation, Republic of Mordovia, Saransk,
Dimitrova str., 35, apt 67.
Phone: 7 (927) 174-05-31.
E-mail: ellanac78@mail.ru

Образец цитирования:

Э.И. Полозова, Л.М. Мосина, Л.В. Новикова,
И.Е. Трохина, Р.Х. Капкаева «Взаимосвязь
иммунологических нарушений, гипоксии
и липопероксидации при эрозивно-язвенных поражениях
двенадцатиперстной кишки в условиях коморбидной
патологии» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21,
№ 3. С. 559-566. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-559-566
© Полозова Э.И. и соавт., 2019

For citation:

E.I. Polozova, L.M. Mosina, L.V. Novikova, I.E. Trokhina,
R.Kh. Kapkaeva "A relationship between immunological
disturbances, hypoxia and lipoperoxidation in erosive/ulcerous
lesions of duodenum in presence of comorbidities", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019,
Vol. 21, no. 3, pp. 559-566.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-559-566
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-559-566

воспалительных и противовоспалительных цитокинов и хроническая гипоксия. При таких условиях наблюдается окислительный стресс со смещением равновесия в сторону прооксидантов, истощаются возможности антиоксидантной системы защиты. В совокупности эти нарушения определяют патогенетические механизмы повреждения, возникающие при эрозивно-язвенных поражениях двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с хроническим нарушением мозгового кровообращения, которые оказывают взаимоотягощающее влияние при прогрессировании заболевания.

Ключевые слова: эрозивно-язвенные поражения, двенадцатиперстная кишка, патогенез, цитокиновый дисбаланс, гипоксия, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, хроническое нарушение мозгового кровообращения

A RELATIONSHIP BETWEEN IMMUNOLOGICAL DISTURBANCES, HYPOXIA AND LIPOPEROXIDATION IN EROSION/ULCEROUS LESIONS OF DUODENUM IN PRESENCE OF COMORBIDITIES

Polozova E.I., Mosina L.M., Novikova L.V., Trokhina I.E.,
Kapkaeva R.Kh.

Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Abstract. The aim of present work was to assess the role of immunological disorders, hypoxia and lipoperoxidation in development and progression of erosive/ulcerative lesions of duodenum accompanied by chronic cerebrovascular insufficiency. We have studied a cohort of 125 patients with erosive and ulcerative lesions of duodenum associated with chronic disorders of cerebral circulation, aged from 48 to 74 years old. They underwent outpatient treatment and care at the Clinical Hospital No.5 (Saransk) over 2015-2018. A comparison group consisted of 39 patients with chronically impaired cerebral circulation, who did not show signs of erosive/ulcerative lesions of stomach and duodenum over the study period. Patients received conventional anti-ulcer therapies for 14 days. The cytokine profile, indexes of hypoxia, and serum markers of lipid peroxidation were evaluated. The study has shown an increase in the level of pro- and anti-inflammatory cytokines in cases with erosive/ulcerative duodenal lesions associated with chronic impairment of cerebral circulation throughout the observation period, thus indicating to evolving imbalance of immunoregulatory system. The development of hypoxic changes in the blood plasma was observed, which was confirmed by increased contents of lactic and pyruvic acids, like as the hypoxia coefficient at all the observation terms. The lipid peroxidation processes were also activated in the course of evolving disorder, as judged by increased contents of diene conjugates, triene conjugates and the malonic dialdehyde levels upon admission, as well as on day 7 and 14 of observation, associated with decrease in the antioxidant potential of blood plasma, estimated by the superoxide dismutase index. A trend for a decrease in the indexes of diene conjugates, triene conjugates, malonic dialdehyde and an increased levels of superoxide dismutase was registered as late as after 30 days of observation. Hypoxia and lipid peroxidation may be viewed as predictors of chronic inflammation. Developing imbalance between pro-inflammatory, anti-inflammatory cytokines, and chronic hypoxia are of significant value for pathogenesis of erosive-ulcerative lesions of duodenum, being associated with chronic impairment of cerebral circulation. Under such conditions, oxidative stress is observed, with a shift of equilibrium towards pro-oxidants, along with exhausted potential of antioxidant defense system. In general, these disturbances determine the pathogenetic mechanisms of damage that occur in erosive and ulcerative lesions of duodenum, being associated with chronic cerebrovascular insufficiency, which have a mutually negative influence in the course of disease progression.

Keywords: erosive/ulcerative lesions, duodenum, pathogenesis, cytokine imbalance, hypoxia, lipid peroxidation, antioxidant system, chronic cerebrovascular insufficiency

Введение

Эрозивно-язвенные поражения слизистой оболочки желудка (СОЖ) и двенадцатиперстной кишки (ДПК) выступают одной из наиболее часто выявляемых патологий гастродуоденальной зоны. В настоящее время интерес к проблеме эрозивно-язвенных поражений СОЖ и ДПК существенно возрос [1, 3, 4]. Данное патологическое состояние, особенно среди пациентов старших возрастных групп, представляет типичный пример формирования коморбидной патологии, в числе которой нередко наблюдается хроническое нарушение мозгового кровообращения (ХНМК).

На современном этапе этиопатогенез эрозивно-язвенных поражений СОЖ и ДПК рассматривается с позиций мультифакториальности. В настоящее время, как известно, ведущей теорией, объясняющей патогенез эрозивно-язвенных поражений желудка и ДПК, является несоответствие факторов кислотно-пептической агрессии желудочного сока защитным возможностям СОЖ и ДПК [1, 2, 6, 8]. При этом также высока роль иммунных нарушений в патогенезе эрозивно-язвенных поражений желудка и ДПК [5].

Одним из широко распространенных патологических состояний, которое составляет основу в формировании функциональных и метаболических нарушений при гастроэнтерологической патологии, в том числе и эрозивно-язвенных поражениях ДПК, выступает гипоксия. Выраженность данных нарушений зависит от длительности, интенсивности и, безусловно, тяжести воздействия. Гипоксия, как патологический процесс, запускает целый ряд биохимических изменений, направленных, в свою очередь, на стабилизацию гемостаза поврежденного органа и организма в целом [7]. Главной мишенью поражения при гипоксии является энергетический обмен. Энергодефицит активирует перекисное окисление липидов (ПОЛ), которое в свою очередь приводит к изменениям всех биологических функций мембран иммунноцитов. Гипоксические воздействия способствуют выработке большого количества провоспалительных цитокинов, они принимают участие в формировании механизмов адаптации к гипоксии. Цитокины выполняют главную роль в ответной реакции организма на стрессорные воздействия и в иммунном ответе. Имеются данные, что через активацию выработки цитокинов, гипоксия становится предиктором хронического воспаления, и регулирует защитные реакции организма на стресс [5, 7].

Огромное значение играет регионарный кровоток, снижение которого, неизбежно приводит к нарушению структурной целостности СОЖ и ДПК и развитию тканевой гипоксии. Поэтому

изучение формирования гипоксических нарушений на системном уровне при эрозивно-язвенных поражениях ДПК, в ассоциации с ХНМК, во взаимосвязи с изменениями, формируемыми в антиоксидантно-прооксидантной системе и цитокиновом профиле, имеет большой практический интерес.

Целью исследования явилась оценка роли иммунологических нарушений, гипоксии и липопероксидации в развитии и прогрессировании эрозивно-язвенных поражений двенадцатиперстной кишки на фоне хронического нарушения мозгового кровообращения.

Материалы и методы

Работа базируется на клинических исследованиях 125 пациентов с эрозивно-язвенными поражениями ДПК, ассоциированными с ХНМК (II группа — основная), в возрасте от 48 до 74 лет, находившихся на амбулаторном лечении в ГБУЗ РМ «РКБ № 5» г. Саранска в 2015-2018 гг. Длительность заболевания составляла в среднем $8,2 \pm 1,3$ лет. Пациентам проводилась классическая противоязвенная терапия согласно рекомендациям Маастрихт IV и V в течение 14 дней, которая включала омепразол, амоксициллин, кларитромицин и де-нол. В группу сравнения входили 39 пациентов с ХНМК, не имевших эрозивно-язвенных поражений желудка и ДПК, проходивших профилактическое обследование и не получавших специфического лечения (I группа — сравнения).

Диагноз эрозивно-язвенных поражений ДПК был подтвержден результатами проведенных клинических, лабораторных и инструментальных методов исследования и устанавливался в соответствии со Стандартом оказания специализированной медицинской помощи при язвенной болезни желудка, ДПК (Приказ МЗ РФ от 9 ноября 2012 года N 773н). Диагноз ХНМК атеросклеротического генеза подтверждался клинически и определяемыми при проведении магнитно-резонансной томографии головного мозга очаговыми изменениями вещества головного мозга дисциркуляторного характера (томограф магнитный резонансный «Престиж-15», «МИП-Нано», Москва). У больных основной группы и группы сравнения диагностирована дисциркуляторная энцефалопатия I стадии.

Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева».

На иммуноферментном анализаторе (Personal Lab, Италия) методом твердофазного иммуноферментного анализа в сыворотке крови обследуемых определяли уровень цитокинов с применением наборов реагентов АО «Вектор-Бест»

в соответствии с приложенными инструкциями (г. Новосибирск), ВІОНІТ (Хельсинки, Финляндия), DRG (Германия).

Для оценки степени выраженности гипоксии в плазме крови определяли содержание пириновоеградной кислоты (ПВК) при проведении реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (Кушманова О.Д., Ивченко Г.М., 1983) и молочной кислоты (МК) по реакции с параоксидифенилом (Меньшиков В.В., 1987). Коэффициент гипоксии был определен по отношению количества МК к количеству ПВК.

Также проводилась оценка показателей, определяющих состояние ПОЛ и антиоксидантной защиты (АОЗ) в плазме крови. В работе определяли уровень диеновых (ДК) и триеновых (ТК) конъюгатов спектрофотометрическим методом при длине волны 232-233 нм (Ганстон Ф.Д., 1986); содержание спонтанного малонового диальдегида (МДА) — спектрофотометрическим методом в реакции с тиобарбитуровой кислотой (Егоров Д.Ю., Козлов А.В., 1988); активность супероксиддисмутазы (СОД) — в реакции с нитросиним тетразолием (Гуревич В.С. и др., 1990).

Оценку цитокинового профиля, показателей гипоксии, ПОЛ проводили при поступлении, на 7-е, 14-е и 30-е сутки. За показатели нормы приняты данные 35 здоровых добровольцев.

При поступлении пациентам основной группы проводилась КТ-ангиография брюшного отдела аорты и ее ветвей с оценкой желудочных ар-

терий (томограф рентгеновский компьютерный BRIGHTSPEED, ЗАО «Медицинские технологии Лтд»).

Полученные в ходе работы цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики. Применялся критерий t Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что у пациентов основной группы по данным эндоскопической диагностики определялись эрозивные и язвенные поражения ДПК. Все обследуемые пациенты, согласно проводимому исследованию — хеликпил-тесту, были инфицированы *Helicobacter pylori* во 2-й (59%) и 3-й (41%) степени уреазной активности. Размер язвенных дефектов варьировал от 7 до 12 мм. Средние размеры язвенных дефектов составили $9,17 \pm 0,95$ мм.

На первом этапе работы были оценены уровни цитокинов в плазме крови у больных эрозивно-язвенными поражениями ДПК на фоне ХНМК (табл. 1). При иммуноферментном анализе содержания цитокинов у обследованных больных при поступлении выявлялось наибольшее увеличение уровня провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 β (IL-1 β), IL-6, фактора некроза опухоли α (TNF α). Наблюдалось достоверное повышение концентрации противовоспалительного цитокина IL-10 на 85,3% ($p < 0,05$), что может быть ответом на гипоксию. Резкое его увеличение говорит об усилении компенса-

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ПРОВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ЭРОЗИВНО-ЯЗВЕННЫХ ПОРАЖЕНИЯХ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ ($M \pm m$)

TABLE 1. THE LEVEL OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN THE BLOOD SERUM WITH EROSION AND ULCERATIVE LESIONS OF THE DUODENUM AGAINST THE BACKGROUND OF CHRONIC CEREBROVASCULAR ACCIDENT ($M \pm m$)

Показатель Index	Норма Norm	Группы Groups	Этапы исследования Stages of research			
			При поступлении With admission	7-е сутки 7 th day	14-е сутки 14 th day	30-е сутки 30 th day
IL-1 β пг/мл pg/ml	11,00 $\pm$ 0,42	I	12,30 $\pm$ 0,36 ¹	11,70 $\pm$ 0,33	11,30 $\pm$ 0,31	10,80 $\pm$ 0,3
		II	16,97 $\pm$ 0,53 ^{1, 2}	18,43 $\pm$ 0,60 ^{1, 2}	15,15 $\pm$ 0,48 ^{1, 2}	14,05 $\pm$ 0,47 ^{1, 2}
IL-6, пг/мл pg/ml	6,40 $\pm$ 0,25	I	8,70 $\pm$ 0,29 ¹	8,30 $\pm$ 0,28 ¹	7,70 $\pm$ 0,29 ¹	6,60 $\pm$ 0,18
		II	12,07 $\pm$ 0,35 ^{1, 2}	11,15 $\pm$ 0,32 ^{1, 2}	9,77 $\pm$ 0,43 ^{1, 2}	7,70 $\pm$ 0,29 ¹
TNF α , пг/мл pg/ml	6,00 $\pm$ 0,22	I	10,15 $\pm$ 0,42 ¹	9,62 $\pm$ 0,42 ¹	7,76 $\pm$ 0,28 ¹	7,71 $\pm$ 0,29 ¹
		II	10,81 $\pm$ 0,31 ¹	11,02 $\pm$ 0,30 ^{1, 2}	9,73 $\pm$ 0,41 ^{1, 2}	8,29 $\pm$ 0,40 ¹

Примечание. ¹ — достоверность отличия по отношению к норме при $p < 0,05$; ² — достоверность отличия по отношению к данным группы сравнения при $p < 0,05$; I — группа сравнения, II — основная группа.

Note. ¹, reliability of difference with respect to the norm when $p < 0.05$; ², reliability of differences in relation to the data of the comparison group at $p < 0.05$; I, the comparison group, II, the main group.

торных иммунных противовоспалительных реакций как механизма адаптации к хронической гипоксии, возникающих при эрозивно-язвенном поражении. Также выявлялось повышение содержания IL-4 на 67,2% ($p < 0,05$), который обладает способностью ингибировать продукцию IL-1 β и TNF α . Была определена взаимосвязь между концентрацией IL-4 и IL-1 β ($p < 0,01$), IL-4 и TNF α ($p < 0,05$) в сыворотке крови больных с эрозивно-язвенным поражением ДПК.

На седьмые сутки содержание провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α имело дальнейшую тенденцию к повышению. Также было выявлено повышение уровня противовоспалительных цитокинов: IL-10 – на 53,1% ($p < 0,05$) и IL-4 – на 36,9% ($p < 0,05$).

К 14-м суткам наблюдалось снижение анализируемых показателей по сравнению с данными при поступлении. Однако уровень IL-1 β , IL-6 и TNF α в сравнении с нормой оставался повышенным. Также имело место некоторое увеличение концентрации IL-10 и IL-4: на 36,4% ($p < 0,05$) и 26,7% ($p < 0,05$) соответственно.

На 30-е сутки определилась четкая тенденция к снижению уровня всех анализируемых провоспалительных цитокинов, при этом он сохранялся повышенным по сравнению с нормой. Одновременно отмечалось увеличение количества IL-10 – на 44,8% ($p < 0,05$) и IL-4 – на 38,9% ($p < 0,05$).

При анализе цитокинового профиля плазмы крови больных группы сравнения отмечено, что концентрация IL-1 β по сравнению с нормой была выше на 11,8% ($p < 0,05$) только при посту-

плении и достоверно не отличалась от нормальных значений в последующие сроки наблюдения. На всех этапах исследования показатель имел достоверно более низкие значения, чем в основной группе. Уровень IL-6 при поступлении, на 7-е и 14-е сутки наблюдения превышал норму на 20,3-35,9% ($p < 0,05$) и был достоверно ниже данных основной группы. Показатель TNF α в группе сравнения на всех этапах исследования превышал норму на 28,5-69,2% ($p < 0,05$) и был достоверно ниже данных основной группы на 7-е и 14-е сутки исследования.

Динамика противовоспалительных цитокинов в обеих обследуемых группах характеризовалась достоверным ростом по сравнению с нормой при поступлении, на 7-е, 14-е и 30-е сутки исследования.

Системная гипоксия играет важную патогенетическую роль в возникновении расстройств энергообеспечивающих окислительно-восстановительных реакций. Как известно, концентрация лактата и пирувата существенно возрастает в условиях кислородной недостаточности. Поэтому степень гипоксии тканей можно оценивать в данном случае еще до появления гемодинамических и метаболических признаков кислородного дисбаланса, что подтверждает динамика содержания МК и ПВК в плазме крови, выявленная в наших исследованиях на следующем этапе работы (табл. 2).

При исследовании показателей гипоксии в плазме крови мы установили, что при эрозивно-язвенных поражениях ДПК на фоне ХНМК

ТАБЛИЦА 2. ЛАБОРАТОРНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГИПОКСИИ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ЭРОЗИВНО-ЯЗВЕННЫХ ПОРАЖЕНИЯХ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ ($M \pm m$)

TABLE 2. LABORATORY AND DIAGNOSTIC INDICATORS OF HYPOXIA IN BLOOD PLASMA IN EROSIIVE AND ULCERATIVE LESIONS OF THE DUODENUM AGAINST THE BACKGROUND OF CHRONIC CEREBROVASCULAR ACCIDENT ($M \pm m$)

Показатель Index	Норма Norm	Группы Groups	Этапы исследования Stages of research			
			При поступлении With admission	7-е сутки 7 th day	14-е сутки 14 th day	30-е сутки 30 th day
МК, ммоль/г белка LA, mmol/g protein	1,22 $\pm$ 0,06	I	1,79 $\pm$ 0,07 ¹	1,83 $\pm$ 0,09 ¹	1,75 $\pm$ 0,05 ¹	1,71 $\pm$ 0,06 ¹
		II	2,27 $\pm$ 0,09 ^{1,2}	2,07 $\pm$ 0,08 ^{1,2}	1,93 $\pm$ 0,07 ^{1,2}	1,68 $\pm$ 0,08 ¹
ПВК, ммоль/г белка PA, mmol/g protein	0,13 $\pm$ 0,01	I	0,16 $\pm$ 0,01 ¹	0,16 $\pm$ 0,01 ¹	0,17 $\pm$ 0,01 ¹	0,16 $\pm$ 0,01 ¹
		II	0,22 $\pm$ 0,01 ^{1,2}	0,20 $\pm$ 0,01 ^{1,2}	0,19 $\pm$ 0,01 ¹	0,18 $\pm$ 0,01 ¹
КГ, у. е. HR, c. y.	9,36 $\pm$ 0,29	I	10,25 $\pm$ 0,22 ¹	10,28 $\pm$ 0,27 ¹	10,26 $\pm$ 0,24 ¹	9,93 $\pm$ 0,26
		II	11,73 $\pm$ 0,26 ^{1,2}	11,35 $\pm$ 0,31 ^{1,2}	10,52 $\pm$ 0,28 ¹	9,78 $\pm$ 0,25

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

содержание лактата было достоверно повышено с первых по 30-е сутки наблюдения по сравнению с нормой.

В группе сравнения концентрация МК на всех этапах исследования превышала норму на 40,2-50,0% ($p < 0,05$), но была достоверно ниже, чем в основной группе при поступлении, на 7-е и 14-е сутки наблюдения.

Концентрация пирувата в плазме крови при эрозивно-язвенных поражениях ДПК характеризовалась сходной динамикой, показатель на всех этапах наблюдения был выше нормы на 32,6-62,1% ($p < 0,05$) соответственно.

В группе сравнения концентрация ПВК на всех этапах исследования превышала норму на 23,1-30,8% ($p < 0,05$), но была достоверно ниже, чем в основной группе при поступлении и на 7-е сутки наблюдения.

При оценке показателя коэффициента гипоксии также наблюдалось его увеличение при поступлении, на 7-е и 14-е сутки. Только к 30-м суткам наблюдения показатель достоверно не отличался от нормы. В группе сравнения коэффициент гипоксии при поступлении, на 7-е и 14-е сутки исследования превышал норму на 9,5-9,8% ($p < 0,05$), но был достоверно ниже, чем в основной группе при поступлении и на 7-е сутки наблюдения.

По данным КТ-ангиографии брюшного отдела аорты и ее ветвей у больных основной группы регистрировались стенозы желудочных артерий от 50 до 72%, что явилось подтверждением роли атеросклероза как одного из патогенетических механизмов развития эрозивно-язвенных поражений ДПК на фоне ХНМК, явившегося основой локальной гипоксии, безусловно, вносящей свой вклад в общий патогенез заболевания.

Известно, что патогенез большого числа заболеваний, в том числе и эрозивно-язвенных поражений ДПК, включает нарушения, обусловленные дисбалансом в антиоксидантно-прооксидантной системе. В связи с чем на следующем этапе работы мы оценивали показатели ПОЛ и антиоксидантной системы в анализируемой группе больных. Исследования показали, что при эрозивно-язвенных поражениях наблюдает-

ся активация процессов ПОЛ, что подтверждалось ростом содержания ДК и ТК, уровня МДА при поступлении, на 7-е и 14-е сутки наблюдения и снижением антиоксидантного потенциала плазмы крови, оцененного показателем СОД. Только к 30-м суткам наблюдения имела место тенденция к снижению показателей ДК, ТК, МДА и повышению уровня СОД. В группе сравнения имела место сходная динамика показателей прооксидантно-антиоксидантной системы, но достоверно более низкая, чем в основной группе.

Анализируя полученные результаты, отметим, что при эрозивно-язвенных поражениях ДПК на фоне ХНМК отмечается значительный рост содержания МК, ПВК и КГ в плазме крови, безусловно, свидетельствующий о развитии гипоксии, по-видимому, из-за снижения кислородтранспортной функции крови вследствие общей острой реакции организма, возникающей в условиях данной патологии, сопровождаемой активацией ПОЛ при снижении АОЗ.

Заключение

Таким образом, данное исследование показало, что патогенетической основой эрозивно-язвенных поражений ДПК, ассоциированных с ХНМК выступают иммунологические нарушения, хроническая гипоксия, сопровождающиеся активацией процессов липопероксидации и снижением АОЗ. Повышение уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при гипоксии указывает на формирование дисбаланса в иммунорегуляторной системе, доказывая, что гипоксия выступает в качестве предиктора хронического воспаления. Данные патогенетические механизмы повреждения безусловно оказывают взаимоотягивающее влияние при прогрессировании заболевания. Выявленные нарушения диктуют необходимость разработки тактики медикаментозной коррекции цитокинового дисбаланса, гипоксии и активизации ПОЛ у пациентов с эрозивно-язвенными поражениями ДПК на фоне хронического нарушения мозгового кровообращения.

Список литературы / References

1. Альтман Н.С. Роль вегетативных нарушений в развитии эрозивно-язвенных поражений желудочно-кишечного тракта и пути их коррекции // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация, 2015. Т. 14, № 2. С. 23-28. [Altman N.S. The role of autonomic disorders in the development of erosive and ulcerative lesions of the gastrointestinal tract and ways to correct them. *Fizioterapiya, balneologiya i reabilitatsiya = Physiotherapy, Balneology and Rehabilitation*, 2015, Vol. 14, no. 2, pp. 23-28. (In Russ.)]
2. Лазебник Л.Б., Васильев Ю.В., Щербakov П.Л., Хомерики С.Г., Машарова А.А., Бордин Д.С., Касьяненко В.И., Дубцова Е.А. *Helicobacter pylori*: распространенность, диагностика, лечение // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2010. № 2. С. 3-7. [Lazebnik L.B., Vasilyev Yu.V., Shcherbakov P.L., Khomeriki S.G., Masharova A.A., Bordin D.S., Kasyanenko V.I., Dubtsova E.A. *Helicobacter pylori*: prevalence,

diagnosis, treatment. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2010, Vol. 2, pp. 3-7. (In Russ.)]

3. Маев И.В., Самсонов А.А. Болезни двенадцатиперстной кишки. М.: МЕДпресс-информ, 2005. 512 с. [Maev I.V., Samsonov A.A. Diseases of the duodenum]. Moscow: MEDpress-inform, 2005. 512 p.

4. Маев И.В., Самсонов А.А., Андреев Д.Н. Болезни желудка. М., 2015. 967 с. [Maev I.V., Samsonov A.A., Andreev D.N. Stomach diseases. Moscow, 2015. 967 p.

5. Матвеева Л.В., Мосина Л.М., Капкаева Р.Х. Иммунорегуляция гастритического процесса // Медицинская иммунология, 2017. Специальный выпуск. Т. 19. С. 257. [Matveeva L.V., Mosina L.M., Kapkaeva R.H. Immunoregulation of the gastritis process. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Special issue, Vol. 19, p. 257. (In Russ.)]

6. Осадчук М.А., Осадчук А.М., Сибряев А.А. *Helicobacter pylori*: негативная язвенная болезнь: современное состояние проблемы // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, 2014. № 1. С. 4-9. [Osadchuk M.A., Osadchuk A.M., Sibryaev A.A. *Helicobacter pylori*: negative peptic ulcer disease: current state of the problem. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2014, no. 1, pp. 4-9. (In Russ.)]

7. Скрыпник И.Н., Вахненко А.В. Роль гипоксии в развитии заболеваний органов пищеварения и обоснование применения антигипоксантов в гастроэнтерологии // Сучасна гастроентерологія, 2010. № 4. С. 90-100. [Skrypnyk I.N., Vakhnenko A.V. The role of hypoxia in the development of diseases of the digestive system and the rationale for the use of antihypoxants in gastroenterology. *Suchasna gastroenterologiya = Modern Gastroenterology (In Ukraine)*, 2010, Vol. 4, pp. 90-100. (In Russ.)]

8. Akamatsu T, Uehara H., Okamura T, Iwaya Y, Suga T. Screening and treatment for *Helicobacter pylori* infection in teenagers in Japan. *J. of Gastroenterol. and Digestive System*, 2016, Vol. 6, Iss. 4, pp. 1-4.

Авторы:

Полозова Э.И. — д.м.н., доцент, профессор кафедры госпитальной терапии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Мосина Л.М. — д.м.н., профессор, профессор кафедры госпитальной терапии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Новикова Л.В. — к.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии, микробиологии и вирусологии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Authors:

Polozova E.I., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Hospital Therapy, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Mosina L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Hospital Therapy, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Novikova L.V., PhD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, Microbiology and Virology, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Трохина И.Е. — аспирант кафедры госпитальной терапии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия
Капкаева Р.Х. — аспирант кафедры госпитальной терапии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Trokhina I.E., Postgraduate Student, Department of Hospital Therapy, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Kapkaeva R.Kh., Postgraduate Student, Department of Hospital Therapy, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Поступила 15.04.2019
Отправлена на доработку 29.04.2019
Принята к печати 27.05.2019

Received 15.04.2019
Revision received 29.04.2019
Accepted 27.05.2019

НОВЫЙ МЕТОД, БАЗИРУЮЩИЙСЯ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕННЫХ МАЖОРНЫХ БЕЛКОВ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ, СПОСОБСТВУЕТ УМЕНЬШЕНИЮ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО СИГНАЛА В ИММУНОАНАЛИЗЕ

Горайнова О.С., Хан Е.О., Иванова Т.И., Тиллиб С.В.

ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Ахиллесовой пятой иммуноанализа является порой недооцениваемая проблема его восприимчивости к различным интерференциям (помехам, вмешательствам в анализ). Присутствие в пробе пациента мешающих веществ может привести к ошибочному результату теста, следствием чего может стать неправильная диагностика и катастрофические последствия для пациента, поэтому следует уделять особое внимание выявлению возможных интерференций в используемых тест-системах и при возможности разрабатывать и применять методы их преодоления.

Особенно остро вопрос борьбы с интерференциями стоит в случае иммуноанализа биомаркеров в плазме или сыворотке крови человека. Для уменьшения возможных интерференций желательно было бы иметь возможность специфичной и адаптируемой предобработки препаратов крови для конкретного анализируемого маркерного белка, для конкретной тест-системы. Мы предполагаем, что такую предобработку можно сделать с помощью комбинирования иммуносорбентов, базирующихся на использовании особых однодоменных антител (нанотел). Нанотела — рекомбинантные белки, производные однодоменных антиген-узнающих вариабельных фрагментов особых антител, состоящих из димера укороченных тяжелых цепей при полном отсутствии легких цепей. Такие особые антитела присутствуют в норме, наряду с обычными антителами, у представителей семейства *Camelidae* (Верблюдовые) и у некоторых видов хрящевых рыб. Особые свойства нанотел могут обеспечить определенные преимущества при их использовании по сравнению с антителами традиционной структуры и их производными. В данной работе впервые показано, что иммуносорбенты на основе определенной комбинации используемых в качестве лигандов однодоменных антител, способных специфически связывать (и удалять) конкретные мажорные белки крови человека, могут быть подобраны для заданного маркерного антигена крови таким образом, что будут эффективным инструментом предобработки крови с целью уменьшения возможных эффектов интерференции и повышения чувствительности при диагностическом иммуноферментном анализе «сэндвич»-типа. Новый метод предобработки плазмы крови продемонстрирован на примере препаратов плазмы крови (в разведении 1:40) двух пациентов. Ранее разработанная модельная система детекции белка лактоферрина была использована для анализа образцов плазмы крови. Показано, что можно существенно повысить соотношение суммарного детектируемого сигнала к неспецифическому фону, связанному с интерфе-

Адрес для переписки:

Тиллиб Сергей Владимирович
ФГБУН «Институт биологии гена»
Российской академии наук
119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, 34/5.
Тел.: 8 (499) 135-22-01.
E-mail: tillib@genebiology.ru

Address for correspondence:

Tillib Sergei V.
Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences
119334, Russian Federation, Moscow, Vavilov str., 34/5.
Phone: 7 (499) 135-22-01.
E-mail: tillib@genebiology.ru

Образец цитирования:

О.С. Горайнова, Е.О. Хан, Т.И. Иванова, С.В. Тиллиб
«Новый метод, базирующийся на использовании
иммобилизованных однодоменных антител
для удаления определенных мажорных белков из плазмы
крови, способствует уменьшению неспецифического
сигнала в иммуноанализе» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 567-575.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-567-575
© Горайнова О.С. и соавт., 2019

For citation:

O.S. Goryainova, E.O. Khan, T.I. Ivanova, S.V. Tillib
“A new method based on the use of immobilized single-domain
antibodies to remove certain major proteins from blood plasma
helps to reduce nonspecific signal in an immunoassay”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 3, pp. 567-575.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-567-575

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-567-5765

ренциями, за счет сильного уменьшения этого фона путем аффинного удаления (с помощью соответствующих иммобилизованных однодоменных антител) из препаратов плазмы крови фракции трех мажорных белков: фибриногена, иммуноглобулинов класса G, альфа-2-макроглобулина.

Ключевые слова: однодоменные антитела, иммуносорбенты, предобработка плазмы крови, иммуноанализ

A NEW METHOD BASED ON THE USE OF IMMOBILIZED SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES TO REMOVE CERTAIN MAJOR PROTEINS FROM BLOOD PLASMA HELPS TO REDUCE NONSPECIFIC SIGNAL IN AN IMMUNOASSAY

Goryainova O.S., Khan E.O., Ivanova T.I., Tillib S.V.

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. A generally underestimated problem of immunoassays is its susceptibility to various interferences, being the Achilles heel of these assays (interventions in the analysis). The presence of interfering substances in the patient's specimen can cause erroneous test sample result, which may lead to incorrect diagnosis and catastrophic consequences for the patient. Hence, one should pay particular attention to identifying possible interferences in the test systems used and, when possible, develop and apply methods to overcome them. The issue of avoiding interference is particularly important for immunoassays of biomarkers in human plasma or serum. In order to reduce possible interferences, it would be desirable to have an opportunity of specific and adaptable pretreatment of blood samples for a specifically assayed marker protein, as applied to a specific test system. We assume that such pretreatment may be done by combining the immunosorbents based on the use of special single-domain antibodies (nanobodies).

The nanobodies are recombinant proteins, derivatives of single-domain antigen-recognizing variable fragments of specific antibodies, consisting of a dimer of truncated heavy chains in the complete absence of light chains. Such specific antibodies are detectable in the normal samples taken from members of the *Camelidae* family (Camelids), and in some species of cartilaginous fishes, along with the common antibodies. The special properties of nanobodies can provide certain advantages in their use, compared with antibodies of traditional structure and their derivatives.

In this paper, we have shown for the first time, that the immunosorbents based on certain combination of single-domain antibodies used as ligands able for specifically binding and removal of specific high-abundance human blood proteins, may be selected for a given marker blood antigen in such a way that they will be an effective tool for blood pretreatment, aiming to reduce possible effects of interference and increased sensitivity in the diagnostic "sandwich" enzyme immunoassay. A new method of plasma pretreatment is demonstrated with human plasma samples (at a dilution of 1:40) of two patients. A previously developed model system for detection of lactoferrin protein was used to analyze plasma samples. It is shown that a significantly increased ratio of total detected signal to the nonspecific background signal could be obtained after drastic reduction of this background by affinity removal of 3 major protein fractions, i.e., fibrinogen, IgG alpha-2-macroglobulin from blood plasma samples, using appropriate immobilized single domain antibodies.

Keywords: single-domain antibodies, immunosorbents, blood plasma pre-treatment, immunoassay

Введение

Иммуноанализ (ИА), в частности одна из наиболее популярных его разновидностей — «сэндвич»-иммуноферментный анализ (ИФА), является важной высокочувствительной технологией определения анализируемого вещества (аналита) в составе биологической жидкости в современных клинических и исследовательских лабораториях. В основе этого метода находится специфическое связывание антителом

(лигандом) детектируемого вещества (антигена, анализата). Ахиллесовой пятой ИА является порой недооцениваемая проблема его восприимчивости к различным интерференциям (помехам, вмешательствам в анализ). Присутствие в пробе пациента мешающих веществ может привести к ошибочному результату теста, либо ложноположительному, либо ложноотрицательному. Интерференции (помехи) могут быть как зависимыми, так и не зависимыми от конкретного

аналита. Интерференции, связанные с составом (с так называемым «матриксом») антигенсодержащего образца, например, с разными степенями гемолиза (разрушением оболочки эритроцитов с высвобождением гемоглобина), с желтухой (повышенным содержанием в крови билирубина), с липемией (повышенным содержанием в крови нейтральных жиров, триглицеридов и липопротеинов), с воздействием антикоагулянтов, с особенностями отбора и хранения образцов и другими, носят общий характер и не зависят от концентрации аналита. Аналит-зависимые интерференции в ИА обычно вызваны взаимодействием компонентов в образце с одним или несколькими реагентами на основе антител к исследуемому аналиту. Причиной таких интерференций могут быть довольно часто присутствующие в плазме крови пациентов гетерофильные антитела, человеческие антитела против животных, аутоантитела к аналиту, ревматоидный фактор, связывающие белки и другие молекулы. Величина эффекта интерференции зависит от концентрации мешающего вещества, но не обязательно прямо пропорционально. Интерференции могут приводить к противоречивым результатам с использованием разных систем анализа. Ошибка тестирования, связанная с интерференцией, может быть клинически значимой и может привести к неправильной диагностике и катастрофическим последствиям для пациента, поэтому следует уделять особое внимание выявлению возможных интерференций в используемых тест-системах и при возможности разрабатывать и применять методы их преодоления [4, 12].

Особенно остро вопрос борьбы с интерференциями стоит в случае иммуноанализа биомаркеров в плазме или сыворотке крови человека. Для уменьшения возможных интерференций желательно было бы иметь возможность специфичной и адаптируемой предобработки препаратов крови для конкретного анализируемого маркерного белка, для конкретной тест-системы. Мы предполагаем, что такую предобработку можно сделать с помощью комбинирования иммуносорбентов, базирующихся на использовании особых однодоменных антител (нанотел — *nanobodies*). Нанотела — рекомбинантные белки, производные однодоменных антиген-узнающих переменных фрагментов особых антител, состоящих из димера укороченных тяжелых цепей при полном отсутствии легких цепей. Такие особые антитела присутствуют в норме, наряду с обычными антителами, у представителей семейства *Camelidae* (Верблюдовые) и у некоторых видов хрящевых рыб. Особые свойства нанотел могут обеспечить определенные преимущества при их

использовании по сравнению с антителами традиционной структуры и их производными [2, 5, 6, 8, 9, 10]. Так, малый размер облегчает всевозможные генно-инженерные модификации последовательностей, кодирующих исходно получаемые нанотела. Высокая растворимость, стабильность, способность к быстрой ренатурации нанотел делают возможным их повторное или многократное использование в иммобилизованной форме в различных иммуносорбентах без заметной потери активности. Нанотела способны формировать необычные паратопы и узнавать необычные для классических антител уникальные нативные эпитопы (преимущественно конформационные эпитопы), что может приводить к особо высокой специфичности узнавания. Нанотела состоят только из одного антиген-узнающего домена, не имеют константных Fc-участков классических антител, которые часто бывают мишенями гетерофильных интерферирующих антител в исследуемых образцах крови. Наконец, наличие эффективной процедуры генерирования и отбора, простота наработки однодоменных антител позволяют сделать технологию их получения экономичной.

Мы ранее разработали эффективную процедуру последовательного многостадийного генерирования однодоменных антител к различным мажорным белкам плазмы крови [1]. Эффективность разработанного метода была продемонстрирована на примере получения нанотел к белкам, наиболее богато представленным в протеоме плазмы крови, таким как сывороточный альбумин (Alb), различные классы иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM), альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2M$), фибриноген (Fg). Отобранные однодоменные антитела использовали в качестве лигандов при создании новых иммуносорбентов (материалов с иммобилизованными антителами), с помощью которых возможно специфическое извлечение из плазмы крови соответствующих мажорных белков и ассоциированных с ними молекул. В результате проведенного исследования были получены новые уникальные инструменты для предобработки препаратов крови и выделения специфических белков и субпротеомов, ассоциированных с определенными мажорными плазматическими белками. В данной работе мы демонстрируем примеры практического применения таких иммуносорбентов на основе нанотел для уменьшения влияния интерференций на результат ИА.

Мы используем в качестве модельной системы детекцию белка лактоферрина в образце плазмы крови человека, используя ранее полученную нами пару нанотел, узнающих неперекрываю-

щиеся эпитопы белка лактоферрина [11]. Лактоферрин (LF) представляет собой гликопротеин с высокой функциональной универсальностью, который содержится в большинстве жидкостей организма (в том числе и в крови, где его концентрация в норме примерно 1 мкг/мл). LF является иммуномодулирующим фактором, который важен как для врожденного, так и адаптивного иммунного ответа. Он обладает антимикробной активностью против паразитов, грибов и вирусов, а также обладает регенеративными свойствами на тканевом уровне и антиканцерогенной активностью. Все эти свойства определяют высокий терапевтический потенциал LF, который пока мало используется [7].

Целью исследования в данной работе была демонстрация того, что иммуносорбенты на основе определенной комбинации однодоменных антител (нанотел), способных специфически связывать (и удалять) конкретные мажорные белки крови человека, могут быть подобраны для заданного маркерного антигена крови таким образом, что будут эффективным инструментом предобработки крови с целью уменьшения интерференции (неспецифического фоновых сигнала) и повышения чувствительности при диагностическом иммуноферментном анализе.

Материалы и методы

Плазма периферической крови двух здоровых доноров получена из Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. В качестве коагулянта использован гепарин (50 ед./мл).

Наработанные форматируемые нанотела пришивали к CNBr-активированной Сефарозе 4B (GE Healthcare Life Sciences), согласно рекомендациям производителя и как описано ранее [1, 11]. Таким образом, получали новые иммуносорбенты (иммуноаффинные колонки), специфичность которых определялась свойствами иммобилизованного нанотела. Такие иммуносорбенты с иммобилизованными отобранными нанотелами использовали для специфического истощения плазмы крови. Эти эксперименты проводили по описанным ранее методикам [1, 11].

20 мкл плазмы крови развели в 20 раз в стандартном солевом растворе PBS (400 мкл). Разбавленную плазму последовательно пропускали через 1 или 3 иммуносорбента, полученных в результате пришивки наноантител к CNBr-активированной сефарозе 4B (GE Healthcare Life Sciences): иммуносорбенты с иммобилизованными однодоменными антителами к фибриногену, Ig G, α -2-макроглобулину (3 разные колонки).

Объем каждой колонки составлял примерно 0,15 мл, и к ней было пришито примерно 0,25 мг нанотел (1,7 мг/мл). В каждом случае собирали проскок и промывку (суммарный объем 800 мкл). Отобрали аликвоту проскока (истощенной плазмы) и элюатов (связавшийся белок элюировали раствором 0,1 М глицин-HCl, pH 2,7, и нейтрализовали раствором 1 М Трис) для проверки качества истощения методом электрофореза в 5-19%-ном градиентном полиакриламидном геле. Полученный препарат плазмы, разведенный в 40 раз, использовали для иммуноанализа.

Иммуноферментный анализ в «сэндвич»-формате проводили, как описано ранее [11] с небольшими модификациями. Нанотело LF6 в концентрации 2 мкг/мл пассивно иммобилизовали в лунках иммунологического планшета (NuncMaxisorp) в 100 мкл PBS в течение ночи при 4 °С. После промывки в PBS (три смены) лунки блокировали в 5% сыворотке верблюда (ранее нами полученной перед началом иммунизации верблюда) в 1% казеиновом блокирующем буфере (Sigma) в течение 2 часов. После промывки с PBS (три смены) в лунки вносили препараты разбавленной плазмы, к которой добавляли до 5% сыворотки верблюда, и инкубировали при перемешивании в течение 1 часа. Затем трижды проводили промывку в PBS с 0.05% Tween-20 (PBT). В качестве вторичных антител использовали биотинилированное нанотело LF5. Биотинилирование проводили с помощью препарата Biotin-XX (Sigma) согласно протоколу фирмы. Биотинилированное нанотело LF5 в концентрации 100 нг/мл в казеиновом блокирующем буфере добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 часа. Проводили трижды промывку в PBT, после чего добавляли раствор (100 нг/мл) конъюгата стрептавидина и пероксидазы хрена (Calbiochem, США) в казеиновом блокирующем буфере и инкубировали в течение 1 часа. Проводили трижды промывку в PBT (пять смен) и затем в PBS (2 смены), после чего определяли активность пероксидазы, используя ABTS (Sigma) в качестве хромогенного субстрата. Оптическую плотность (OD) измеряли при 405 нм с помощью Microplate Reader Mul-tiscan EX (Labsystems).

Результаты

Ранее мы и соавторы показали, что полученные однодоменные антитела к лактоферрину человека (LF5 и LF6) могут быть использованы для количественной детекции лактоферрина в формате «сэндвич»-иммуноферментного анализа [11]. Два указанных нанотела узнают неперекрывающиеся эпитопы лактоферрина человека: LF6 используется как иммобилизованное якорное антитело,

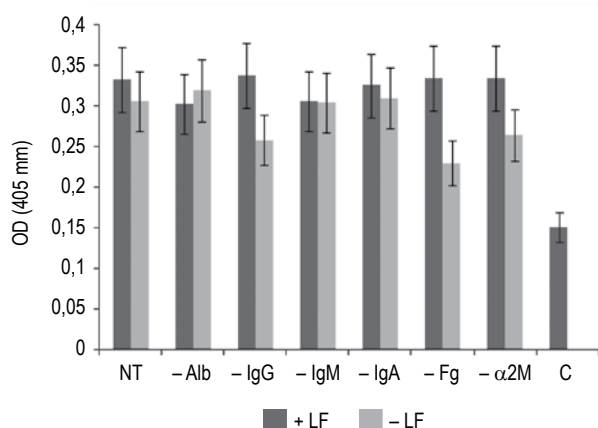


Рисунок 1. Анализ возможности уменьшения интерференции (неспецифического фона) при детекции LF в плазме крови человека (в разведении 1:40) методом иммуноферментного анализа с помощью удаления определенного мажорного белка крови

Примечание. Анализировали препараты плазмы без предобработки (NT) и шесть других, в которых был удален (–) один из белков: сывороточный альбумин (Alb), IgG, IgM, IgA, фибриноген (Fg) или альфа-2-макроглобулин (α2M), как указано в подписях в нижней части рисунка. Анализировались препараты как без удаления (темный столбец, + LF), так и после удаления (светлый столбец, – LF) детектируемого антигена (LF) с помощью преадсорбции препарата плазмы крови в лунке с иммобилизованным нанотелом (LF6), связывающим LF. В контрольной лунке (C) не добавляли плазму крови человека, а остальные процедуры были те же, что в остальных лунках. Приведены усредненные результаты экспериментов, выполненных в трех повторах. Отрезки отражают диапазон разброса получаемых результатов.

Figure 1. Analysis of the possibility to reduce the interference (non-specific background) by removing a specific major blood protein in the detection of LF in human blood plasma (at a dilution of 1:40) by enzyme immunoassay

Note. The plasma samples were analyzed without pretreatment (NT) and six others, in which one of the following proteins was removed: serum albumin (Alb), IgG, IgM, IgA, fibrinogen (Fg) or alpha-2-macroglobulin (α2M), as indicated in the captions at the bottom of the figure. The preparations were analyzed both without removal (dark column) and after removal (light column) of the being detected antigen (LF) using pre-subtraction of the blood plasma preparation in the well with the immobilized nanobodies (LF6) binding the LF. In the control well (C), there was no human blood plasma added. The averaged results of experiments performed in triplicate are given. The vertical segments reflect the range of the results obtained.

а биотинилированное нанотело LF5 используется как детектирующее нанотело (наряду с последующим добавлением конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена и завершающим этапом — пероксидаза-зависимой колориметрической реакцией). В такой постановке линейную корреляцию зависимости величины поглощения от концентрации LF наблюдали для концентраций LF в диапазоне от 6 до 150 нг/мл (0,3–5 нМ).

По литературным данным, концентрация LF в крови в норме составляет примерно 1 мкг/мл. Таким образом, препарат плазмы крови в разведении 1:100–1:10 (с предполагаемой концентрацией LF 10–100 нг/мл) может быть потенциально использован для детекции LF в данной модельной тест-системе. В данной работе мы использовали препарат плазмы крови, разведенный в 40 раз. Производные плазмы после предобработок доводили до такого же разведения относительно исходного препарата. Для контроля неспецифического фона, не связанного с LF и являющегося результатом потенциально возможных интерференций, мы специфически удаляли LF из образца плазмы с помощью иммобилизованных нанотел (LF6). Эту процедуру проводили тремя способами: а) путем пропускания разведенного (1:10) препарата плазмы крови через колонку с иммобилизованным LF6; б) с помощью предварительной инкубации образца разбавленной плазмы в лунке иммунологического планшета с иммобилизованным LF6; в) путем добавления в раствор анализируемого образца того же «якорного» LF6 в концентрации примерно 2 мкг/мл и прединкубации для связывания/блокирования LF. Эффективность «удаления»/блокирования связывания LF в случае всех трех указанных предобработок было примерно одинаковым, так что далее мы использовали два последних варианта как более удобные.

Мы использовали отдельно шесть разных иммуносорбентов, полученных на основе шести ранее полученных и охарактеризованных нанотел, специфически связывающих один из 6 мажорных белков крови: сывороточный альбумин (Alb), IgG, IgM, IgA, фибриноген (Fg) или альфа-2-макроглобулин (α2M). При пропускании препарата плазмы крови через эти иммуносорбенты мы можем специфически удалять определенный мажорный белок и, возможно, какие-то другие компоненты, которые потенциально могут быть связаны в крови с этим мажорным белком. В экспериментах, результаты которых отражены на рисунке 1, мы использовали препараты плазмы крови, разведенные в 40 раз, полученные до и после описанных выше предобработок. В нижней части рисунка указаны названия образцов: без предобработки (NT) и шесть других, в которых было проведено удаление одного из мажорных вариантов белков крови. В каждом случае анализировались препараты как без удаления (темный столбец), так и после удаления (светлый столбец) детектируемого антигена (LF).

Из полученных результатов видно, что в исходном препарате плазмы крови (без предобработки) в данной модельной тест-системе досто-

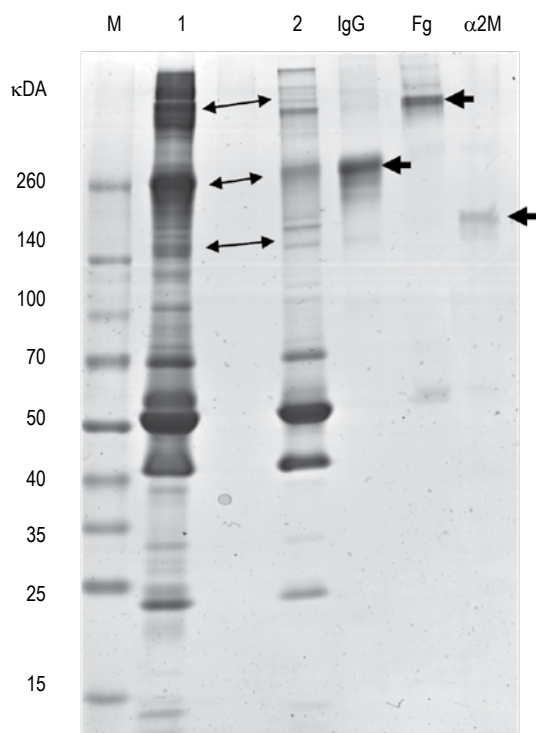


Рисунок 2. Иммуносорбенты на основе полученных однодоменных антител позволяют специфически истощать плазму крови

Примечание. Электрофоретический анализ (в градиентном 5-19%-ном SDS-полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях) белков плазмы крови до (1) и после (2) специфических истощений, в которых удаляли мажорные белки Fg, IgG, и α 2M. Стрелками указаны положения истощаемых белков. М – смесь маркерных белков (Spectra BR, Thermo Scientific). Исследовали образцы, эквивалентные примерно 0,5 мкл плазмы крови, и элюаты связавшихся белков, эквивалентные 1 мкл плазмы крови.

Figure 2. Immunosorbents with cross-linked single-domain antibodies obtained allow specific depletion of blood plasma
Note. Electrophoretic analysis (in a gradient 5-19% SDS-polyacrylamide gel under non-reducing conditions) of plasma proteins before (1) and after (2) specific depletions, in which major Fg, IgG, and α 2M proteins were removed. The arrows indicate the positions of the depleted proteins. M is a mixture of marker proteins (Spectra BR, Thermo Scientific). Samples quantitatively corresponding to approximately 0.5 μ l of blood plasma and eluates of bound proteins corresponding to 1 μ l of blood plasma were examined.

верная детекция LF невозможна: детектируемые сигналы до и после удаления этого белка отличаются лишь незначительно, и области разброса этих сигналов практически перекрываются. Предобработка плазмы крови, заключающаяся в иммуноаффинном удалении определенного мажорного компонента крови, приводит к желаемому эффекту только в трех из шести исследуемых вариантов: в случае удаления IgG, Fg и α 2M.

С целью усилить обнаруженный эффект мы решили провести предобработку плазмы крови, удалив последовательно на трех соответствующих иммуносорбентах все три этих компонента: IgG, Fg и α 2M.

На рисунке 2 приведены результаты фракционирования исходного (1) и предобработанного (2) препаратов плазмы крови, а также связавшихся с колонками, а затем элюированных белков, в градиентном 5-19% SDS-полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях. Можно видеть, что в результате предобработки заметно истощился материал, движущийся в районах геля, соответствующих истощаемым белкам.

В экспериментах, результаты которых представлены на рисунке 3, для детекции LF использовали образцы плазмы крови, полученные от двух разных пациентов (P1 и P2). В каждом случае параллельно проводили аналогичные процедуры предобработки и анализа.

Из представленных результатов можно видеть, что проведенные предобработки не привели к уменьшению сигналов детекции LF, детектируемая концентрация которого в обоих образцах примерно одинакова. При этом наблюдается выраженный эффект предобработки, удаляющей три мажорных белка из плазмы крови, который четко виден при сравнении относительного уменьшения интерференционных (фоновых, но связанных с составом плазмы) сигналов при блокировании связывания LF с иммобилизованным в лунке нанотелом LF6, сравнение серых столбиков в случае контрольного эксперимента (P') и эксперимента, в котором выявлена доля сигнала (величина уменьшения сигнала), связанная с собственно детекцией LF (P''). На рисунке 3Б этот эффект уменьшения доли интерференционного фона (в процентах) от величины суммарного сигнала виден лучше. При вычитании величины контроля, не связанного с плазмой крови, можно оценить как весьма существенное уменьшение интерференции (как доли фона от суммарного сигнала, в %) в случае обоих образцов.

Таким образом, в данной работе на примере конкретной модельной тест-системы (детекции лактоферрина в плазме крови человека), основанной на методе «сэндвич»-ИФА, было продемонстрировано то, что иммуносорбенты на основе определенной комбинации однодоменных антител (нанотел), способных специфически связывать и удалять конкретные белки крови человека, могут быть подобраны для заданного маркерного антигена крови таким образом, что будут эффективным инструментом предобработки крови с целью уменьшения неспецифическо-

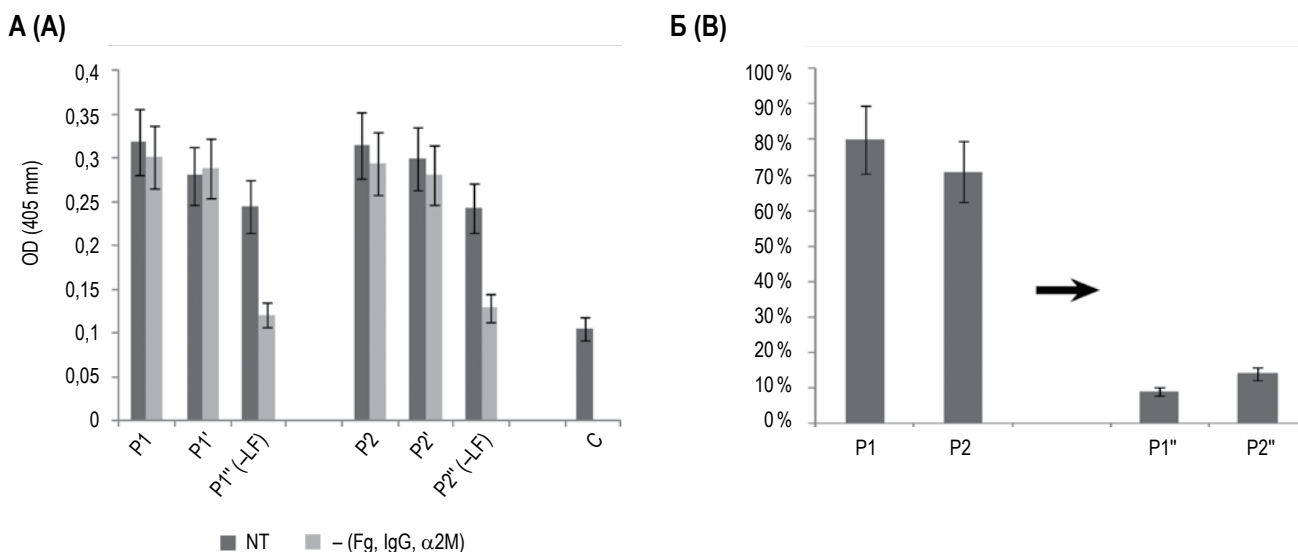


Рисунок 3. Уменьшение неспецифического фона в ИФА (детекция LF) в результате предобработки плазмы крови, заключающейся в иммуноаффинном удалении фибриногена (Fg), иммуноглобулинов класса G (IgG) и α-2-макроглобулина (α2M)

Примечание. Иммуносорбенты на основе однодоменных антител к указанным белкам были использованы для их удаления при предобработке плазмы крови человека. Новый метод предобработки плазмы крови продемонстрирован на примере препаратов плазмы крови (в разведении 1:40) двух пациентов (P1 и P2). (А) Результат ИФА для исходных (темный столбец, NT) и предобработанных (светлый столбец, – (Fg, IgG, α2M)) препаратов плазмы. Примерно за 1 час до проведения эксперимента к некоторым препаратам плазмы добавляли нанотела, связывающие LF, идентичные якорным LF6 (P1'' и P2''), или контрольные нанотела, не узнающие LF (P1' и P2'). Контрольная лунка (C) отличалась только тем, что в нее препарат плазмы человека не добавляли. (Б) При вычитании величины контроля, не связанного с плазмой крови, можно оценить достигаемое уменьшение интерференции при предложенном варианте предобработки плазмы крови. Видно существенное уменьшение интерференции (как доли фона от суммарного сигнала, в %) в случае обоих образцов. Приведены усредненные результаты экспериментов, выполненных в трех повторях. Отрезки отражают диапазон разброса получаемых результатов.

Figure 3. Reduction of non-specific background in ELISA (LF detection) as a result of plasma pretreatment, consisting in immunoaffinity removal of fibrinogen (Fg), class G immunoglobulins (IgG) and α-2-macroglobulin (α2M)

Note. Immunosorbents based on single-domain antibodies to these proteins were used to remove them in the preprocess of human blood plasma pretreatment. A new method of blood plasma pretreatment is demonstrated on two plasma samples (at a dilution of 1:40) of two patients (P1 and P2). (A) The result of the ELISA for the non-treated plasma (dark column, NT) and pretreated (light column) plasma samples. Approximately 1 hour before the experiment, nanobodies binding LF, identical to anchor LF6 (in case of samples P1'' and P2''), or control nanobody, which did not recognize LF (samples P1' and P2'), were added to some plasma samples. The control well (C) differed only in that no human plasma sample was added to it. (B) By subtracting the amount of control not related to the blood plasma, it is possible to estimate the achievable decrease in the interference with the proposed variant of the plasma blood pretreatment. One can see a significant decrease in interference (as a fraction of the background from the total signal, in %) in the case of both samples. The averaged results of experiments performed in triplicate are given. The vertical segments reflect the range of the results obtained.

го фонового сигнала и повышения чувствительности при диагностическом иммуноанализе.

Обсуждение

В данной работе продемонстрирован большой потенциал использования однодоменных антител (нанотел) для предобработки препаратов плазмы (или сыворотки) крови с целью повышения эффективности иммуноанализа биомаркеров. Мы предполагаем, что приведенный частный случай может отражать достаточно универсальный характер данного подхода для улучшения других тест-систем иммуноанализа для количественного анализа самых разных биомаркеров.

В исследуемой тест-системе детекции белка лактоферрина мы выявили всего три компонента (из имеющегося в наличии пока весьма ограниченного набора инструментов на основе нанотел), удаление которых не приводило к потерям анализируемого вещества, но заметно снижало интерференционный фон. Каждый из этих трех компонентов согласно имеющимся литературным данным, очевидно, может приводить к интерференциям при анализе самых разных биомаркеров в крови. Так, удаление из плазмы крови иммуноглобулинов класса G, очевидно, может уменьшить потенциальные интерференции, связанные с гетерофильными антителами, аутоанти-

телами к анализу, антителами против иммуноглобулинов животных и др. [4].

Фибриноген — один из наименее растворимых и легко преципитирующих мажорных белковых компонентов плазмы. Было показано повышенное сродство фибриногена к иммобилизованным в высокой плотности иммуноглобулинам классов G и A [3]. Очевидно, что удаление этого белка уменьшит вероятность коагуляции или нежелательных агрегаций, а также уменьшит фон, связанный со сродством фибриногена к иммобилизованным антителам.

Альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2M$) — многофункциональный белок-носитель, связывающий и инактивирующий различные протеазы, связывающий также различные пептиды, ростовые факторы, цитокины, потенциально и некоторые биомаркеры. Конформация этого белка очень чувствительна к различным воздействиям, например, к замораживанию и лиофилизации [13]. Мы хранили образцы плазмы замороженными в аликвотах. При их разморозке $\alpha 2M$ мог изменяться, приобретая способность к повышенной агрегации, при этом теряя способность связывать и инактивировать протеазы. Очевидно, что его удаление из плазмы до ее заморозки (если при этом не удалится исследуемый биомаркер) может способствовать уменьшению интерференций в ИА и удалению нежелательных ассоциированных с этим белком протеаз.

Для лучшего результата предложенную предобработку следует проводить на свежеполученных образцах плазмы крови до ее заморозки.

Мы хотим отметить еще один факт, важный для контроля интерференций любой конкретной тест-системы. Желательно иметь возможность блокировки связывания анализируемого вещества (аналита, биомаркера) в образце биологической жидкости с иммобилизованным якорным антителом, чтобы видеть величину интерференционного фоновых сигнала. В нашем случае это легко было сделать, предадсорбируя образец в лунке с якорным антителом или добавляя в образец избыток того же нанотела, которое используется как якорное. Также для этой цели можно использовать предварительную блокировку иммобилизованного якорного антитела препаратом очищенного антигена, если такой есть в наличии. Такие контрольные эксперименты необходимы для того, чтобы оценить долю измеряемого сигнала, которая действительно связана с детекцией собственно измеряемого аналита (биомаркера), а не с интерференционными эффектами (неспецифическим фоном).

Благодарности

Работа выполнена в рамках темы Госзадания Министерства науки и высшего образования РФ (№ 0100-2016-0016) и была частично поддержана РНФ (Проект № 15-14-00081).

Список литературы / References

1. Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Рутовская М.В., Тиллиб С.В. Метод параллельного и последовательного генерирования однодоменных антител для протеомного анализа плазмы крови человека // Молекулярная биология, 2017. Т. 51. № 6. С. 985-996. [Goryainova O.S., Ivanova T.I., Rutovskaya M.V., Tillib S.V. A method for the parallel and sequential generation of single-domain antibodies for the proteomic analysis of human blood plasma. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2017, Vol. 51, no. 6, pp. 985-996. (In Russ.)]
2. Тиллиб С.В., Вятчанин А.С., Муилдерманс С. Молекулярный анализ структуры особых антител *Camelus bactrianus*, состоящих только из тяжелых цепей // Биохимия, 2014. Т. 79. № 12. С. 1687-1697. [Tillib S.V., Vyatchanin A.S., Muyldermans S. Molecular analysis of heavy chain-only antibodies of *Camelus bactrianus*. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2014, Vol. 79, no. 12, pp. 1687-1697. (In Russ.)]
3. Boehm T.K., Sojar H., DeNardin E. Concentration-dependent effect of fibrinogen on IgG-specific antigen binding and phagocytosis. *Cell. Immunol.*, 2010, Vol. 263, no. 1, pp. 41-48.
4. Bolstad N., Warren D.J., Nustad K. Heterophilic antibody interference in immunometric assays. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2013, Vol. 27, pp. 647-661.
5. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, Vol. 363, pp. 446-448.
6. Harmsen M.M., de Haard H.J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, Vol. 77, pp. 13-22.
7. Moreno-Expósito L., Illescas-Montes R., Melguizo-Rodríguez L. Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin. *Life Sciences*, 2018, Vol. 195, pp. 61-64.
8. Muyldermans S., Baral T.N., Retamozzo V.C. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2009, Vol. 128, pp. 178-183.
9. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.*, 2013, Vol. 82, pp. 775-797.

10. Steeland S., Vandenbroucke R.E., Libert C. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discovery Today*, 2016, Vol. 21, pp.1077-1113.
11. Tillib S.V., Privezentseva M.E., Ivanova T.I. Single-domain antibody-based ligands for immunoaffinity separation of recombinant human lactoferrin from the goat lactoferrin of transgenic goat milk. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2014, pp. 48-57, 949-950.
12. Ward G., Simpson A., Boscatto L., Hickman P. E. The investigation of interferences in immunoassay. *Clin. Biochem.*, 2017, Vol. 50, pp. 1306-1311.
13. Wyatt A.R., Kumita J.R., Farrawell N/. Alpha-2-macroglobulin is acutely sensitive to freezing and lyophilization: Implications for structural and functional studies. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 6, e0130036. doi: 10.7868/S0026898417060106.

Авторы:

Горайнова О.С. — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Хан Е.О. — к.б.н., младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Иванова Т.И. — к.б.н., научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Тиллиб С.В. — д.б.н., заведующий лабораторией молекулярных биотехнологий ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Goryainova O.S., Junior Research Associate, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Khan E.O., PhD (Biology), Junior Research Associate, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Ivanova T.I., PhD (Biology), Research Associate, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Tillib S.V., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Biotechnologies, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 18.12.2018

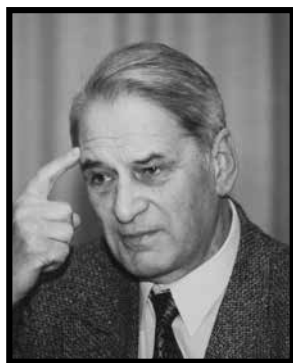
Отправлена на доработку 26.12.2018

Принята к печати 04.01.2019

Received 18.12.2018

Revision received 26.12.2018

Accepted 04.01.2019



ФЕДОСЕЕВ ГЛЕБ БОРИСОВИЧ

На 89-м году жизни скончался член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры терапии госпитальной с курсом аллергологии и иммунологии имени акад. Черноруцкого с клиникой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени акад. И.П. Павлова Глеб Борисович Федосеев.

После окончания в 1954 году 1-го Ленинградского медицинского института (ныне университета) Глеб Борисович поступил в клиническую ординатуру на кафедру госпитальной терапии, с которой была связана вся его дальнейшая жизнь.

Он прошел обычный путь ассистента, доцента, профессора и в течение 27 лет (с 1975 по 2001 г.) руководил кафедрой госпитальной терапии. Г.Б. Федосеев был замечательным педагогом, высокопрофессиональным врачом, выдающимся ученым. При его руководстве и консультировании было защищено 27 докторских и 70 кандидатских диссертаций. Ученики Глеба Борисовича работают по всему миру: на Кубе, в Китае, Ливане, Сирии, Казахстане, Киргизстане, Азербайджане и в других странах. Он является автором и соавтором более 600 научных работ, 18 монографий, нескольких учебников и руководств для практических врачей.

Глеб Борисович организовал одним из первых в стране аллергологическую службу в Ленинграде — Санкт-Петербурге и в течение многих лет был главным аллергологом города.

Более 30 лет Г.Б. Федосеев возглавлял Санкт-Петербургское общество терапевтов имени С.П. Боткина, организовал и провел 18 конгрессов терапевтов Северо-Западного региона.

Коллеги и ученики Г.Б. Федосеева скорбят о невосполнимой потере для российской медицины.



КЕТЛИНСКИЙ СЕРГЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

12 июня 2019 г. после долгой и продолжительной болезни на 79-ом году жизни скончался выдающийся отечественный иммунолог, член-корреспондент РАН, лауреат премии Правительства Российской Федерации, доктор биологических наук, профессор Сергей Александрович Кетлинский.

С.А. Кетлинский родился 21.07.1940 г. в Ленинграде в семье писателей. Пережил блокаду, затем, работая на Ленинградском металлическом заводе фрезеровщиком, окончил вечернюю школу рабочей молодежи. После трехлетней срочной службы в рядах Советской Армии в 1962 г. поступил в 1-ый Ленинградский меди-

цинский институт имени акад. И.П. Павлова, лечебный факультет которого он окончил в 1968 г.

С 1968 по 1982 г. работал научным сотрудником, заведующим лабораторией гистологии в Институте экспериментальной медицины, где проводил исследования в области тканеспецифической регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, занимался выделением и характеристикой нового класса ингибиторов клеточного деления — кейлонов.

С 1982 г. и до последних дней жизни С.А. Кетлинский работал в Государственном научно-исследовательском институте особо чистых биопрепаратов (ГосНИИ ОЧБ) заведующим лабораторией иммунофармакологии, а с 1990 — еще и заместителем директора института по научной работе. Основным направлением его научной деятельности в ГосНИИ ОЧБ было изучение медиаторов иммунитета — цитокинов и разработка на их основе рекомбинантных препаратов.

Особое внимание он уделял созданию противолучевых средств на основе цитокинов и внедрению их в практику.

В 1990 г. ему было присвоено ученое звание профессора по специальности «Аллергология и иммунология». В 2001 г. правительством Японии он был приглашен на 10 месяцев в Университет г. Канадзава для изучения роли хемокинов в патогенезе опухолей. В 2005 г. Сергей Александрович Кетлинский был избран членом-корреспондентом Российской академии медицинских наук (ныне РАН). В составе авторского коллектива стал лауреатом премии Правительства Российской Федерации 2006 г. в области науки и техники за конструирование бактериальных продуцентов, организацию биотехнологического производства субстанций и препаратов на основе рекомбинантных цитокинов человека и внедрение разработанного медицинского препарата «Беталейкин». В 2008 г. был награжден дипломом Российского научного общества иммунологов за выдающиеся достижения в области иммунологии.

Память о нем навсегда останется в наших сердцах.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С апреля 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, №1. С. 64-69.

Varjushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbircev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no.1, pp. 64-69.

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с.

Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Акушева Д.Н.	457	Зинченко Ю.С.	479	Мелашенко О.Б.	419	Тиллиб С.В.	567
Альшеевская А.А.	379	Иванова Т.И.	567	Меняйло М.Е.	419	Тимашева Я.Р.	407
Антонюк М.В.	495	Илькович М.М.	467	Михайлова В.А.	427	Тотолян Арег А.	467
Баранова О.П.	467	Исаков Д.В.	467	Могушкова Х.А.	539	Трохина И.Е.	559
Барковская М.Ш.	503	Калинина Е.П.	487, 495	Морозова Е.М.	419	Трунов А.Н.	441
Беломестнова И.А.	379	Калинина Н.М.	451	Мосина Л.М.	559	Тян Н.В.	441
Бердникова Т.В.	547	Камшилова В.В.	457	Мотова А.И.	457	Упирова А.А.	457
Блинова Е.А.	503	Капкаева Р.Х.	559	Непомнящих В.М.	503	Устьянцева Л.С.	517
Боцьковская М.А.	517	Караулов А.В.	379	Никонова А.А.	397	Феоктистов А.А.	451
Бурдаков В.С.	479	Климонт В.В.	441	Новгородцева Т.П.	495	Филатов М.В.	479
Бычкова С.В.	517	Козлов В.А.	503	Новикова Л.В.	559	Филипенко М.Л.	527
Бяхова М.М.	527	Коненков В.И.	441	Оскорбин И.П.	527	Хаитов М.Р.	397
Виткина Т.И.	495	Корсунский И.А.	527	Перьянова О.В.	457	Хаитов Р.М.	397
Газатова Н.Д.	419	Костин Н.А.	427	Полозова Э.И.	559	Хан Е.О.	567
Газиева И.А.	517	Костюченко М.В.	547	Пономаренко Д.Г.	547	Хохлова О.Е.	457
Гвозденко Т.А.	487	Кудрявцев И.В.	467	Поткина Н.К.	457	Хромов-Борисов Н.Н.	451
Гельцер Б.И.	487	Куличенко А.Н.	547	Продеус А.П.	527	Черных В.В.	441
Гергер В.Я.	555	Курпатов И.В.	487	Прокофьев В.Ф.	441	Черных Д.В.	441
Головкин А.С.	467	Курчева С.А.	547	Ракитина Е.Л.	547	Чистякова Г.Н.	517
Гончаров А.Г.	419	Кутилин Д.С.	539	Ремизова И.И.	517	Чурсинова Ю.В.	527
Горбурова Т.В.	487	Лазарева Н.М.	467	Русанова Д.В.	547	Шамова К.П.	517
Гордукова М.А.	527	Ланда С.Б.	479	Селедцов В.И.	419	Шевелева А.Р.	427
Горайнова О.С.	567	Леонова М.И.	503	Сельков С.А.	427	Шевченко А.В.	441
Гришина Л.В.	503	Лобанова Е.Г.	495	Сенников С.В.	379	Шепелькова Г.С.	555
Демина Д.В.	503	Логвиненко О.В.	547	Серебрякова М.К.	467	Эллиниди В.Н.	451
Денисова Н.В.	479	Лопатникова Ю.А.	379	Сесь Т.П.	467	Яблонский П.К.	479
Духовинов И.В.	555	Лямина А.В.	451	Соколов Д.И.	427	Ямамото Татсуо	457
Еремеев В.В.	555	Малашенко В.В.	419	Старшинова А.А.	479		
Жукова Ю.В.	379	Маркова К.Л.	427	Степанова О.И.	427		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

агонисты	397	интерлейкины	379	саркоидоз	468, 479
адаптивный иммунитет	517	интерфероны	379	скрининг	527
активация лимфоцитов <i>in vitro</i>	548	клинико-иммунологические		специфические иммунные	
ангиогенез	428	особенности	495	комплексы	479
антагонисты	397	контролируемая бронхиальная		Т-клетки памяти	504
антибиотикорезистентность	458	астма	495	Т-лимфоциты	407, 527
антигенный комплекс	548	маркеры активации	548	тип Т-хелперного иммунного ответа	495
антиоксидантная система	560	математическое моделирование	442	трофобласт	428
артериальное давление	407	метод динамического		туберкулез	555
аутоиммунитет	479	светорассеяния	479	фактор некроза опухоли	379
бронхиальная астма	504	микробиота	458	факторы роста	379
бронхолегочная дисплазия	517	многоцветный анализ	468	хемокины	407
бруцеллез	548	молекулярно-генетические		хроническая обструктивная	
БЦЖ	555	особенности	458	болезнь легких	487
В-лимфоциты	451, 527	моноцит/макрофаг	419	хронический эндометрит	451
вакцина	555	наивные Т-клетки	504	хроническое нарушение мозгового	
ВИЧ-инфицированные	458	недоношенные дети	517	кровообращения	560
воспаление	407	новорожденные	527	цитокиновый дисбаланс	560
врожденный иммунитет	517	нормы	527	цитокины	379, 407, 419, 428, 487, 495
генные сети	442	однодоменные антитела	568	частично контролируемая	
ген фактора роста эндотелия		патогенез	560	бронхиальная астма	495
сосудов	442	первичные иммунодефициты		экспрессия CD39	468
гены матриксных металлопротеиназ	442	(ПИД)	527	экспрессия генов	539
гипоксия	560	перекисное окисление липидов	560	эндотелиальные клетки	428
гранулоцитарно-макрофагальный		плазматические клетки	451	эрозивно-язвенные поражения	560
колониестимулирующий фактор	419	пневмония	458	эссенциальная гипертензия	407
двенадцатиперстная кишка	560	поствакцинальный иммунитет	548	CD138	451
диабетическая ретинопатия	442	предобработка плазмы крови	568	CD20	451
доксорубин	539	пролиферативная активность	504	CD4-лимфоциты	458
дыхательные мышцы	487	проточная цитометрия	468, 548	HeLa	539
иммуноанализ	568	раково-тестикулярные антигены	539	KREC	527
иммуногистохимическое		ревакцинация	555	MRSA	458
исследование	451	регуляторные Т-лимфоциты	468	NK-клетки	428
иммунопатология	379, 504	респираторные вирусные инфекции	397	РНА-стимуляция	504
иммунорегуляция	379	референсные интервалы	527	Th-клетки	495
иммуносорбенты	568	рецепторы	379	TLR	397
иммунотерапия	379	CD-экспрессия	419	TREC	527

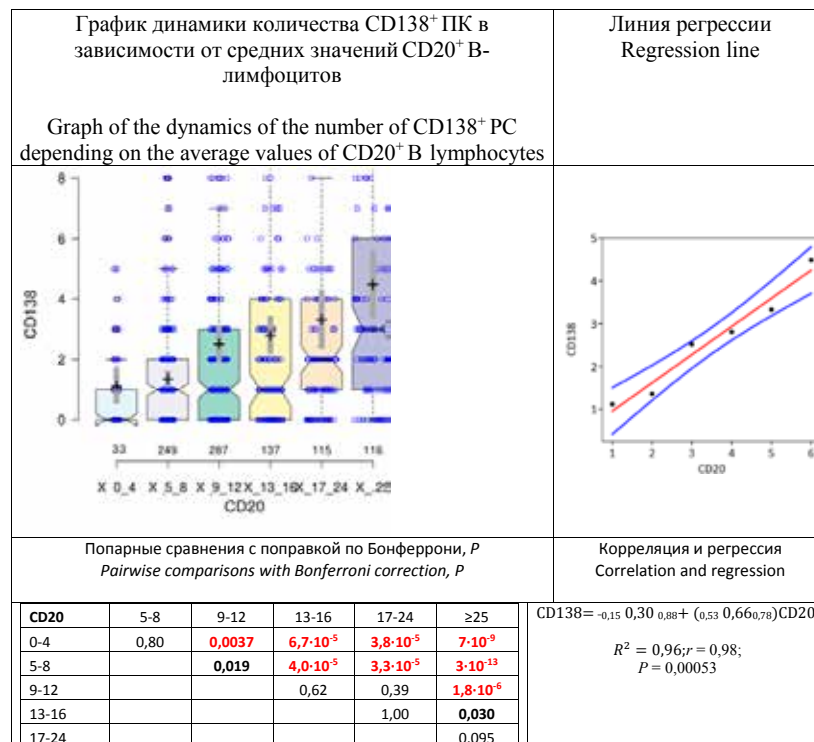


Рисунок 3. График и линия регрессии для зависимости CD138⁺ПК от средних значений CD20⁺В-лимфоцитов у женщин с хроническим эндометритом

Figure 3. Graph and regression line for CD138⁺PC dependence on mean CD20⁺B lymphocytes values of women with chronic endometritis

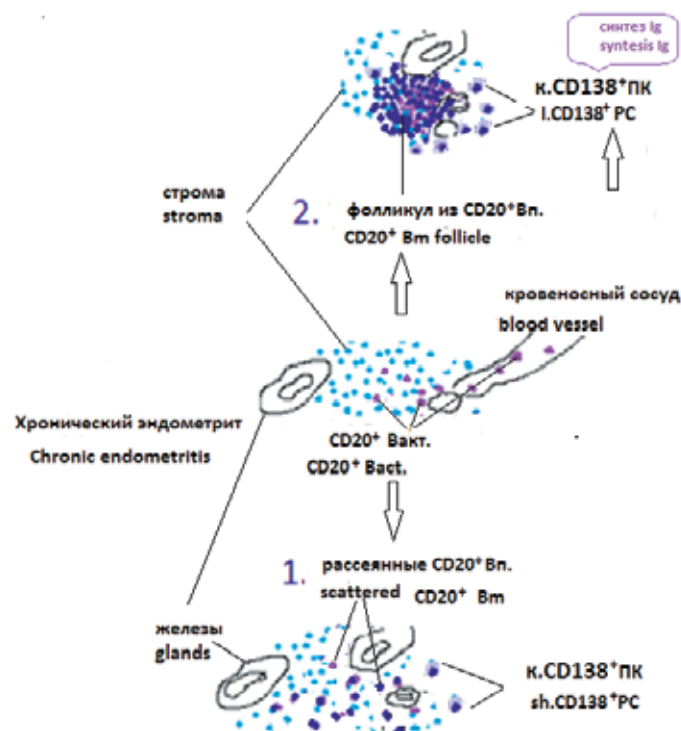


Рисунок 4. Схема трансформации В-лимфоцитов в плазматические клетки при хроническом эндометрите
Примечание. CD20⁺В акт. – CD20⁺В-лимфоциты активированные, CD20⁺В п. – CD20⁺В-лимфоциты памяти, к.СD138⁺ПК – короткоживущие ПК, д.СD138⁺ПК – долгоживущие ПК.

Figure 4. Scheme of B lymphocytes consequence into plasma cells in chronic endometritis

Note. Designations: CD20⁺ B act. (CD20⁺ B-activated cells), CD20⁺ B m. (CD20⁺ B memory cells), sh.CD138⁺ PC (short-lived CD138⁺ plasma cells), l.CD138⁺ PC (long-lived CD138⁺ plasma cells).

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

